THÈSE

Pour l'obtention du grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE POITIERS
UFR de médecine et de pharmacie
Laboratoire pharmacologie des anti-infectieux, Poitiers
(Diplôme National - Arrêté du 25 mai 2016)

École doctorale : Rosalind Franklin, Poitiers
Secteur de recherche : Pharmacologie et Sciences du médicament

Présentée par :
Romain Aubry

Apport de la modélisation pharmacocinétique/pharmacodynamique pour l'étude des combinaisons d'antibiotiques afin de lutter contre l'antibiorésistance

Directeur(s) de Thèse :
Nicolas Grégoire, Julien Buyck

Soutenue le 20 avril 2023 devant le jury

Jury :

Président	**Sandrine Marchand**	Professeure et praticienne hospitalière, Université de Poitiers
Rapporteur	**Grégory Batt**	Directeur de recherche INRIA, Institut Pasteur, Paris
Rapporteur	**Sylvain Goutelle**	Professeur et praticien hospitalier, ISPB, Université de Lyon
Membre	**Emmanuelle Comets**	Chargée de recherches INSERM, IAME, Site Bichat, Paris

Pour citer cette thèse :
Romain Aubry. *Apport de la modélisation pharmacocinétique/pharmacodynamique pour l'étude des combinaisons d'antibiotiques afin de lutter contre l'antibiorésistance* [En ligne]. Thèse Pharmacologie et Sciences du médicament. Poitiers : Université de Poitiers, 2023. Disponible sur Internet <http://theses.univ-poitiers.fr>

THESE

Pour l'obtention du Grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE POITIERS

(Faculté Médecine et Pharmacie)
(Diplôme National - Arrêté du 25 mai 2016)

École Doctorale 649 :
« *Rosalind Franklin* » - Énergie – Environnement - Biosanté

Secteur de Recherche :
Pharmacologie et Sciences du médicament

Présentée par :
Romain AUBRY

****

Apport de la modélisation pharmacocinétique/pharmacodynamique pour l'étude des combinaisons d'antibiotiques afin de lutter contre l'antibiorésistance

****

Directeur de Thèse :
Nicolas GREGOIRE et **Julien BUYCK**

****

Soutenue le 20 avril 2023 devant la Commission d'Examen

****

JURY

Présidente	**Sandrine MARCHAND**	PU-PH, Université de Poitiers
Rapporteur	**Grégory BATT**	DR2, INRIA/Institut Pasteur
Rapporteur	**Sylvain GOUTELLE**	PU-PH, Université de Lyon
Examinatrice	**Emmanuelle COMETS**	CRCN, INSERM IAME UMR 1137
Directeur de thèse	**Nicolas GREGOIRE**	MCU, Université de Poitiers
Directeur de thèse	**Julien BUYCK**	MCU, Université de Poitiers

Remerciements

Au Dr Grégory Batt et au Pr Sylvain Goutelle, pour avoir accepté d'être rapporteur de cette thèse, sincères remerciements.

Au Dr Emmanuelle Comets, merci d'avoir accepté de prendre part à ce jury. Il y a 3 ans, tu m'ouvrais les portes de la modélisation… Aujourd'hui je mesure un peu mieux la complexité de cette science et je comprends qu'il me reste beaucoup à apprendre.

Au Pr William Couet et au Pr Sandrine Marchand, merci de m'avoir donné la chance d'intégrer votre équipe. Je ne sais pas encore où cela me mènera mais je suis déterminé à poursuivre ce voyage. Soyez assurés de toute ma reconnaissance.

Au Dr Nicolas Grégoire et au Dr Julien Buyck, merci d'avoir accepté de diriger cette thèse et merci de m'avoir guidé tout au long de ces travaux. Soyez assurés de ma gratitude.

Nicolas, merci d'avoir partagé tes connaissances et ton expérience avec moi et d'avoir répondu à mes nombreuses questions de modélisation, j'ai énormément appris à tes côtés.

Julien, merci d'avoir pris le temps de me conseiller en toutes circonstances et de m'avoir fait redécouvrir les joies de la microbiologie après plusieurs années passées loin de la paillasse.

To Pr Sebastian Wicha, who unfortunately could not take part in this jury, thank you for the extensive discussions about modelling. I really appreciated collaborating with you and I hope to have this opportunity again in the future.

A toutes les personnes de l'U1070 que j'ai rencontrées au cours de ces trois années, merci pour votre accueil chaleureux et votre bonne humeur quotidienne. Merci de m'avoir accompagné, de près ou de loin, dans mes travaux.

Je tiens à remercier particulièrement Adrien, Clémence, Eduardo, Frédéric, Grace, Guillermo, Jennifer, Jérémy, Luc, Mathilde, Muriel, Noémie, Théo et Zahyra pour toutes ces joyeuses soirées apéros, billards, bowling, jeux de société, raclettes…, pour les nombreuses sorties sportives et estivales à l'îlot Tison et au Parc Strunga. Merci pour tous ces bons moments partagés, grâce à vous je garderai de bons souvenirs de Poitiers.

A Mike Horn et Nimsdai Purja, j'ai découvert par hasard votre manière de penser et de voir la vie, elle m'inspire profondément et m'aura fait changer d'état d'esprit. J'espère avoir un jour l'opportunité de vous rencontrer…

A toi Pierrot, le plus rennais des nantais, ta bonne humeur et ton sens de l'humour m'auront manqué ! On se revoit bientôt pour partager une mousse, parler sport et surtout rigoler.

Aux Vikings de Polytech', Adri, Grégouze et Paulo, pour cette formidable amitié tissée autour des moutons de Catane. Au plaisir de vous revoir place Plum' ou devant la bonne mère, de trinquer à l'Oxford, d'escalader la Ste Baume ou d'improviser un trail dans les calanques... qu'importe le lieu, pourvu qu'on s'y retrouve !

Aux chevaliers de la table ronde, Hugo le marin (force à toi mon meilleur binôme, toi aussi bientôt docteur), JF ramène nous des glaçons, Karadoc d'Alsace, Perceval du divan et sire Tristantouze pour toutes ces réunions mémorables. En route pour écrire la légende, j'ai déjà hâte de vous retrouver au roi Arthur, toujours en quête du Graal (et de téléphones).

Aux amis de trèèès longue date, Damien (#Tyffany's), Valentin (#RoazhonPark), Bastian, Benoit, Elphège, Jocelyn, Kévin, Lucien et Quentin (#ToboggandeSarzeau) pour tous les bons moments passés ensemble et à tous ceux qu'il nous reste à vivre.

A ma famille, le covid nous aura séparé un temps mais sans doute était-ce pour mieux nous retrouver. Vous me donnez la force d'avancer un peu plus chaque jour, et bien que je ne sache pas toujours où je vais, je sais au moins d'où je viens.

A mes parents et à ma sœur qui me soutiennent depuis toujours, je veux simplement vous dire que je vous aime.

Table des matières

Table des matières 5
Liste des publications 7
Liste des communications 8
Liste des abréviations 9
Liste des Figures 10
1. Introduction 11
2. Association ceftazidime/avibactam 13
2.1. Ceftazidime 13
2.2. Avibactam 14
2.3. Association ceftazidime/avibactam 17
2.4. Colistine 19
3. Combinaisons d'antibiotiques 23
3.1. Intérêt des combinaisons d'antibiotique 23
3.2. Projet CO-PROTECT 24
3.3. Combinaison ceftazidime/avibactam + colistine 24
4. Modélisation PKPD des antibiotiques *in vitro* 25
4.1. Modèle bactérien 26
4.2. Modèle pharmacocinétique 27
4.3. Modèle d'effet 27
4.4. Modèle de résistance 28
4.5. Modèle d'effet inoculum 29
4.6. Modèle de combinaison 30
5. Méthodes expérimentales pour l'étude *in vitro* des combinaisons d'antibiotiques 34
5.1. Checkerboard 34
5.2. Checkerboard dynamique 36
5.3. Time-Kill Curve 38
5.4. Designs de TKC pour l'étude des combinaisons d'antibiotiques 40
6. Optimisation de design pour l'étude des combinaisons d'antibiotique 44
6.1. Principe de l'optimisation de design 44

6.2. Matrice d'information de Fisher 46
6.3. Optimisation de design par méthode de D-optimalité 47
6.4. Evaluation de design optimisé 48
7. Evaluation de l'incertitude d'estimation des paramètres 50
7.1. Incertitude des paramètres 50
7.2. Matrice de covariance asymptotique 51
7.3. Méthode de ré-échantillonnage par bootstrap 52
7.4. Sampling Importance Resampling 55
7.5. Méthode de Monte-Carlo par Chaînes de Markov 58
7.6. Variabilité des prédictions du modèle 61
8. Objectifs de la thèse 62
9. Article 1 : Optimized Rhombic Experimental Dynamic Checkerboard Designs to Elucidate Pharmacodynamic Drug Interactions of Antibiotics 63
10. Screening de l'interaction pharmacodynamique entre la ceftazidime/avibactam et la colistine 79
11. Article 2 : An improved PKPD modelling approach to characterize the pharmacodynamic interaction over time between ceftazidime/avibactam and colistin from in vitro time-kill experiments against multidrug resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates 84
12. Article 3 : PKPD modelling of the inoculum effect of combined ceftazidime/avibactam and colistin against a multidrug resistant *Klebsiella pneumoniae* isolate 128
13. Discussion et perspectives 159
14. Conclusion 165
15. Références 166

Liste des publications

1. Kroemer N, **Aubry R**, Couet W, Grégoire N, Wicha SG. 2022. Optimized Rhombic Experimental Dynamic Checkerboard Designs to Elucidate Pharmacodynamic Drug Interactions of Antibiotics. Pharm Res https://doi.org/10.1007/s11095-022-03396-7.

2. **Aubry R**, Buyck J, Prouvensier L, Decousser JW, Nordmann P, Wicha SG, Marchand S, Grégoire N. An improved PKPD modelling approach to characterize the pharmacodynamic interaction over time between ceftazidime/avibactam and colistin from in vitro time-kill experiments against multidrug resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates. Soumis à Antimicrobial Agents and Chemotherapy.

3. **Aubry R**, Buyck J, Prouvensier L, Decousser JW, Nordmann P, Wicha SG, Marchand S, Grégoire N. PKPD modelling of the inoculum effect of combined ceftazidime/avibactam and colistin against a multidrug resistant *Klebsiella pneumoniae* isolate. Dans le manuscrit.

Liste des communications

1. **Aubry R**, Buyck J, Wicha SG, Decousser JW, Nordmann P, Couet W, Grégoire N. Semi-mechanistic PKPD modelling of combined ceftazidime/avibactam and colistin against five multidrug resistant isolates of *Klebsiella pneumoniae*. International Society of Anti-Infective Pharmacology (ISAP) Young Investigator Session, Présentation Orale, 22/04/2022

2. **Aubry R**, Buyck J, Wicha SG, Decousser JW, Nordmann P, Couet W, Grégoire N. Systematic interaction screening of ceftazidime-avibactam and colistin against carbapenem-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. 32nd European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID), poster P0716

3. **Aubry R**, Buyck J, Wicha SG, Decousser JW, Nordmann P, Couet W, Grégoire N. Semi-mechanistic PKPD modelling of combined ceftazidime/avibactam and colistin against five multidrug resistant isolates of *Klebsiella pneumoniae*. 32nd European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID), poster P1335

Liste des abréviations

ANR : Agence Nationale de la Recherche
BMBF : Ministère fédéral allemand de l'Éducation et de la Recherche
CFU : Colony Forming Unit – Unité Formant Colonie
CMI : Concentration Minimale Inhibitrice
CST : Colistine
CZA : Ceftazidime/Avibactam
EMA : European Medicine Agency - Agence Européenne du Médicament
ECDC : European Centre for Disease Prevention and Control - Centre européen de prévention et de contrôle des maladies
FDA : Food and Drug Administration - Agence fédérale américaine des produits alimentaires et médicamenteux
FICI : Fractionnal Inhibitory Concentration Index
FIM : Fisher Information Matrix – Matrice d'Information de Fisher
GPDI : General PharmacoDynamic Interaction model – Modèle général d'interaction pharmacodynamique
IR : Importance Ratio – Ratio d'importance
LPS : lipopolysaccharides
MCMC : Monte Carlo Markov Chain – Simulation de Monte Carlo par Chaîne de Markov
ML : Maximum Likelihood – Maximum de Vraisemblance
OMS : Organisation Mondiale de la Santé
OFV : Objective Function Value – Fonction Objective de Vraisemblance
PD : Pharmacodynamie
PDF : Probability Density Function – Fonction de densité de probabilité
PK : Pharmacocinétique
PKPD : Pharmacocinétique/Pharmacodynamie
PLP : Protéine Liant les Pénicillines
RSE : Relative Standard Error – Erreur type relative
SE : Standard Error – Erreur type
SIR : Sampling Importance Resampling
SSE : Stochastic Simulation and Estimation
TKC : Time-Kill Curve

Liste des Figures

Figure 1. Evolution du nombre d'articles scientifiques sur les combinaisons d'antibiotiques publiés depuis 1945 12
Figure 2. Structure chimique de la ceftazidime 13
Figure 3. Diagramme schématique de la classification des β-lactamases selon la classification révisée d'Ambler 15
Figure 4. Structure chimique de l'avibactam 16
Figure 5. Structure chimique de la colistine 20
Figure 6. Mécanisme d'action de la colistine 21
Figure 7. Schéma de synthèse de la modélisation PKPD 25
Figure 8. Illustration de checkerboard 35
Figure 9. Checkerboard dynamique et analyse de surface 37
Figure 10. Exemple de profils typiques observés en TKC pour un antibiotique seul 39
Figure 11. Illustration des designs étudiés par Chen et al. 41
Figure 12. Illustration du design à ratio constant. 43
Figure 13. Représentation schématique de l'optimisation de design 46
Figure 14. Principe du bootstrap non paramétrique 53
Figure 15. Principe du bootstrap paramétrique 54
Figure 16. Principe du SIR 56
Figure 17. Principe de la méthode MCMC selon l'algorithme de Metropolis 60

1. Introduction

La découverte des **antibiotiques** au cours du XX^{ème} siècle a profondément révolutionné le traitement des infections bactériennes. Leur utilisation massive chez l'homme et l'animal a permis de réduire considérablement la mortalité due aux maladies infectieuses dans le monde, mais elle a aussi fait émerger une nouvelle problématique : **l'antibiorésistance**. Ce terme traduit la capacité d'une bactérie à résister à un ou plusieurs antibiotique(s), rendant ainsi ces traitements inefficaces. L'utilisation inadaptée des antibiotiques a favorisé l'apparition et la dissémination de nouvelles résistances à l'échelle mondiale. Ce phénomène constitue aujourd'hui un enjeu de santé publique prioritaire. En effet, selon le dernier rapport du système mondial de surveillance de la résistance aux antimicrobiens publié par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), plus de **3 millions d'infections** causées par des pathogènes sous surveillance ont été recensées dans 70 pays (1). Si aucune solution n'est apportée pour endiguer ce phénomène, ces chiffres pourraient continuer d'augmenter dans les décennies à venir et le rapport O'neill estime qu'en 2050, **10 millions de vies humaines** seraient menacées chaque année par les bactéries multi-résistantes (2).

Par ailleurs, l'augmentation de la résistance aux antibiotiques s'est accompagnée d'une nette diminution de l'activité de recherche et développement de nouvelles molécules, ce modèle économique est en effet jugé défavorable par les industries pharmaceutiques (développement long et couteux de traitements peu rentables) (3). Ainsi, depuis le début des années 2000, seulement **16 molécules antibiotiques** se sont vu accorder une autorisation de mise sur le marché par l'Agence Européenne des Médicaments (EMA) (4). Les solutions pour traiter les infections sévères dues aux bactéries multi-résistantes sont désormais limitées et le risque de voir apparaître des situations d'impasses thérapeutiques est élevée, en particulier contre les agents pathogènes de priorité critique de la liste de l'OMS (5).

La production de **β-lactamases** constitue l'un des mécanismes le plus répandu chez les bactéries Gram négatif (6). Ces enzymes peuvent dégrader un spectre plus ou moins étendu de β-lactamines et les rendre inactives. Afin de lutter contre ce mécanisme de résistance, les β-lactamines ont rapidement été associées à des inhibiteurs de β-lactamases.

Récemment, trois nouvelles **associations de β-lactamines/inhibiteur de β-lactamases** ont rejoint l'arsenal thérapeutique des antibiotiques : le ceftolozane/tazobactam (2015), la ceftazidime/avibactam (2016) et le méropénème/vaborbactam (2020). Malgré leur usage encore restreint, des résistances ont d'ores et déjà été observées chez les bactéries Gram négatif capables de produire des β-lactamases à spectre étendu. Afin d'étendre la durée de vie de ces nouvelles molécules, il est nécessaire de développer des stratégies thérapeutiques viables et d'optimiser les traitements disponibles. Parmi les solutions envisagées dans la lutte contre l'antibiorésistance, les **combinaisons d'antibiotiques** sont étudiées depuis de nombreuses années (7). La Figure 1 illustre l'essor de la recherche dans ce domaine depuis 1945.

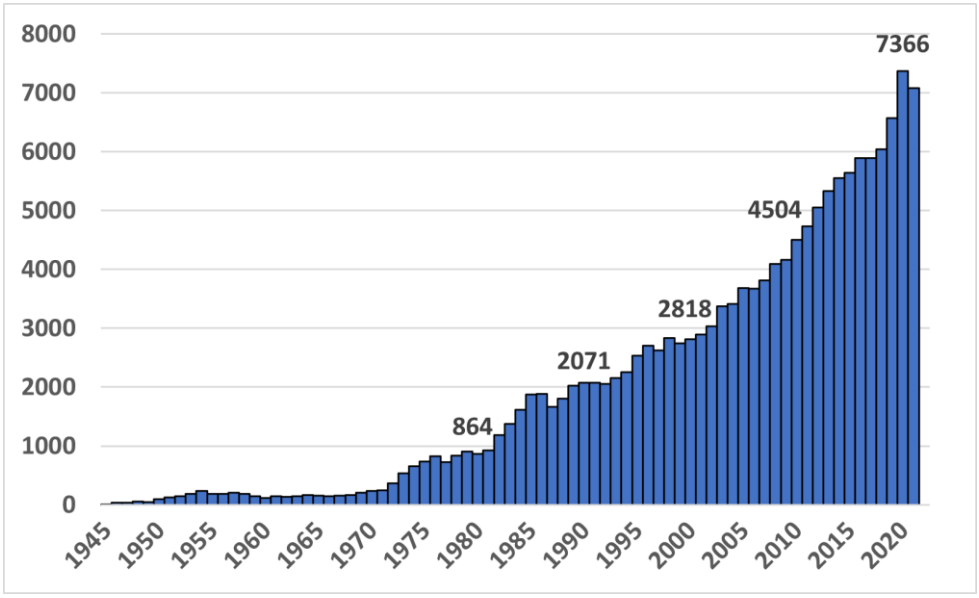


Figure 1. *Evolution du nombre d'articles scientifiques sur les combinaisons d'antibiotiques publiés depuis 1945. D'après le Résultat de la recherche Pubmed "antibiotic combination".*

Le projet **CO-PROTECT** (8) s'inscrit dans le cadre de l'appel à projet franco-allemand ANR/BMBF sur la résistance antimicrobienne et s'intéresse plus particulièrement aux traitements à base de β-lactamines/inhibiteur de β-lactamases combinées à des antibiotiques de dernier recours. Le développement rationnel de ces combinaisons nécessite de caractériser les interactions pharmacodynamiques entre molécules afin d'identifier des schémas posologiques permettant de maximiser leur efficacité et de lutter efficacement contre l'émergence de résistance.

2. Association ceftazidime/avibactam

2.1. Ceftazidime

La ceftazidime, autorisée pour la première fois en 1985 par la Food and Drug Administration (FDA), est une β-lactamine à spectre étendu appartenant à la famille des céphalosporines de 3ème génération.

2.1.1. Structure

La ceftazidime possède un noyau céphème, illustré par la Figure 2, et se distingue des autres céphalosporines de 3ème génération (cefotaxime et ceftriaxone) par son efficacité contre *Pseudomonas aeruginosa* (9).

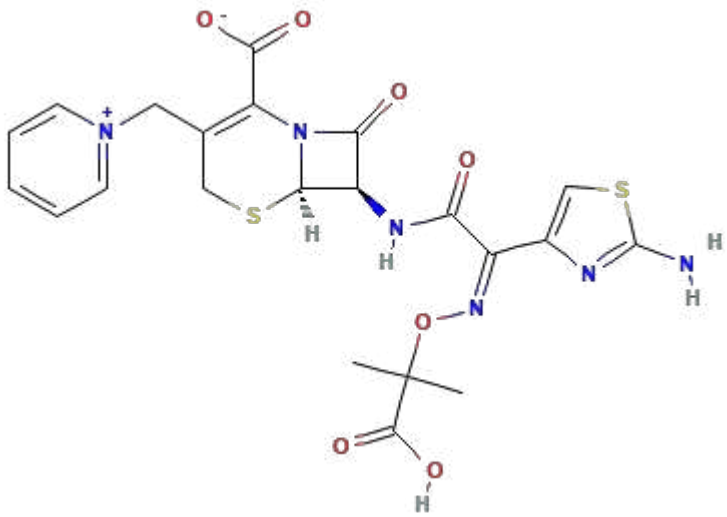


Figure 2. *Structure chimique de la ceftazidime. D'après (9)*

2.1.2. Mécanisme d'action

L'activité bactéricide de la ceftazidime s'explique par sa liaison aux protéines liant les pénicillines (PLPs) provoquant une inhibition des enzymes impliquées dans la synthèse du peptidoglycane, élément essentiel des parois bactériennes. Il a été montré que la ceftazidime

présentait une forte affinité pour les PLP3 chez *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa* (10).

2.1.3. Spectre d'activité antibactérien

La ceftazidime présente un spectre d'activité relativement large puisqu'elle est efficace contre les bactéries Gram négatif aérobies (telles que *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* ou *P. aeruginosa*), les bactéries Gram positif aérobies (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*) ainsi que certaines espèces anaérobies (11).

2.1.4. Indications

Du fait de son large spectre d'activité, la ceftazidime est indiquée pour le traitement de nombreuses infections bactériennes (11): infections des voies respiratoires inférieures (pneumonie), infections de la peau, infections des voies urinaires, septicémies, infections intra-abdominales (péritonite), infections gynécologiques (endométrite) et infection du système nerveux central (méningite).

2.1.5. Mécanisme de résistance

Le principal mécanisme de résistance à la ceftazidime est lié à une surexpression de l'AmpC (12, 13). Il s'agit d'une céphalosporinase encodée sur les chromosomes de nombreuses Enterobacterales, mais les gènes codant pour cette enzyme peuvent aussi être transmis par des plasmides et contribuer à la dissémination de la résistance chez les bactéries dépourvues ou exprimant faiblement le gène chromosomique de l'AmpC (12). Dans une moindre mesure, l'activité de la ceftazidime peut aussi être diminuée du fait de la surexpression de pompes d'efflux (mexB ou mexY) (13).

2.2. Avibactam

L'avibactam est un inhibiteur de β-lactamases découvert en 2003. Il s'agit de la première molécule de la classe des diazabicyclo-octanones. Les β-lactamases sont des

enzymes capables de dégrader les β-lactamines. La classification d'Ambler (14), basée sur l'homologie des séquences d'acides aminés, est la méthode la plus couramment utilisée pour classer les β-lactamases et permet de distinguer quatre classes : les β-lactamases à sérine de classe A (pénicillinases), C (céphalosporinases) et D (oxacillinases) et les métallo-β-lactamases de classe B. Au vu du nombre important de β-lactamases et de leur diversité, une classification révisée, schématisée par la Figure 3, a été proposée en 2005 (15).

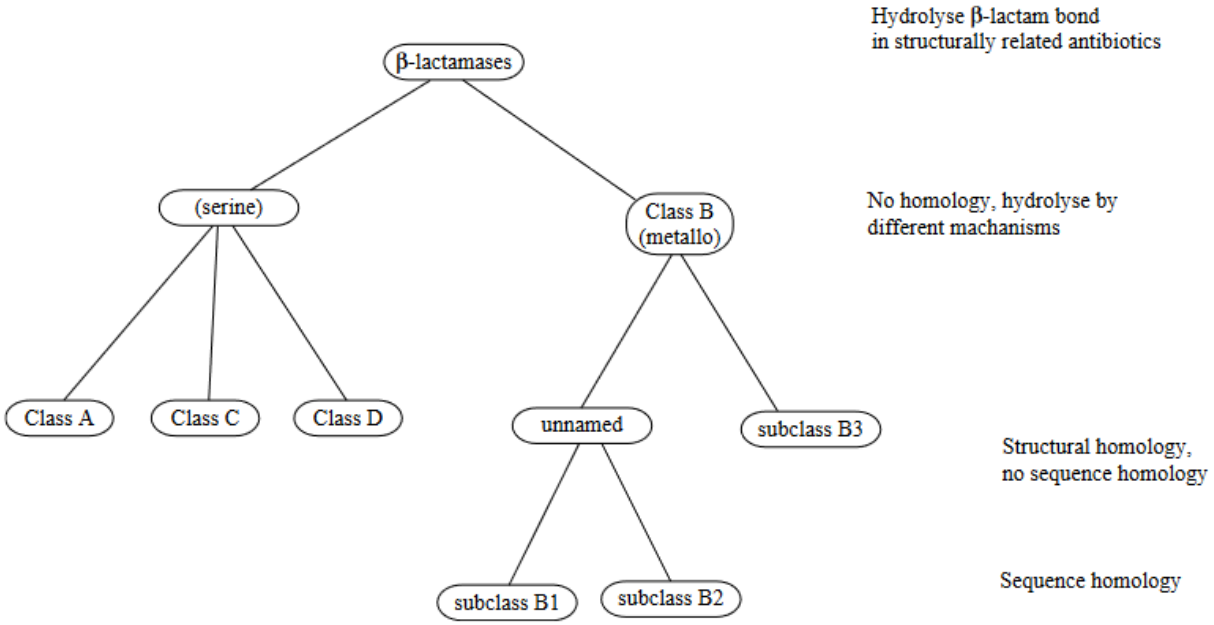


Figure 3. *Diagramme schématique de la classification des β-lactamases selon la classification révisée d'Ambler. D'après (15)*

2.5.1. Structure

La structure chimique de l'avibactam, présentée Figure 4, ne contient pas de cycle β-lactame mais un acide mono carboxylique lié à un groupe amide capable d'interagir avec les sérine-β-lactamases (16).

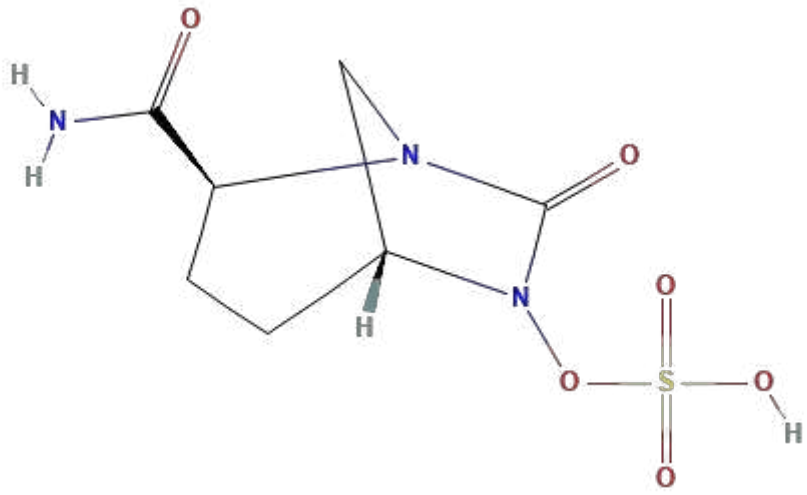


Figure 4. *Structure chimique de l'avibactam. D'après (17)*

2.5.2. Mécanisme d'action

L'avibactam exerce son activité inhibitrice suite à une réaction d'acylation permettant une liaison covalente et spécifique au résidu sérine du site actif des β-lactamases (18). De plus, il a été démontré que la formation de ce complexe était réversible (par réaction de désacétylation) permettant de libérer lentement l'avibactam (18). La molécule restant intacte à la suite de cette réaction, elle peut à nouveau se fixer aux β-lactamases.

2.5.3. Spectre d'inhibition des β-lactamases

L'avibactam présente un large spectre d'inhibition et possède une activité contre les β-lactamases de classe A (pénicillinases, β-lactamases à spectre étendu de type CTX-M et carbapénémases de type KPC), de classe C (céphalosporinase de type AmpC) et de classe D (oxacillinases, β-lactamases à spectre étendu et carbapénémases de type OXA). Il n'a cependant aucune efficacité sur les métallo-β-lactamases de classe B de la classification d'Ambler (16).

2.5.4. Activité antibactérienne

En plus de son activité inhibitrice, l'avibactam présente aussi un léger effet bactéricide. En effet, plusieurs études *in vitro* menées sur des enterobacterales ont déterminé une concentration minimale inhibitrice (CMI) comprise entre 8 et 32 mg/L pour la majorité des souches (19–21). Cette activité est due à la fixation sélective de l'avibactam aux protéines liant les pénicillines, avec une plus forte affinité pour les PLP2 observée chez *K. pneumoniae* (22) et *E. coli* (23).

2.3. Association ceftazidime/avibactam

2.5.1. Intérêt de l'association ceftazidime/avibactam

La FDA (2015) et l'EMA (2016) ont approuvé l'association ceftazidime/avibactam afin de prévenir l'acquisition et la dissémination de β-lactamases chez les Enterobacterales en particulier *E. coli*, *K. pneumoniae*. En effet, en 2012, le centre européen de contrôle et de prévention des maladies (ECDC) publiait son rapport de surveillance microbiologique, indiquant que 11.8% des souches de *E. coli* et 25.7% des souches de *K. pneumoniae* étaient résistantes aux céphalosporines de 3ème génération (en nette augmentation par rapport à 2009) et soulignait ainsi la progression de la résistance aux carbapénèmes (24).

L'administration conjointe d'avibactam permet de restaurer l'activité bactéricide de la ceftazidime malgré la production de β-lactamases par les Enterobacterales. Entre 2012 et 2014, l'étude de surveillance mondiale INFORM (International Network For Optimal Resistance Monitoring) comparait l'activité *in vitro* de l'association ceftazidime/avibactam sur des souches cliniques d'Enterobacterales et a montré que la concentration minimale inhibitrice de ceftazidime/avibactam permettant d'inhiber 90% des souches (CMI_{90}) était de 0.5 mg/L, contre 64 mg/L pour la ceftazidime seule (25). Cependant, sur les 185 souches résistantes à cette association, 144 (soit 77.8%) produisaient des metallo-β-lactamases (avec une CMI_{90} supérieure à 128 mg/L), démontrant ainsi l'inefficacité de l'avibactam contre ces enzymes (25).

2.5.2. Emergence de résistance à l'association ceftazidime/avibactam

Malgré un usage encore restreint, plusieurs cas cliniques aux USA et en Europe ont récemment rapporté l'émergence de résistance à ceftazidime/avibactam. Le premier cas clinique de résistance a été observé en 2015 par Humpries *et al.* (26) dans une souche de *K. pneumoniae* productrice de KPC-3. Par la suite, plusieurs études (27–29) ont également observé une augmentation des CMI de souches *K. pneumoniae* productrices de β-lactamases de type KPC-2 ou KPC-3. Ces phénomènes de résistance ont aussi été identifiés *in vitro* à l'échelle mondiale (30, 31). Ainsi, l'efficacité de cette nouvelle association pourrait être compromise quelques années seulement après sa mise sur le marché. Face à l'accroissement de ces phénomènes, l'ECDC publiait en 2018 une évaluation des risques de l'émergence de résistance à ceftazidime/avibactam chez les Enterobacterales résistantes aux carbapénèmes afin d'entreprendre des mesures préventives (32).

Il existe trois principaux mécanismes à l'origine de la résistance à l'association ceftazidime/avibactam (31), qui peuvent se manifester simultanément chez les bactéries Gram négatif.

Le mécanisme le plus répandu est dû à une résistance enzymatique qui entraîne l'inactivation de l'antibiotique (31) : sous l'effet de mutations se produisant au niveau du site actif des β-lactamases, l'avibactam ne peut plus assurer son rôle inhibiteur. La sensibilité de la souche est alors fortement réduite.

Le second mécanisme pouvant expliquer une diminution de l'efficacité de la ceftazidime/avibactam est une diminution de la perméabilité de la membrane externe des bactéries. La mutation des porines (voire leur perte) altère le passage de l'antibiotique au travers de la membrane (33, 34) et réduit la disponibilité de la ceftazidime dans le périplasme. La fixation aux PLPs est alors insuffisante pour provoquer un effet bactéricide. L'expression de pompes d'efflux au niveau de la membrane externe pourrait aussi contribuer de façon mineure à réduire la perméabilité de cette dernière (31, 34). En présence de ces pompes, l'antibiotique contenu dans le périplasme est relargué à l'extérieur de la bactérie.

Le troisième mécanisme qui peut entraîner une diminution de la sensibilité à la ceftazidime/avibactam est une modification de la conformation de la cible ou une diminution de son expression (31). La modification des PLPs suite à des mutations ou une surexpression des β-lactamases peuvent ainsi impacter l'effet bactéricide de l'antibiotique.

Afin de protéger cette nouvelle association face au développement de résistance et maintenir sa viabilité dans l'arsenal thérapeutique, de nouvelles stratégies sont nécessaires. Pour cette raison, l'efficacité de la ceftazidime/avibactam a été testée en association avec de nombreux antibiotiques (méropénème, tigécycline, gentamycine, colistine, fosfomycine et amikacine) (35–37). Ces traitements ont permis de réintroduire d'anciens antibiotiques, largement délaissés pour leur manque d'efficacité et/ou leur toxicité. C'est notamment le cas des polymyxines, découvertes au cours de la deuxième moitié du XX^{ème} siècle, qui ont été remplacées par d'autres classes d'antibiotiques mais qui bénéficient aujourd'hui d'un regain d'intérêt dans un contexte où le nombre de nouveaux antibiotiques disponibles a fortement décliné (38–40).

2.4. Colistine

La colistine, aussi appelée polymyxine E, est un ancien antibiotique découvert dans les années 50 et appartenant au groupe des polymyxines. Du fait de sa néphrotoxicité chez l'Homme, la colistine a progressivement été écartée de la pratique clinique au profit d'autres antibiotiques. Cependant avec le développement des bactéries Gram négatif multi-résistantes, elle a connu un regain d'intérêt comme antibiotique de dernier recours (39, 41, 42).

2.5.1. Structure

La colistine est un antibiotique polypeptidique cyclique (Figure 5). Il s'agit d'un mélange complexe de plusieurs composés dont les deux principaux, la colistine A et la colistine B sont en proportions variables. A pH physiologique, la colistine se présente sous forme cationique.

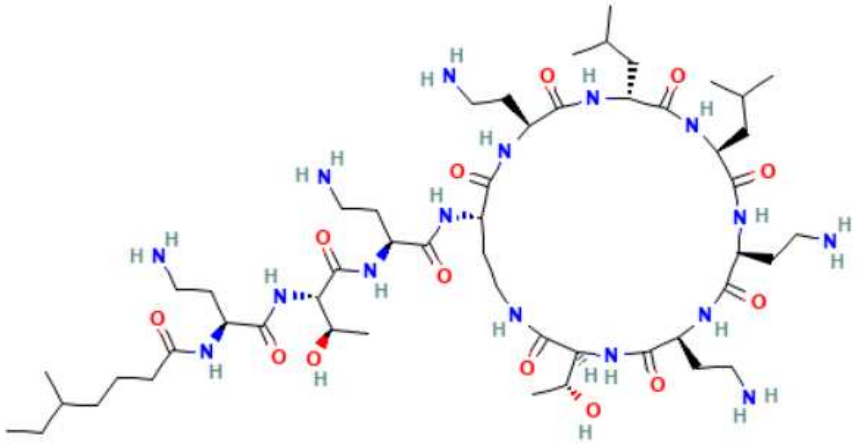


Figure 5. *Structure chimique de la colistine. La queue terminale de la colistine (composée par une chaîne acyle hydrophobe) apparaît sur la gauche. D'après (43)*

2.5.2. Mécanisme d'action

Le mécanisme d'action de la colistine, illustré Figure 6, se déroule en plusieurs étapes (44, 45). Dans un premier temps, la colistine se lie aux lipopolysaccharides (LPS) de la membrane externe des bactéries par des interactions électrostatiques① et déplace les cations divalents (calcium, magnésium) ce qui altère la structure tridimensionnelle et la stabilité du LPS ②. Cette fragilisation des liaisons covalentes entre molécules de la membrane externe provoque la libération du LPS ③ et permet à la colistine d'insérer sa queue terminale lipidique pour endommager davantage la membrane externe ④. Une fois la membrane externe perméabilisée, la colistine peut atteindre le périplasme ⑤ et interagir avec le LPS de la membrane interne des bactéries Gram négatif. De manière analogue, la colistine déplace les cations Ca^{2+} et Mg^{2+} de la membrane interne ⑥ et dégrade sa structure jusqu'à la perméabiliser via l'action de la queue lipidique ⑦. Ceci abouti finalement à la perte du contenu cytoplasmique, à la lyse cellulaire et à la mort des bactéries ⑧.

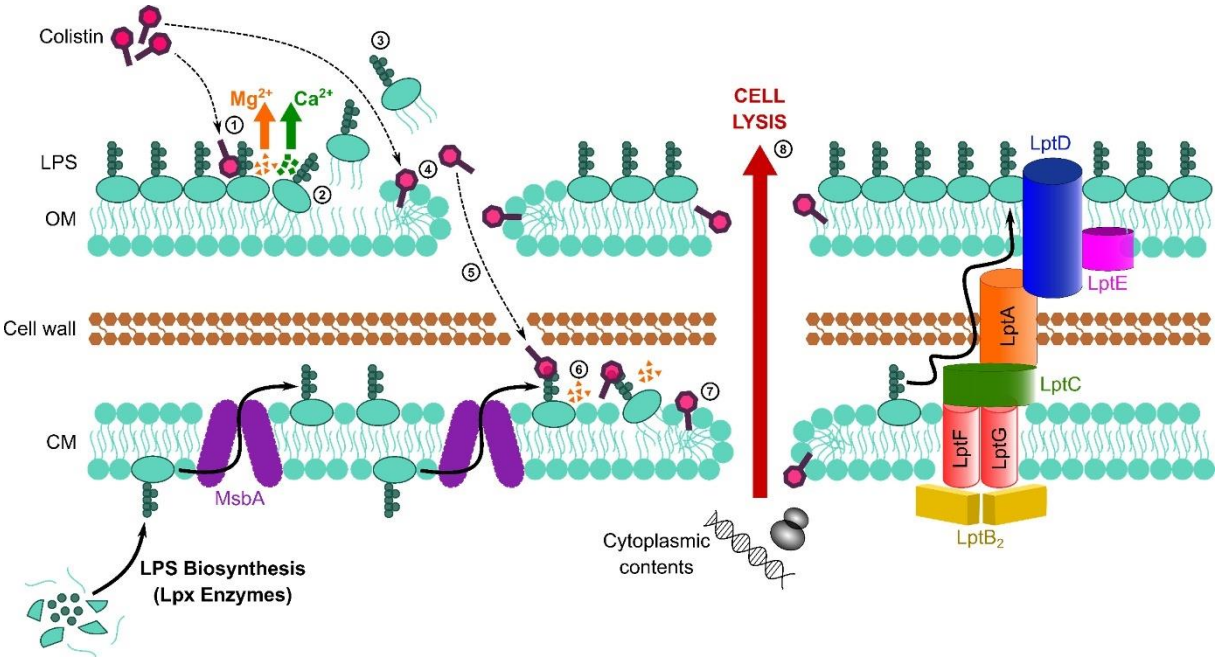


Figure 6. *Mécanisme d'action de la colistine. D'après (45)*

2.5.3. Spectre d'activité antibactérien

La colistine présente une activité bactéricide contre un large spectre de bactéries Gram négatif dont *Acinetobacter* spp., *P. aeruginosa, Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *E. coli* (42, 46, 47). A l'inverse, il existe des espèces naturellement résistantes contre lesquelles la colistine est inactive (42, 46, 47).

2.5.4. Indications

La colistine est principalement utilisée en dernier recours pour le traitement des infections dues à des bactéries Gram négatif résistantes aux autres agents antimicrobiens disponibles (après confirmation par un test de sensibilité) ou lorsque le traitement par ces agents s'est révélé cliniquement inefficace (41, 46). Elle peut être administrée par voie intraveineuse pour traiter les infections systémiques ou des voies urinaires et par nébulisation pour traiter les infections des voies respiratoires (41).

2.5.5. Mécanismes de résistance

Le mécanisme de résistance à la colistine le plus répandu chez les bactéries Gram négatif est une modification du LPS via des systèmes de régulation à deux composants (PhoPQ et PmrAB). L'activation de ces systèmes déclenche une série de réponses en cascade qui conduit à la modification du lipide A du LPS et à la diminution des charges négatives à la surface de la membrane des bactéries, réduisant ainsi la capacité de fixation de la colistine au LPS (42). Chez *E. coli*, la résistance à la colistine peut aussi être médiée par un plasmide noté MCR (Mobile Colistin Resistance) portant un gène codant pour une ethanolamine transferase qui conduit à une modification du LPS (42, 45).

2.5.6. Combinaison

Afin d'augmenter son efficacité, la colistine peut être utilisée en combinaison. De nombreuses études *in vitro* ont montré une activité synergique de la colistine utilisée en combinaison avec d'autres antibiotiques contre *Acinetobacter baumannii*, *K. pneumoniae* ou *P. aeruginosa* (42, 47).

3. Combinaisons d'antibiotiques

3.1. Intérêt des combinaisons d'antibiotique

L'utilisation des antibiotiques en combinaison est une pratique de plus en plus répandue pour lutter contre les bactéries multi-résistantes. En théorie, ces combinaisons présentent de multiples avantages dont les principaux sont (48–50):

- D'**élargir le spectre d'activité** de la combinaison afin de maintenir une efficacité contre les souches résistantes ou contre plusieurs espèces bactériennes.

- De **prévenir le développement de nouvelles résistances**. En effet, le risque de voir apparaître une résistance à une combinaison de plusieurs antibiotiques est fortement réduit par rapport à celui d'une molécule utilisée seule.

- D'exploiter des **interactions synergiques entre antibiotiques** afin d'accroitre l'effet antibactérien de la combinaison par rapport à celui des antibiotiques utilisés seuls. Cependant, certaines combinaisons peuvent aussi présenter un effet antagoniste. Ces aspects seront davantage développés dans le paragraphe 4.6.1.

- De **réduire la toxicité** de certains antibiotiques en administrant des doses plus faibles.

Ainsi, les traitements par combinaisons de plusieurs agents antibactériens sont de plus en plus considérés car ils constituent une approche prometteuse pour combattre les bactéries multi-résistantes et lutter contre l'émergence de nouveaux mécanismes. Cependant, de nombreuses combinaisons d'antibiotiques ont été développées de façon empirique et le bénéfice qu'elles apportent est parfois incertain (49, 51).

3.2. Projet CO-PROTECT

Suite à la publication de la liste des agents pathogènes de priorité critique par l'OMS (5), le ministère de l'enseignement supérieur, de la recherche et de l'innovation et le ministère fédéral allemande de l'éducation et de la recherche lançaient en 2019 le premier appel à projets franco-allemand dans le domaine de la résistance antimicrobienne. Le projet CO-PROTECT (8) s'inscrit dans ce cadre et vise à identifier et à optimiser l'usage des associations de β-lactamines/inhibiteur de β-lactamases, combinées à d'autres antibiotiques afin d'augmenter leur efficacité et prévenir l'émergence de résistance. Ce projet de thèse s'intéresse plus spécifiquement à la combinaison **ceftazidime/avibactam + colistine**.

3.3. Combinaison ceftazidime/avibactam + colistine

Comme vu précédemment, l'association ceftazidime/avibactam est un traitement efficace contre les bactéries Gram négatif multi-résistantes mais elle n'échappe pas au phénomène d'antibiorésistance et de nouvelles stratégies doivent être envisagées pour prolonger au maximum sa durée de vie. L'utilisation combinée de ceftazidime/avibactam avec la colistine semble prometteuse. En effet, ces antibiotiques présentent des mécanismes d'action complémentaires et des spectres d'activité étendu. Néanmoins, dans un contexte d'antibiorésistance de plus en plus impactant, il est primordial de développer ces combinaisons de manière rationnelle. Ceci implique d'identifier les combinaisons d'antibiotiques favorables, d'optimiser leur schéma d'administration et de comprendre leur impact sur l'émergence de résistance. La modélisation pharmacocinétique/pharmacodynamique est un outil particulièrement adapté à l'étude des combinaisons d'antibiotique comme nous allons le voir dans le prochain chapitre.

4. Modélisation PKPD des antibiotiques *in vitro*

La **pharmacocinétique (PK)** décrit l'évolution de la concentration d'un médicament au cours du temps après l'administration d'une certaine dose (**Figure 7**). La **pharmacodynamie (PD)** décrit l'effet pharmacologique d'un médicament en fonction de sa concentration. La **pharmacocinétique/pharmacodynamie (PKPD)** résulte de ces deux disciplines et permet de décrire l'effet d'un médicament au cours du temps (52).

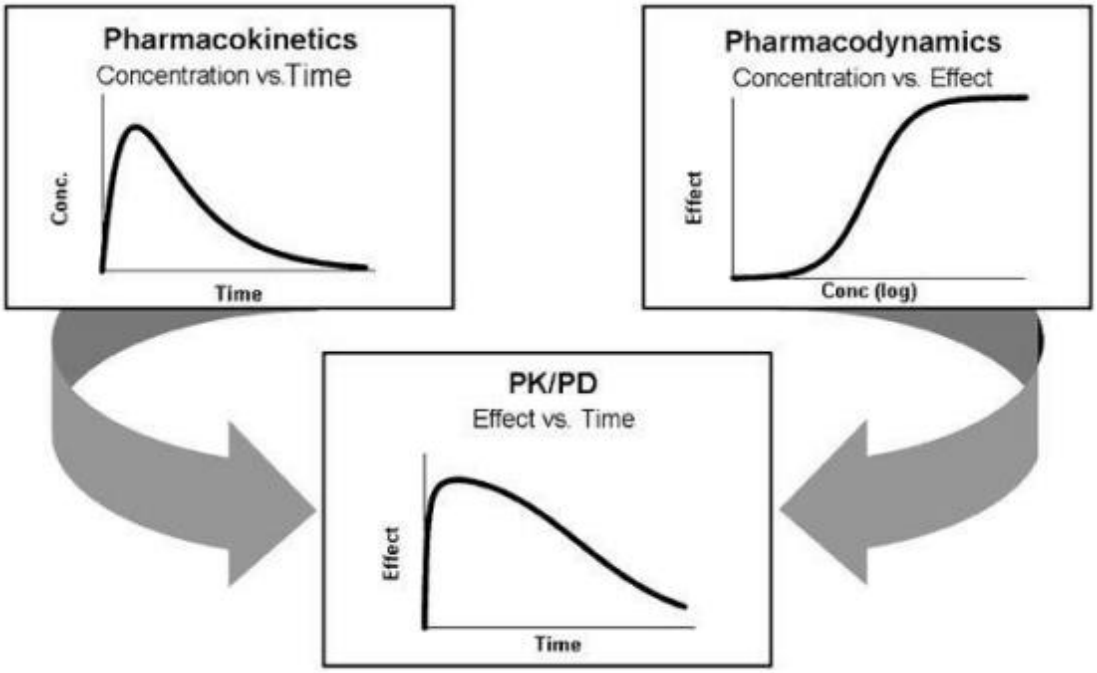


Figure 7. *Schéma de synthèse de la modélisation PKPD. D'après (52)*

La modélisation mathématique est utilisée pour étudier la PK et la PD des antibiotiques utilisés seuls ou en combinaison et permet de caractériser la croissance bactérienne, l'effet des antibiotiques et l'émergence de résistance au cours du temps. Ces modèles mathématiques sont régis par des équations et permettent de représenter les processus biologiques étudiées de manière simplifiée. Néanmoins, ces équations peuvent intégrer des informations précises sur des mécanismes biologiques tels que la mutation ou l'expression d'un gène, les mécanismes d'action des antibiotiques ou le cycle de vie de la bactérie. Ces modèles sont alors qualifiés de modèles semi-mécanistiques. Les modèles PKPD sont

développés à partir des données observées et peuvent ensuite être utilisés pour simuler d'autres scénarios qui n'ont pas été étudiés expérimentalement (par exemple pour prédire l'effet d'une nouvelle dose afin d'identifier des schémas posologiques optimaux). Cet outil peut aussi servir d'aide à la décision et permettre une utilisation plus rationnelle des antibiotiques (53). En règle générale, un modèle PKPD se décompose en sous-modèles interdépendants, présentés ci-dessous de manière non exhaustive. La revue de Nielsen *et al.* (54) décrit l'ensemble de ces modèles de manière approfondie.

4.1. Modèle bactérien

Le modèle bactérien décrit **la croissance et la mort naturelle des bactéries** au cours du temps. De manière simplifiée, une population bactérienne peut être considérée comme un ensemble homogène de bactéries B, capables de se multiplier selon une constante de croissance (k_{growth}) et meurent naturellement selon une constante de mort (k_{death}). En général, on ne distingue pas ces deux phénomènes expérimentalement et seule la résultante, aussi appelée croissance apparente ($k_{net} = k_{growth} - k_{death}$), est observée. Dans les modèles *in vitro* et *in vivo*, les bactéries se développent de manière exponentielle jusqu'à atteindre un nombre de bactérie stationnaire lié à une saturation du milieu. Cette dynamique peut être modélisée à l'aide d'une fonction logistique telle que (55) :

$$\frac{dB}{dt} = k_{net} \times (1 - \frac{B}{B_{max}}) \times B \qquad \text{Equation (1)}$$

Où B_{max} ($\log_{10}$ CFU/mL) représente la concentration maximale de bactéries supportée dans le milieu.

4.2. Modèle pharmacocinétique

Le modèle PK décrit **les variations de concentrations d'antibiotique au cours du temps**. Cependant, dans le système traditionnel de time-kill curve (présenté dans le paragraphe 1.5.3), les concentrations d'antibiotique sont considérées comme étant constantes lorsque les molécules sont stables. Dans le cas contraire, il est possible d'intégrer des processus de dégradation (naturelle ou due à des β-lactamases) dans le modèle.

4.3. Modèle d'effet

Le modèle d'effet régit **la relation entre l'effet d'un antibiotique et sa concentration libre**. Le modèle Emax sigmoïde, dont la forme générale est indiquée par l'équation 2, est le modèle le plus fréquemment utilisé et permet de décrire une relation non linéaire entre l'effet d'un antibiotique et sa concentration (40).

$$E = \frac{Emax \times C^{\gamma}}{EC_{50}{}^{\gamma} + C^{\gamma}} \qquad \text{Equation 2}$$

Où $Emax$ représente l'effet maximal de la molécule, C sa concentration, EC_{50} la concentration nécessaire pour atteindre 50% de l'effet maximum et γ le coefficient de sigmoïdicité qui caractérise la pente de la relation.

Selon le mécanisme d'action de l'antibiotique, le modèle d'effet est implémenté de manière différente. Si l'antibiotique inhibe la croissance des bactéries (effet bactériostatique), l'effet portera sur la constante de croissance k_{growth} (Equation 3). Si l'antibiotique induit la mort des bactéries (effet bactéricide), l'effet portera sur la constante de mort k_{death} (Equation 4) et s'ajoute à la mort naturelle des bactéries.

$$\frac{dB}{dt} = k_{growth} \times (1 - E) \times B - k_{death} \times B \qquad \text{Equation 3}$$

$$\frac{dB}{dt} = k_{growth} \times B - k_{death} \times (1 + E) \times B \qquad \text{Equation 4}$$

4.4. Modèle de résistance

Le modèle de résistance permet de décrire l'**émergence de résistance** et les phénomènes de repousse bactérienne. Les deux principaux modèles sont le modèle de **sous-populations** (ou d'hétéro-résistance) et le modèle d'**adaptation**.

Le premier suppose que plusieurs sous-populations de bactéries avec des niveaux de sensibilité différents préexistent dans la population globale (56). Dans ce modèle l'émergence de résistance s'explique de la façon suivante : la sous-population sensible est éliminée tandis que les sous-populations résistantes sont sélectionnées lorsque l'effet de l'antibiotique est insuffisant. Cette différence d'effet se traduit par une diminution de l'effet maximum de l'antibiotique et/ou par une augmentation de son EC_{50} dans les sous-populations résistantes. Ce choix peut être orienté expérimentalement lorsque l'antibiotique est utilisé à fortes concentrations. En effet, si une concentration élevée d'antibiotique permet d'éliminer les bactéries résistantes alors l'effet maximum n'est pas impacté et seule l'EC_{50} est modifiée dans ces populations.

Le second modèle suppose que la population bactérienne se présente comme un ensemble homogène, initialement sensible à l'antibiotique et capable de développer des résistances en présence de ce dernier (57). Ce phénomène peut être modélisé en calculant le pourcentage d'adaptation de la population au cours du temps, à l'aide de deux fractions AR_{off} et AR_{on} représentant respectivement les fractions non adaptée et adaptée de la population. Le passage d'un état à l'autre (Equations 5 et 6) se fait selon une constante de transfert (k_{on} pour le développement de la résistance, k_{off} pour la réversion de la résistance) de façon dépendante ou non de la concentration. *In fine*, l'effet de l'antibiotique est diminué à mesure que la fraction de bactéries adaptées augmente dans la population.

$$\frac{dAR_{off}}{dt} = k_{off} \times AR_{on} - k_{on} \times AR_{off} \qquad \text{Equation 5}$$

$$\frac{dAR_{on}}{dt} = k_{on} \times AR_{off} - k_{off} \times AR_{on} \qquad \text{Equation 6}$$

4.5. Modèle d'effet inoculum

L'**effet inoculum** caractérise une diminution de l'effet des antibiotiques en présence d'un fort inoculum bactérien (58). Ce phénomène a été principalement décrit par une augmentation de la CMI d'un facteur ≥ 8 avec un inoculum élevé (≥ 1.10^7 CFU/mL) par rapport à l'inoculum standard (5.10^5 CFU/mL) (59–61). Cependant, il a aussi été décrit à l'aide de time-kill *in vitro* ayant permis le développement de modèles PKPD dont on distingue deux approches.

La première, suppose un **effet inoculum statique au cours du temps**. Dans ce type de modèle, l'effet des antibiotiques est modifié à l'aide d'une fonction mathématique qui dépend uniquement de l'inoculum de départ. Par exemple, dans l'étude de Bhagunde *et al.* (62), la concentration efficace en pipéracilline C_{eff}, qui détermine son effet bactéricide, diminuait avec l'inoculum de départ $N(0)$ selon le modèle sigmoïde suivant :

$$C_{eff} = C \times \left(1 - \frac{N(0)^Q}{N_{50}^Q + N(0)^Q}\right) \qquad \text{Equation 7}$$

Où C correspond à la concentration de pipéracilline, N_{50} à la densité bactérienne pour laquelle la concentration efficace C_{eff} est égale à la moitié de la concentration C et Q au coefficient de sigmoïdicité de la relation.

De manière similaire, l'effet inoculum d'une souche *A. baumannii* sur la polymyxine B, observé par Akrong *et al.* (63), a été décrit par une augmentation de l'EC_{50} de la molécule aux forts inoculum à l'aide d'une fonction puissance tel que :

$$EC_{50} = EC_{50,med} \times \left(\frac{Inoculum}{6.5}\right)^{\beta} \qquad \text{Equation 8}$$

Où $EC_{50,med}$ correspond à l'EC_{50} de la polymyxine B estimée pour un inoculum bactérien égal à $1.10^{6.5}$ CFU/mL et β au coefficient associé à cet effet inoculum.

A la différence de cette première méthode empirique, une seconde approche plus mécanistique a été proposée. Cette dernière suppose un **effet inoculum dynamique** qui

dépend de l'évolution de la **densité bactérienne au cours du temps**. Bullita *et al.* (64, 65) ont suggéré deux modèles de quorum sensing où toutes les bactéries (sensibles et résistantes) étaient capables de produire et de libérer des molécules de signalisation afin de communiquer entre elles. Dans le premier modèle, une forte concentration de ces molécules signal était responsable de l'effet inoculum en stimulant la perte d'activité de l'autolysine, provoquant ainsi un ralentissement de la vitesse de réplication de *P. aeruginosa* (64). Dans le second modèle (incluant lui aussi l'effet de quorum sensing précédent), les molécules signal induisaient un changement du phénotype des bactéries, favorisant le développement de populations résistantes et l'inhibition de l'effet bactéricide de la colistine (65). Nielsen *et al.* (66) ont aussi utilisé ce principe de changement d'état physiologique des bactéries pour modéliser l'effet inoculum de la ciprofloxacine chez plusieurs souches d'*E. coli*. Dans leur modèle, le passage de l'état sensible à l'état résistant (caractérisé par une constante de transfert k_{SR}), était dépendant de la densité bactérienne B_{TOT} selon un modèle linéaire :

$$k_{SR} = PC \times B_{TOT} \qquad \text{Equation 9}$$

Où PC correspond à la constante de proportionnalité. En conséquence, plus la densité bactérienne était forte, plus le transfert vers l'état résistant était rapide et moins l'antibiotique était efficace.

4.6. Modèle de combinaison

Le **modèle de combinaison** régit l'effet des antibiotiques lorsqu'ils sont utilisés en combinaisons. Il est généralement plus complexe à développer car des interactions potentielles entre les molécules peuvent modifier leurs propriétés PK et/ou PD. Dans le système *in vitro* de time-kill, les interactions PK ne sont pas prises en compte puisque les concentrations d'antibiotiques sont considérées comme constantes au cours du temps. En revanche l'étude des interactions PD entre molécules est un élément essentiel pour le développement des combinaisons.

4.6.1 Additivité, synergie et antagonisme

Pour étudier l'effet de deux antibiotiques utilisés en combinaison, on compare souvent l'effet observé à celui qui est attendu dans le cas où les deux antibiotiques agissent de façon indépendante. Cet effet attendu est défini par l'**hypothèse d'additivité des effets** (*i.e.* en absence d'interaction pharmacodynamique). Les notions de synergie et d'antagonisme, qui caractérisent respectivement un effet supérieur et un effet inférieur à celui attendu sous l'hypothèse d'additivité des effets, sont donc des notions relatives qui dépendent du critère d'additivité. Les deux critères d'additivité principaux établis dans la littérature sont l'**indépendance de Bliss** (67) et l'**additivité de Loewe** (68).

L'indépendance de Bliss suppose que les deux molécules agissent indépendamment l'une de l'autre et que leurs des modes d'action soient différents (67). Pour des concentrations données, l'effet attendu de la combinaison ($E_{attendu(A+B)}$) de deux molécules A et B est défini selon l'Equation 10 :

$$E_{attendu(A+B)} = \left(\frac{E_A}{Emax} + \frac{E_B}{Emax} - \left(\frac{E_A}{Emax} \times \frac{E_B}{Emax}\right)\right) \times Emax \qquad \text{Equation 10}$$

Où E_A correspond à l'effet de la molécule A seule et E_B à celui de la molécule B seule. L'indépendance de Bliss étant inspirée de la notion d'indépendance statistique (69), il est nécessaire d'exprimer les effets E_A et E_B en fraction de l'effet maximum (*i.e.* entre 0 et 1). Dans le cas où les deux molécules A et B ont des effets maximums différents, cette normalisation se fait par rapport à l'effet le plus important.

L'additivité de Loewe repose sur le principe d'équivalence de dose (70) qui suppose que les deux molécules A et B soient capables d'atteindre le même effet maximum et que pour tout effet observé avec la molécule A (à une concentration donnée), il existe une concentration équivalente de la molécule B permettant d'atteindre le même d'effet. Ainsi, une molécule peut être remplacée par l'autre. En absence d'interaction entre les deux molécules, l'additivité de Loewe est donnée par l'équation 11 :

$$\frac{a}{A} + \frac{b}{B} = 1 \qquad \text{Equation 11}$$

Où A et B correspondent aux concentrations de chaque molécule utilisée seule et produisant un même niveau d'effet (par exemple l'EC_{50}), a et b correspondent aux concentrations de chaque molécule utilisée en combinaison et produisant le même niveau d'effet. L'additivité de Loewe permet d'analyser graphiquement les résultats à l'aide d'un isobologramme (71).

Enfin, on peut noter qu'il existe d'autres approches, dont une qui consiste à comparer l'effet observé en combinaison à celui observé avec la molécule seule la plus active. Dans cette situation, la synergie et l'antagonisme sont définis à l'aide d'un seuil d'effet considéré pharmacologiquement significatif.

4.6.2 Modèle général d'interaction pharmacodynamique

Afin d'améliorer l'étude des combinaisons, Wicha *et al.* (72) ont récemment proposé une nouvelle approche basée sur le **modèle général d'interaction pharmacodynamique (GPDI)**. Ce modèle permet de quantifier les changements d'effet des molécules du fait de leurs interactions pharmacodynamiques et d'identifier leur rôle, défini selon les auteurs par les termes « **perpetrator** » et « **victim** ». Le perpetrator désigne la molécule responsable de l'interaction et qui entraîne une modification de l'effet PD de la molécule victime. Le modèle GPDI permet de décrire des interactions monodirectionnelles, pour lesquelles on identifie distinctement un perpetrator et une victime, mais aussi des interactions bidirectionnelles pour lesquelles chaque molécule est à la fois perpetrator et victime. De plus, cette approche est compatible avec les différents critères d'additivité évoqués précédemment.

Afin de caractériser l'effet de l'interaction, le modèle GPDI (en bleu dans les équations 12 et 13) est intégré au modèle d'effet de la molécule victime de sorte à modifier son effet lorsqu'elle est utilisée en combinaison avec le perpetrator. Par exemple, si on considère que 1/ l'effet de la molécule A est régi par un modèle Emax sigmoïde (cf. 4.3.) et que 2/ l'effet maximum de la molécule A (victim) est modifié par une interaction avec la molécule B (perpetrator), alors l'effet de A en combinaison est donné par l'équation suivante :

$$E_A = \frac{\left(Emax_A \times \left(1 + \frac{INT \times C_B{}^{\gamma INT}}{EC50_{INT}{}^{\gamma INT} + C_B{}^{\gamma INT}}\right)\right) \times C_A{}^{\gamma A}}{EC50_A{}^{\gamma A} + C_A{}^{\gamma A}} \qquad \text{Equation 12}$$

Où INT est le paramètre d'interaction et caractérise l'effet maximal de l'interaction (*i.e.* la modification de l'$Emax_A$ par la molécule B). Si INT = 0, il n'y a pas d'interaction entre les deux molécules et l'effet de la combinaison est additif. Si INT < 0, l'interaction est antagoniste car la molécule B induit une diminution de l'$Emax_A$. Si INT > 0, l'interaction est synergique car B induit une augmentation de l'$Emax_A$. $EC50_{INT}$ correspond à la concentration de la molécule B nécessaire pour atteindre 50% de l'effet maximal de l'interaction et γINT est le coefficient de sigmoïdicité de l'interaction.

Si l'interaction porte sur l'EC_{50} de la molécule A, le modèle GPDI est implémenté selon l'équation 13. Dans ce cas, l'interaction est synergique si INT < 0 (car la molécule B induit une diminution de l'$EC50_A$) et antagoniste si INT > 0.

$$E_A = \frac{Emax_A \times C_A{}^{\gamma A}}{\left(EC50_A \times \left(1 + \frac{INT \times C_B{}^{\gamma INT}}{EC50_{INT}{}^{\gamma INT} + C_B{}^{\gamma INT}}\right)\right)^{\gamma A} + C_A{}^{\gamma A}} \qquad \text{Equation 13}$$

Dans le cas d'une interaction bidirectionnelle, le modèle GPDI est ajouté simultanément aux modèles d'effet des deux molécules de manière à ce qu'elles impactent mutuellement leurs effets. De plus, le modèle GPDI peut être simplifié par un modèle à un seul paramètre dans le cas où les données ne permettent pas d'estimer correctement l'ensemble des paramètres INT, $EC50_{INT}$ et γINT. Par ailleurs, les auteurs ont aussi défini une marge d'additivité permettant de conclure à la significativité de l'interaction observée : lorsque la valeur du paramètre d'interaction (INT) est estimée entre -0.5 et 0.5, l'antagonisme ou la synergie n'est pas considérée comme significatif et l'on conclut alors à une interaction additive.

En résumé, le modèle GPDI permet de caractériser divers types d'interactions et constitue une approche flexible et adaptée à l'étude des combinaisons d'antibiotiques. Cependant, la modélisation PKPD des antibiotiques seuls et en combinaison nécessite une phase expérimentale préalable et indispensable afin de recueillir les données qui permettront de développer ces modèles.

5. Méthodes expérimentales pour l'étude *in vitro* des combinaisons d'antibiotiques

5.1. Checkerboard

5.1.1. Principe général

La méthode traditionnelle pour l'étude des combinaisons d'antibiotiques, illustrée Figure 8, consiste à réaliser des expériences de « **checkerboard** » en microplaque 96 puits (73, 74). Dans cette expérience, un inoculum bactérien (généralement identique à celui des CMI soit 5.10^5 CFU/mL) est mis au contact d'une gamme de concentrations de deux antibiotiques utilisés en combinaison (généralement 8 à 10 niveaux de concentrations). Des dilutions sérielles au demi de chaque antibiotique permettent d'obtenir le plan de plaque de la Figure 8 où chaque puits correspond à une unique combinaison des deux molécules testées. La plaque est ensuite incubée 16 à 20 h à 37°C puis la croissance bactérienne est évaluée par lecture de densité optique (turbidité à l'œil nu et/ou au spectrophotomètre à 600 nm). Le **Fractional Inhibibition Concentration Index (FICI)** est ensuite calculé pour chaque puits où la croissance bactérienne est inhibée, selon la formule suivante :

$$FICI = \frac{A}{MIC_A} + \frac{B}{MIC_B} = \frac{CMI\ de\ A\ en\ combinaison}{CMI\ de\ A\ seul} + \frac{CMI\ de\ B\ en\ combinaison}{CMI\ de\ B\ seul} \qquad \text{Equation 14}$$

La combinaison est évaluée par la valeur du FICI afin de conclure sur la nature de l'interaction observée entre les molécules et s'interprète de la façon suivante (73, 75):

- la combinaison est synergique si le FICI est inférieur à 0.5,
- la combinaison est additive si le FICI est strictement compris entre 0.5 et 4,
- la combinaison est antagoniste si le FICI est supérieur à 4.

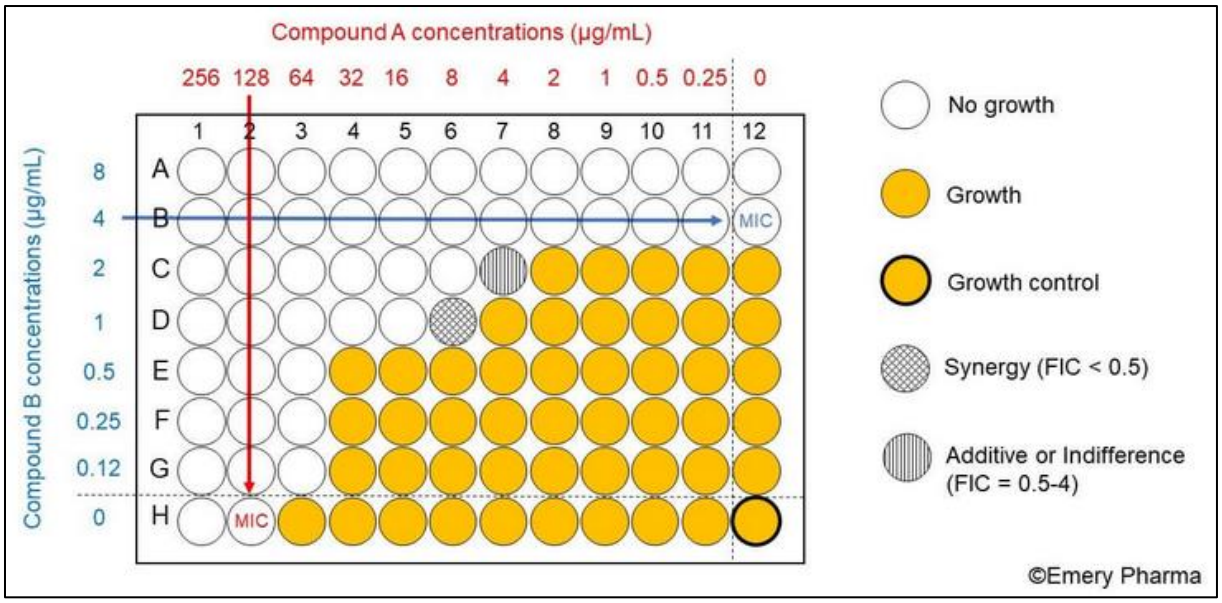


Figure 8. *Illustration de checkerboard. L'antibiotique A est dilué en série de la colonne 1 à 11 (de 256 à 0.25 mg/L) et l'antibiotique B de la ligne A à G (de 8 à 0.125 mg/L). La CMI de l'antibiotique A est mesurée dans la ligne H (128 mg/L) et celle de l'antibiotique B dans la colonne 12 (4 mg/L). Pour vérifier la croissance des bactéries, un contrôle positif est réalisé dans le puits H-12. Tous les autres puits correspondent à une unique combinaison des antibiotiques A et B. La croissance bactérienne est visible dans les puits représentés en jaune et le FICI est déterminé à l'aide des concentrations qui inhibent cette croissance. D'après Emery Pharma (https://emerypharma.com/biology/antimicrobial-synergy-study-checkerboard-assay).*

5.1.2. Intérêt et limites

L'intérêt majeur des checkerboards réside dans leur simplicité de mise en œuvre. Elles donnent une information sommaire sur l'efficacité potentielle d'une combinaison face à une souche bactérienne et sont particulièrement adaptées dans le cadre de screening visant à évaluer un grand nombre d'antibiotiques et/ou souches.

Néanmoins, cette approche dérivée de la CMI (que l'on pourrait d'ailleurs qualifier de « CMI en combinaison ») présente des faiblesses qui limitent fortement l'interprétation des résultats. La classification de la combinaison repose sur une unique mesure à un temps donné, qui ne prend pas en compte l'émergence de résistance au cours du temps (76). De plus, elle se base sur un critère de jugement discret (croissance visible ou non des bactéries dans chaque puits) qui ne renseigne que l'effet bactériostatique de la combinaison, autrement dit sa capacité à maintenir la densité bactérienne sous un seuil de détection. On note aussi qu'il existe plusieurs manières de reporter le FICI pouvant conduire à une interprétation

discordante des résultats (73). Enfin, la mesure de la CMI (de l'antibiotique seul ou de la combinaison) est généralement associée à une imprécision relative de ± 1 dilution du fait de la dilution en série. Ainsi, pour une souche dont la vraie CMI serait 1 mg/L, un résultat de 0.5 mg/L ou de 2 mg/L serait jugé acceptable. Cette imprécision de mesure se répercute donc sur le calcul du FICI et sur son interprétation. Par ailleurs, Rand *et al.* (77) ont évalué la reproductibilité des checkerboards et ont montré que la classification de la combinaison était discordantes pour 25% des réplicas. D'après leurs recommandations, un minimum de 5 réplicats dont au moins 80% donnent un résultat identique est nécessaire pour conclure sur la nature de l'interaction.

En résumé, les checkerboards constituent une approche pratique mais insuffisante pour caractériser avec précision l'effet des antibiotiques en combinaison.

5.2. Checkerboard dynamique

5.2.1. Principe général

Afin d'améliorer la précision du checkerboard traditionnel, une méthode alternative qualifiée de « **checkerboard dynamique** » a été développée (78–80). La préparation des microplaques se fait de manière analogue mais la croissance bactérienne est mesurée après la période d'incubation par dénombrement des CFU (Colony Forming Unit qui caractérise le nombre de bactéries viables dans l'échantillon) plutôt que par évaluation de la turbidité. Pour ce faire, les bactéries sont prélevées dans chacun des puits, ensemencées sur gélose MHA (Mueller Hinton Agar), incubées selon les conditions de croissance de la bactérie puis les CFU sont dénombrées.

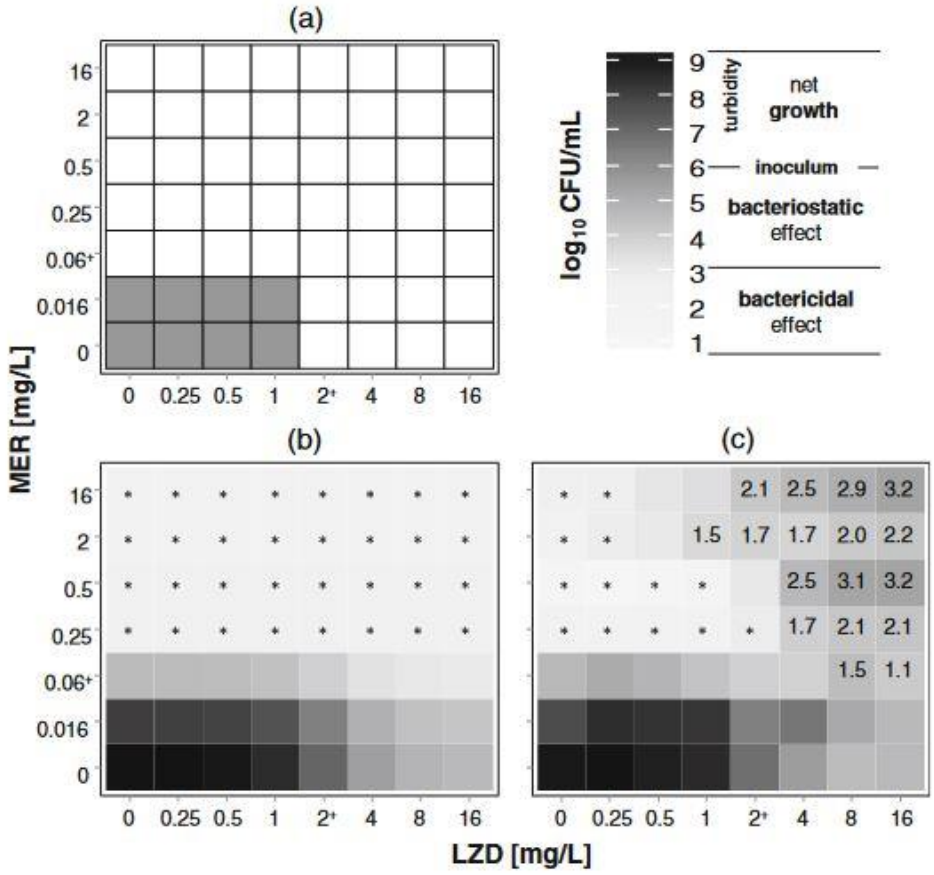


Figure 9. *Checkerboard dynamique et analyse de surface. (a) Checkerboard traditionnel, la croissance bactérienne est indiquée dans les puits en gris où la turbidité est visible. (b) Réponse de surface attendue, calculée sous l'hypothèse d'additivité des effets définie par l'indépendance de Bliss. La heat map montre le nombre de CFU (log_{10} CFU/mL) attendu pour chaque combinaison (plus la couleur tend vers le noir, plus la croissance bactérienne est élevée) et (*) indique un effet bactéricide correspondant à une réduction de la charge bactérienne ≥ 3 log_{10} CFU/mL par rapport à l'inoculum. (c) Réponse de surface expérimentale. Les différences significatives entre les CFU observées et les CFU attendues sous l'hypothèse d'additivité sont reportées et montrent un antagonisme entre le méropénème et le linézolide (par exemple, une augmentation de 3.2 log_{10} CFU/mL par rapport aux CFU attendues est observé pour la combinaison de MER = 16 mg/L + LZD = 16 mg/L). D'après (80)*

5.2.2. Intérêt et limites

Les checkerboards dynamiques nécessitent davantage de ressources pour mesurer un critère de jugement quantitatif qui indique la variation du nombre de CFU par rapport à l'inoculum. Ainsi, il est possible d'évaluer l'effet bactéricide de la combinaison (en plus de son effet bactériostatique) qui est atteint lorsqu'une diminution des CFU supérieure à 3 log est observée (80). De plus, l'effet de la combinaison peut être décrit par analyse de surface, illustrée Figure 9, qui consiste à comparer l'effet observé (CFU_{obs}) à l'effet attendu sous l'hypothèse d'additivité des effets (CFU_{add} théorique en absence d'interaction PD). Cette

analyse permet de caractériser l'effet de la combinaison de manière plus fiable en montrant des variations significatives de CFU (synergie lorsque les CFU_{obs} sont inférieures aux CFU_{add} ou antagonisme dans le cas inverse). Dans leur étude, Wicha et al. (80) ont ainsi mis en évidence à l'aide de checkerboards dynamiques l'effet antagoniste du linézolide sur le méropènème, particulièrement aux concentrations supérieures à la CMI. Globalement, l'effet bactéricide du méropénème était réduit et l'effet de la combinaison tendait vers celui du linézolide utilisé seul. A contrario, leurs résultats de checkerboard évalués par turbidité ne montraient pas d'interaction entre les deux molécules.

En résumé, le checkerboard dynamique apporte une amélioration par rapport au checkerboard traditionnel et permet une meilleure caractérisation de l'effet des antibiotiques en combinaison mais partage les mêmes limites : celles d'évaluer l'effet d'une combinaison à un temps donné et de ne pas prendre en compte l'émergence de résistance au cours du temps.

5.3. Time-Kill Curve

5.3.1. Principe général

L'effet antibactérien d'un antibiotique (ou d'une combinaison) peut être déterminé par l'intermédiaire de **Time-Kill Curve (TKC)** (81). Cette expérience *in vitro* largement répandue consiste à exposer un inoculum bactérien à différentes concentrations d'antibiotique et à mesurer le nombre de CFU de manière répétée au cours du temps. Les résultats sont représentés graphiquement en traçant le nombre de CFU en fonction du temps (Figure 10) ce qui permet de comparer les profils obtenus aux différentes concentrations testées. Ces courbes apportent un aperçu détaillé de l'effet des antibiotiques au cours du temps.

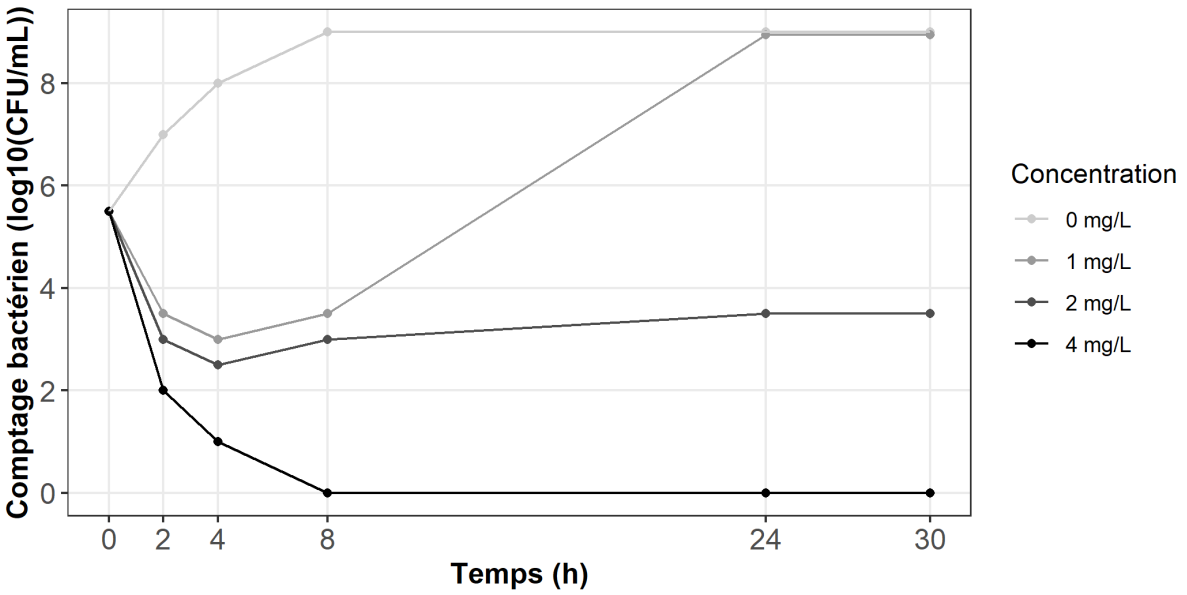


Figure 10. *Exemple de profils typiques observés en TKC pour un antibiotique seul. La croissance bactérienne est vérifiée en absence d'antibiotique (contrôle positif). A 1 mg/L, une décroissance initiale suivie d'une repousse similaire au contrôle est observée. A 2 mg/L, l'effet est partiellement bactéricide. A 4 mg/L, l'antibiotique permet une éradication totale des bactéries. Créé avec R (82)*

5.3.2. Intérêt et limites

Par opposition aux checkerboards, les TKC permettent de récolter des données quantitatives longitudinales (*i.e.* CFU au cours du temps). Ces données peuvent ensuite servir à développer des modèles pharmacocinétiques/pharmacodynamiques permettant de décrire la croissance bactérienne, l'effet des antibiotiques et l'émergence de résistance au cours du temps (cf. paragraphe 4). De plus, selon l'objectif recherché, cette expérience permet de concevoir des protocoles flexibles afin d'intégrer des données mécanistiques au modèle pour caractériser précisément les phénomènes observés.

Bien que faciles à mettre en œuvre, les TKC nécessitent davantage de ressources en particulier lorsque le nombre de molécules et/ou de souches augmente. Alors que les checkerboards permettent d'associer simplement des antibiotiques dans une large gamme de concentrations (selon un plan factoriel 2 à 2), le nombre de conditions à tester en TKC peut devenir très grand si l'on suit le même plan factoriel. Par conséquent, l'étude des

combinaisons d'antibiotiques à l'aide de TKC nécessite de sélectionner les conditions expérimentales à tester.

En résumé, contrairement aux checkerboards, l'expérience de TKC est une approche *in vitro* qui permet d'évaluer l'effet des antibiotiques (seuls et en combinaison) au cours du temps et de manière quantitative, mais la problématique réside dans le choix des conditions expérimentales à tester.

5.4. Designs de TKC pour l'étude des combinaisons d'antibiotiques

5.4.1. Design factoriel empirique

Il n'existe pas de protocole standardisé pour l'étude des combinaisons en TKC. De manière traditionnelle, plusieurs niveaux de concentrations dérivés de la CMI de chaque antibiotique sont associés selon un **plan factoriel** plus ou moins complet et inspiré des checkerboards. Ces choix, parfois arbitraires, peuvent conduire à des designs peu informatifs qui ne permettent pas de caractériser correctement l'effet des combinaisons, notamment lorsque le nombre de concentrations étudié est faible. Face à cette problématique, divers designs alternatifs ont été proposés.

5.4.2. Design factoriel basé sur un pourcentage d'effet

Précédemment, Chen et al. (83) ont développé un design de TKC optimisé[1] pour l'étude des interactions PD entre antibiotiques utilisés contre *Mycobacterium tuberculosis*. Le design proposé par les auteurs repose sur un choix rationnel des niveaux de concentrations, permettant d'atteindre respectivement 20% (EC_{20}), 50% (EC_{50}) et 80% (EC_{80}) de l'effet

[1] Dans cette étude, le design proposé par les auteurs ne résulte pas d'une optimisation au sens strict du terme mais d'un choix rationnel des concentrations à combiner.

maximum exercé par la molécule utilisée seule. Ces concentrations, sélectionnées à partir de la relation dose-effet préalablement établie pour chaque molécule, permettent de capturer efficacement les changements d'effet de chaque antibiotique. Ce nouveau design, incluant au total 16 conditions dont 1 contrôle positif, 3 niveaux de concentration pour chaque molécule utilisée seule (respectivement à EC_{20}, EC_{50} et EC_{80}) et 9 combinaisons, a ensuite été comparé à deux designs traditionnels, le premier complet (incluant 100 conditions au total) et le second réduit (incluant également 16 conditions) (Figure 11). Pour évaluer la capacité de chaque design à correctement estimer les paramètres d'interaction du modèle GPDI (cf. paragraphe 4.6), les auteurs ont calculé le biais relatif et l'imprécision relative d'estimation des paramètres d'interaction. Leurs résultats ont montré que ces critères étaient minimisés avec le design conventionnel complet qui génère davantage de données, mais que le design optimisé était supérieur au design conventionnel réduit pour une charge de travail équivalente. De plus, le design optimisé était capable de classer correctement le type d'interaction (*i.e.* additivité, synergie, antagonisme ou asymétrie) de manière similaire au design conventionnel complet.

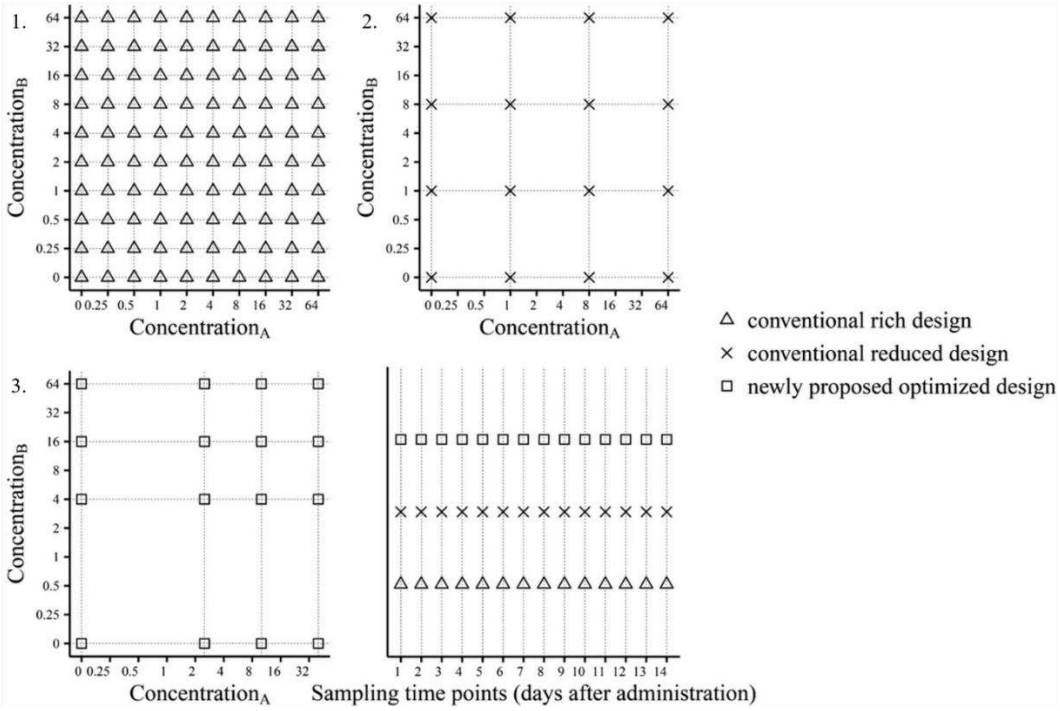


Figure 11. *Illustration des designs étudiés par Chen et al. 1. Design conventionnel complet (1 contrôle positif + 9 niveaux de concentrations de 0.25 à 64 mg/L par molécule seule + 81 combinaisons). 2. Design conventionnel réduit (1 contrôle positif + 3 niveaux de concentrations (1, 8 et 64 mg/L) par molécules seule + 9 combinaisons). 3. Nouveau design optimisé (1 contrôle positif + 3 niveaux de concentrations (EC_{20}, EC_{50} et EC_{80}) par molécule seule + 9 combinaisons). Les temps de prélèvements sont identiques pour les trois designs (1x / jour pendant 14 jours). D'après (83)*

En résumé, un choix rationnel des conditions expérimentales apporte suffisamment d'information pour bien caractériser l'effet des antibiotiques utilisés en combinaison, malgré une réduction de la charge de travail.

5.4.3. Design à ratio constant

Le design à ratio constant (aussi désigné ray design), illustré par la Figure 12, consiste à combiner deux molécules de sorte à ce que les proportions entre ces deux molécules restent toujours constantes (84, 85). La combinaison est administrée comme s'il s'agissait d'un nouveau composé en préparant un mélange Z tel que :

$$Z = fA + (1 - f)B \qquad \text{Equation 15}$$

Où A et B représentent les concentrations estimées de chaque molécule permettant d'atteindre un niveau d'effet attendu (généralement l'EC_{50} de la molécule utilisée seule, permettant d'atteindre 50% de son effet maximum) et f représente la fraction (entre 0 et 1) de chaque molécule qui est ajoutée au mélange. L'utilisation de ce design repose sur le principe d'additivité défini par Loewe (cf. paragraphe 4.6.1) et peut s'interpréter à l'aide d'un isobologramme (86). En absence d'interaction PD entre les deux molécules, le mélange Z produit le même effet que celui attendu avec l'une ou l'autre des molécules utilisées seule.

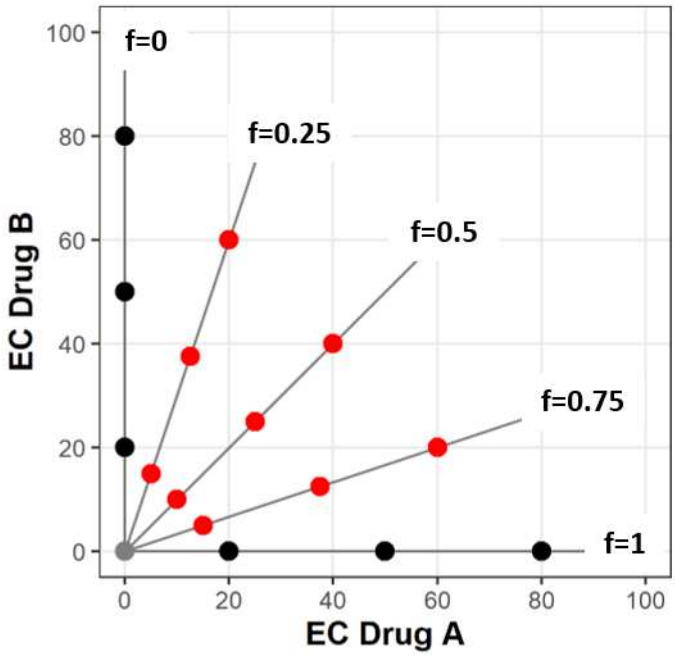


Figure 12. *Illustration du design à ratio constant. Dans cet exemple, 5 raies (f = {0, 0.25, 0.5, 0.75, 1}) et 3 concentrations de chaque molécule (EC_{20}, EC_{50} et EC_{80}) ont été choisies. Lorsque f = 0, la molécule B est administrée seule et lorsque f = 1, la molécule A est administrée seule. Lorsque f = 0.25, 0.5 ou 0.75, les proportions de A par rapport à B sont respectivement de 1:3, 1:1 ou 3:1 et restent inchangées quelques soient les concentrations administrées. Créé avec R.*

Plusieurs arguments en faveur de ce design expérimental ont été avancés (84). Tout d'abord, il permet de respecter les proportions des formulations pharmaceutiques des médicaments, qui sont généralement standardisées pour chaque molécule[2]. Il a aussi été constaté que la synergie, lorsqu'elle se produit, était fonction des proportions utilisées en combinaison. Ce design permettrait donc d'identifier plus facilement les proportions qui sont synergiques de celles qui sont additives, facilitant ainsi l'analyse des données (84). En associant chaque antibiotique de manière proportionnelle, le design à ratio constant permet d'obtenir un ensemble de combinaisons différent du design factoriel afin de cibler des gammes de concentrations théoriquement plus intéressantes à étudier. La charge de travail expérimental et la quantité de données produite sont déterminées par le nombre de raies et de concentrations.

[2] A titre d'exemple, la formulation ZAVICEFTA contient 2 g de ceftazidime et 0.5 g d'avibactam, en proportions fixes.

En résumé, divers designs expérimentaux ont été proposés pour étudier les combinaisons d'antibiotiques. Néanmoins, quel que soit le design expérimental envisagé, une question essentielle doit être soulevée : comment concevoir cette expérience ? En théorie, il existe une infinité de combinaisons possibles (ou du moins un très grand nombre) (87), mais en pratique, on va généralement sélectionner de façon plus ou moins empirique des concentrations proches de la CMI. La modélisation PKPD peut aider à apporter une réponse rationnelle à cette question. En effet, les concentrations d'antibiotiques à tester peuvent être sélectionnées à l'aide de méthode d'optimisation de design afin d'obtenir les données les plus informatives possibles pour décrire précisément l'effet des antibiotiques utilisés en combinaison.

6. Optimisation de design pour l'étude des combinaisons d'antibiotique

6.1. Principe de l'optimisation de design

Le design expérimental détermine la quantité d'information apportée par une étude et impacte la précision d'estimation des paramètres du modèle (88, 89). Pour obtenir plus d'information, le design expérimental peut être enrichi en augmentant simplement le nombre d'observations mais cette stratégie s'accompagne nécessairement d'une augmentation des coûts (budgétaires et humains) de l'expérience. Une autre stratégie permet de maximiser l'information obtenue sans en augmenter les coûts (voire même en les réduisant). Il s'agit de l'optimisation de design, dont le principe est illustré par la Figure 13. L'optimisation de design, intervient en amont de la phase expérimentale, au moment de concevoir le protocole expérimental. Son but est de déterminer les conditions expérimentales à tester (posologies et modalités d'administration, temps de prélèvement, nombre d'individus ou de groupes etc.) pour récolter des données qui apportent un maximum d'information afin d'estimer correctement les paramètres d'un modèle (*i.e.* sans biais et avec une précision maximale). Le

meilleur design expérimental peut ainsi être identifié, parmi l'ensemble des designs possibles, à l'aide de cette méthode et en tenant compte des contraintes de l'étude. En comparaison, un design non optimisé implique de recueillir une plus grande quantité de données pour estimer les paramètres du modèle avec la même précision.

En optimisation de design, plusieurs éléments doivent être définis *a priori* (90):

1. **Le vecteur des paramètres expérimentaux**, qui permet de définir le design initial ainsi que les paramètres à optimiser et leurs éventuelles contraintes (par exemple les concentrations d'antibiotiques à tester et les temps de mesure des CFU dans le cadre d'une TKC).

2. **Le vecteur des paramètres du modèle PKPD**, qui comprend les valeurs des paramètres typiques, la variabilité résiduelle et éventuellement la variabilité interindividuelle ou inter-occasion. Le modèle doit permettre de décrire le phénomène étudié de manière adéquate. Cette connaissance *a priori* peut être obtenue à l'aide d'expériences préliminaires ou de données de la littérature. Enfin, il est important de préciser que le résultat d'une optimisation est dépendant du modèle spécifié *a priori* (91).

3. **Le critère d'optimisation**, qui permet de faire le lien entre la quantité d'information apportée par les données et la variance des paramètres du modèle. En effet, maximiser l'information revient à minimiser la variance. Le critère le plus fréquemment utilisé en optimisation de design est le déterminant de la matrice d'information de Fisher, aussi désigné critère de D-optimalité (92), qui sera présenté ultérieurement dans le paragraphe 6.3.

Lorsqu'on optimise les paramètres d'un design expérimental, on cherche les conditions expérimentales qui maximisent l'information apportée par les données afin d'estimer les paramètres du modèle pré-spécifié avec la plus grande précision possible (dit autrement, on cherche à minimiser la variance d'estimation des paramètres), ce qui revient à maximiser la valeur du critère d'optimisation. En pratique, la détermination du design optimal s'effectue via une recherche itérative des paramètres expérimentaux à l'aide d'un algorithme et la précision d'estimation des paramètres du modèle est évaluée par l'erreur type relative (RSE pour Relative Standard Error), exprimée en %. Les RSE sont calculés à partir des SE (Standard Error) qui sont eux-mêmes calculés à partir de la matrice d'information de Fisher.

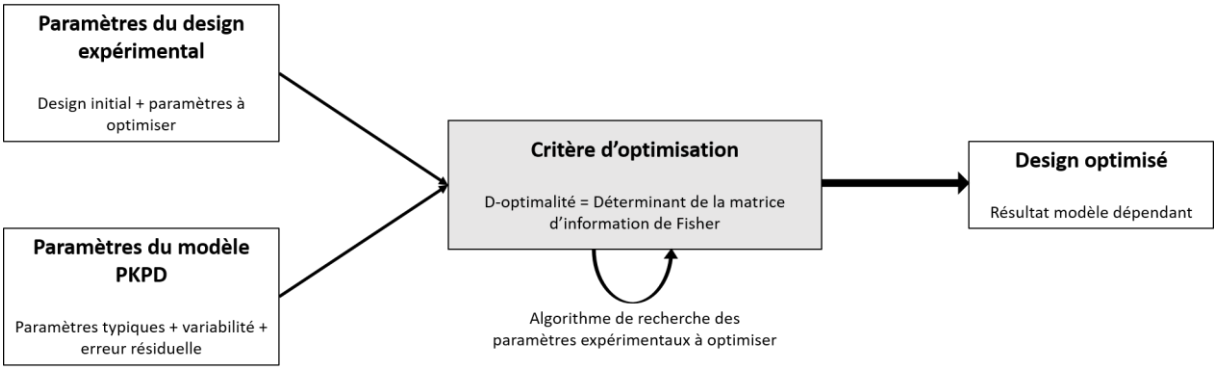


Figure 13. *Représentation schématique de l'optimisation de design. Les conditions expérimentales ainsi que le modèle PKPD sont définis à priori. Le design initial est d'abord évalué à l'aide du critère d'optimisation. On va ensuite, à l'aide d'un algorithme, rechercher de manière itérative les paramètres expérimentaux qui maximisent la valeur de ce critère. Finalement le design optimal est obtenu lorsque la convergence de l'algorithme est achevée (i.e. lorsqu'il n'est plus possible d'améliorer la valeur du critère d'optimisation). Les SE des paramètres sont ensuite calculés pour évaluer la capacité du design optimisé à produire des estimations plus précises que le design initial. Créé avec PowerPoint.*

6.2. Matrice d'information de Fisher

R.A. Fisher a été le premier à démontrer que l'information contenue dans un jeu de données était limitée et qu'elle dépendait du design expérimental (88). Cette information peut être quantifiée à l'aide de la matrice d'information de Fisher (FIM) et permet de calculer la variance d'estimation des paramètres. En effet, l'inégalité de Cramer – Rao (93, 94) stipule que l'inverse de la FIM correspond à la borne inférieure de la matrice de variance-covariance (COV) de tout estimateur sans biais (90, 95) (Equation 16).

$$FIM^{-1}(q,\theta) \leq COV(q,y,\theta) \qquad \text{Equation 16}$$

Où q correspond aux éléments en lien avec le protocole expérimental, θ aux paramètres du modèle et y aux données observées.

En conséquence, les variances et covariances des paramètres θ du modèle peuvent être estimées à partir de l'inverse de la FIM et les SE sont ensuite obtenus en calculant la racine carrée de la variance des paramètres afin d'évaluer la qualité d'estimation des paramètres. Cette propriété de l'inégalité de Cramer – Rao est essentielle pour l'optimisation de design car elle suggère que les paramètres expérimentaux doivent être choisis de manière à ce que la FIM soit maximale (ou que l'inverse de la FIM soit minimale) (90).

Cependant, on note qu'il n'existe pas de solution analytique pour les modèles non linéaires à effets mixtes, et le calcul de la FIM doit reposer sur des approximations (90, 96).

La FIM est définie comme l'opposé de l'espérance ($-E_y$) de la matrice des dérivées partielles secondes de la log-vraisemblance par rapport aux paramètres du modèle, aussi appelée matrice Hessienne $H(\theta)$, telle que :

$$FIM = -E_y[H(\theta)] = -E_y\left[\frac{d^2}{d\theta^2}\log L_y(\theta)\right] \qquad \text{Equation 17}$$

Où L_y correspond à la vraisemblance des données y sachant les paramètres θ du modèle. Plusieurs méthodes permettent d'approximer la FIM, et l'on distingue principalement les méthodes de linéarisation FO (First Order) ou FOCE (First Order Conditional) et l'approximation stochastique (algorithme SAEM pour stochastic approximation expectation-maximization) (97).

6.3. Optimisation de design par méthode de D-optimalité

Comme évoqué précédemment, l'optimisation de design consiste à rechercher les meilleurs paramètres expérimentaux, c'est-à-dire ceux qui maximisent la matrice d'information de Fisher pour un modèle donné. Cependant, le problème de maximisation de la FIM (ou de minimisation de la variance) peut être compliqué à résoudre en pratique car il revient à optimiser une matrice. A la place, on utilise une fonction qui résume la FIM en un nombre scalaire, correspondant au critère d'optimisation, et que l'on cherche à maximiser. Le critère d'optimisation le plus utilisé est le critère de D-optimalité (87, 90, 91) et consiste à maximiser le déterminant de la FIM.

$$q_{D-opt} = \arg\max_q |FIM(q,\theta)| \qquad \text{Equation 18}$$

Dans certaines situations il peut être pertinent de définir un ensemble de S paramètres (parmi tous les paramètres du modèle) pour lesquels on souhaite maximiser leur précision d'estimation. Les autres paramètres (NS) ne sont pas considérés comme intéressants. Dans ce

cas, on utilise le critère de Ds-optimalité (98, 99) afin de minimiser la variance pour un sous-ensemble de paramètre du modèle tel que :

$$q_{Ds-opt} = \arg\max_{q} \frac{|FIM(q,\theta)|}{|FIM_{NS}(q,\theta)|} \qquad \text{Equation 19}$$

Où le numérateur correspond au déterminant de la FIM calculé avec tous les paramètres du modèle et le dénominateur correspond au déterminant de la FIM calculé sans les paramètres d'intérêt.

En résumé, l'optimisation de design peut aider à améliorer la conception des protocoles en identifiant les meilleures conditions à tester expérimentalement, afin de générer des données qui apportent un maximum d'information. Cependant, le design obtenu après optimisation repose sur une hypothèse forte selon laquelle le modèle est bien ajusté aux données. Par conséquent, un design optimal pour un modèle donné peut ne pas être adapté pour un autre modèle. Pour cette raison, il est important d'évaluer ses performances et sa robustesse.

6.4. Evaluation de design optimisé

Pour comparer les performances d'un design q^* par rapport au design de référence q, on calcule l'efficience qui représente l'augmentation ou la réduction du coût du design q^* pour obtenir la même information que le design q. A noter que cette mesure dépend du critère d'optimisation utilisé. Dans le cadre de la D-optimalité, l'efficience est définie par l'équation 20 (90) et correspond au rapport des déterminants des FIM calculés entre les designs q^* et q, tel que :

$$D_{efficiency} = \left(\frac{|FIM(q^*,\theta)|}{|FIM(q,\theta)|} \right)^{\left(\frac{1}{p}\right)} \qquad \text{Equation 20}$$

Où p correspond au nombre de paramètres du modèle (ou au nombre de paramètres d'intérêt S dans le cadre de la Ds-optimalité).

Une autre manière d'évaluer les performances d'un design consiste à réaliser des simulations/ré-estimations (SSE pour Stochastic Simulation and Estimation) des paramètres du modèle[3]. Dans un premier temps, des résultats d'expériences réalisées selon le design optimisé q^* (ou le design de référence q) sont simulés à l'aide d'un modèle supposé vrai (généralement le même modèle que celui spécifié *a priori* pour optimiser le design). Puis dans un second temps, les paramètres du modèle sont ré-estimés à partir des données simulées avec le design q^* (ou q). Finalement, différentes mesures de biais peuvent être calculées pour vérifier que les paramètres ne sont pas biaisés par rapport à leur vraie valeur (*i.e.* ils doivent être proches de ceux du modèle d'entrée), ainsi que les SE des paramètres pour s'assurer que ces derniers sont correctement estimés à partir du design expérimental considéré. A noter que cet outil peut aussi être utilisé pour évaluer la robustesse du design expérimental. En effet, il est possible définir un ou plusieurs modèles alternatifs dont on va ré-estimer les paramètres à partir des mêmes données simulées afin d'évaluer les performances du design lorsque d'autres modèles sont utilisés.

L'optimisation de design constitue un outil particulièrement adapté au développement de protocoles de TKC *in vitro* (100). En effet, ces expériences peuvent nécessiter d'importantes ressources notamment pour l'étude des combinaisons d'antibiotiques. Dans le cadre de l'optimisation de design, les SE sont utilisés pour comparer les performances entre designs expérimentaux (*i.e.* la qualité d'estimation des paramètres est-elle comparable entre deux designs ?). Dans le paragraphe suivant, nous verrons que le SE sont utilisés pour évaluer la qualité et la fiabilité des prédictions d'un modèle et qu'il existe plusieurs méthodes pour les calculer.

[3] Cette méthode a été utilisée pour évaluer le design optimal présenté dans l'article 1 (paragraphe 9).

7. Evaluation de l'incertitude d'estimation des paramètres

7.1. Incertitude des paramètres

Lorsqu'on estime les paramètres d'un modèle à partir des données, on évalue aussi l'incertitude autour de ces estimations (101). Cette incertitude est généralement reportée à l'aide de l'erreur type relative, notée RSE (pour relative standard error) et exprimée en %. Les RSE traduisent la précision d'estimation des paramètres du modèle. L'incertitude des paramètres d'un modèle dépend essentiellement des données observées et du modèle lui-même. Ainsi, des données riches et de bonne qualité, décrites à l'aide d'un modèle adéquat, permettront d'obtenir des RSE faibles. Par convention, on considère que les paramètres sont bien estimés lorsque les RSE sont inférieurs à 30% pour les effets fixes et de l'ordre de 25% pour la variabilité résiduelle (96).

Prendre en compte l'incertitude d'estimation des paramètres est essentiel pour juger la fiabilité d'un modèle (101), notamment lorsque ce dernier est ensuite utilisé pour simuler d'autres scénarios qui n'ont pas été testés expérimentalement. En effet, ces incertitudes d'estimation vont se propager et impacter les résultats des prédictions (102). Un modèle dont les paramètres sont bien estimés (*i.e.* avec des RSE faibles) décriera correctement les données observées et permettra de réaliser des prédictions avec un faible degré d'incertitude. A l'inverse, un modèle dont les paramètres sont estimés avec une forte incertitude peut conduire à des simulations inexactes (103).

Comme vu précédemment, les TKC *in vitro* apportent une information riche mais nécessitent davantage de ressources, notamment pour l'étude des combinaisons d'antibiotiques. Par conséquent, les données disponibles pour développer le modèle sont limitées. De plus, compte tenu de la complexité des modèles PKPD utilisés pour décrire les phénomènes observés, en particulier lorsque ces modèles intègrent des données mécanistiques, certains paramètres peuvent être estimés avec de larges incertitudes et le risque que les prédictions du modèle soient erronées augmente (101). Pour cette raison, il est important d'évaluer l'impact de ces incertitudes sur les prédictions du modèle.

Il existe plusieurs méthodes pour calculer l'incertitude d'estimation des paramètres, chacune présentant ses avantages et ses limites, présentées ci-dessous de manière non exhaustive.

7.2. Matrice de covariance asymptotique

La méthode la plus rapide et la plus répandue pour calculer les SE des paramètres d'un modèle non linéaire à effet mixte consiste à utiliser la matrice de variance-covariance asymptotique (104, 105), obtenue au maximum de vraisemblance. Il s'agit d'une matrice carrée, symétrique dont les éléments en diagonale correspondent aux variances[4] des paramètres et les éléments hors diagonale contiennent les covariances[5] entre deux paramètres. Sous NONMEM, la matrice de variance-covariance asymptotique (M) est calculée par défaut à l'aide de « l'estimateur sandwich » lors de l'étape $COVARIANCE tel que (106) :

$$M: = R^{-1}SR^{-1} \qquad \text{Equation 21}$$

Où R correspond à la matrice Hessienne (matrice des dérivées secondes de la log-vraisemblance par rapport aux paramètres du modèle) et S correspond à la matrice Jacobienne (matrice des dérivées premières de la log-vraisemblance par rapport aux paramètres du modèle). La notion d'asymptote signifie ici que plus la quantité de données disponible est importante, plus l'approximation de la matrice M par l'estimateur sandwich est exacte (96).

On note que les intervalles de confiance calculés à partir des SE de la matrice de variance-covariance sont symétriques. De manière générale, l'estimateur sandwich permet d'estimer correctement la matrice M mais, sous certaines conditions (*i.e.* lorsque la taille de l'échantillon est faible ou lorsque certains paramètres du modèle ne sont pas identifiables),

[4] La variance mesure la dispersion d'un paramètre autour de sa valeur moyenne. Les SE sont obtenues en calculant la racine carrée des éléments diagonaux.
[5] La covariance mesure l'association qui existe entre deux paramètres.

l'approximation de cette matrice peut être incorrecte et conduire à des estimations de SE biaisées (103, 107). De plus, l'approximation de la matrice de variance-covariance par l'estimateur sandwich suppose que les paramètres du modèle sont normalement distribués, or cette hypothèse n'est pas toujours valable ce qui peut générer un biais sur les estimations de paramètres et des SE peu fiables, en particulier pour les effets aléatoires (106). Il arrive aussi que la matrice de variance-covariance ne puisse pas être estimée suite à des problèmes de calcul, notamment lorsque la matrice R n'est pas inversible (103). Dans ce cas, l'incertitude des paramètres doit être estimée en utilisant une autre méthode.

7.3. Méthode de ré-échantillonnage par bootstrap

La deuxième méthode largement répandue pour calculer l'incertitude des paramètres d'un modèle et obtenir leurs intervalles de confiance est celle du bootstrap (108). Longtemps considérée comme le « gold standard » (109), cette technique vise à générer de nouveaux jeux de données de même taille que l'échantillon expérimental par méthode de ré-échantillonnage, puis, à ré-estimer les paramètres du modèle à partir de ces nouveaux échantillons bootstrap. En répétant cette procédure un grand nombre de fois (noté B et généralement compris entre 500 et 1000 répétitions), le nombre d'échantillons bootstrap est suffisamment représentatif de l'échantillon observé et permet de calculer correctement les paramètres du modèle, leur variance ainsi que leurs intervalles de confiance (107). Il existe plusieurs méthodes de bootstrap, dont les plus répandues sont le bootstrap paramétrique et le bootstrap non paramétrique (101, 108).

7.3.1 Bootstrap non paramétrique

Lors d'un bootstrap non paramétrique, les échantillons bootstrap sont générés par tirage au sort avec remise dans les données expérimentales (Figure 14) (108). Ce ré-échantillonnage conserve la structure des données observées et permet de reproduire la variabilité de l'échantillon afin d'obtenir la distribution des paramètres une fois le modèle ré-estimé.

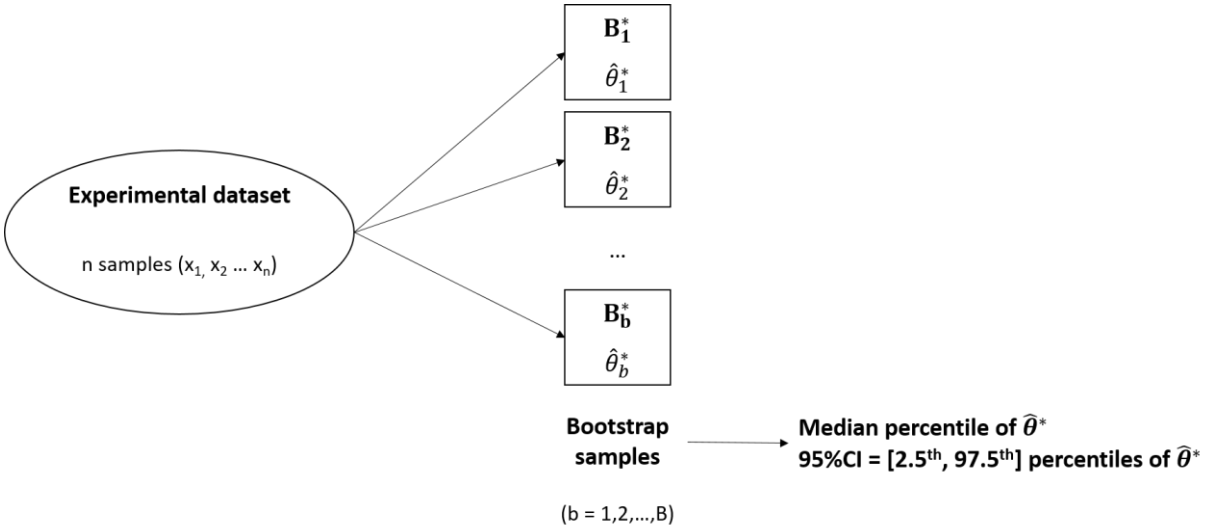


Figure 14. *Principe du bootstrap non paramétrique. L'échantillon expérimental est composé de n observations. B échantillons bootstrap (de la taille identique à celle de l'échantillon expérimental) sont tirés au sort dans les données observées (tirage avec remise). Les paramètres $\hat{\theta}_b^*$ (pour b allant de 1 à B) sont ensuite ré-estimés à partir de chaque échantillon bootstrap B_b^* et les 2.5, 50 et 97.5^{ème} percentiles sont calculés afin de déterminer l'intervalle de confiance des paramètres du modèle.*

Ce bootstrap est qualifié de non paramétrique car il suppose que les données sont issues d'une distribution empirique et ne nécessite pas d'hypothèse sur la distribution des paramètres du modèle (108, 110). Néanmoins, pour estimer correctement l'incertitude des paramètres, cette méthode nécessite une quantité suffisante de données expérimentales afin de simuler correctement la variabilité de l'échantillon. De fait, cette méthode est peu adaptée aux échantillons stratifiés car le nombre d'observations par strate est souvent insuffisant. En conséquence, les échantillons bootstrap simulés sont identiques à l'échantillon expérimental et ne permettent pas d'estimer correctement l'incertitude des paramètres. Enfin, le bootstrap non paramétrique ne peut pas être utilisé de manière systématique en raison de son temps d'exécution qui peut parfois devenir excessivement long (en pratique, plusieurs jours voire semaines sont parfois nécessaires à sa réalisation).

7.3.2 Bootstrap paramétrique

Lors d'un bootstrap paramétrique, les échantillons bootstrap sont obtenus par simulations à partir du modèle ajusté aux données expérimentales (101, 108, 111). Il ne s'agit donc pas d'un ré-échantillonnage des données observées mais d'un tirage au sort des échantillons dans la distribution des résidus du modèle.

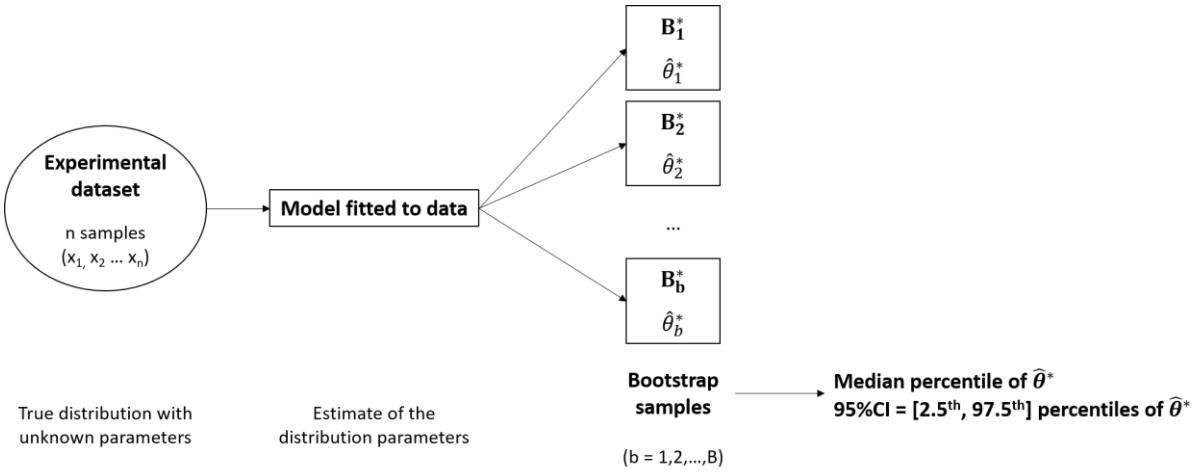


Figure 15. *Principe du bootstrap paramétrique. Les données expérimentales sont issues d'une distribution de paramètres inconnus, et qui sont estimés à partir du modèle. Les échantillons bootstrap (de même taille que l'échantillon expérimental) sont ensuite générés par simulation à partir du modèle et les paramètres du modèle $\hat{\theta}_b^*$ (pour b allant de 1 à B) sont ré-estimés à partir de chaque échantillon bootstrap. Les 2.5, 50 et 97.5^{ème} percentiles sont calculés afin de déterminer l'intervalle de confiance des paramètres du modèle.*

Ce bootstrap est qualifié de paramétrique car il suppose que les données observées sont issues d'une distribution dont les paramètres sont inconnus mais peuvent être approximés à l'aide d'un modèle paramétrique (110). Le bootstrap paramétrique implique donc des hypothèses fortes sur les distributions des paramètres et des résidus du modèle (107). Ainsi, le modèle utilisé pour simuler les échantillons bootstrap doit décrire précisément le processus qui a généré les données d'origine : s'il est mal spécifié ou si certaines hypothèses ne sont pas respectées (normalité des résidus par exemple), cette méthode peut ne pas être robuste et conduire à de mauvais résultats. De la même manière que pour le bootstrap non paramétrique, cette méthode peut être sujet à des temps d'exécution relativement longs lorsque le nombre d'échantillons bootstrap à simuler est important. En pratique, on préfèrera utiliser le bootstrap non paramétrique, à condition que son application soit possible, afin de s'affranchir de la validité de certaines hypothèses (108).

7.4. Sampling Importance Resampling

Afin de surpasser les limites des autres méthodes et améliorer l'estimation de l'incertitude des paramètres du modèle, une nouvelle approche, intitulée « Sampling Importance Resampling » (SIR), a été récemment développée (112). Le principe du SIR est de générer un ensemble de vecteurs de paramètres θ_{RS}, issus d'une distribution d'incertitude inconnue que l'on cherche à approcher, en effectuant des ré-échantillonnages à partir d'un système de pondération appelé ratio d'importance (IR) (112). La différence des -2log-vraisemblance suivant une loi du Khi-2 (χ^2) (d'après le théorème de Wilks (113)), il est possible d'attribuer à chaque vecteur de paramètres un poids IR[6] correspondant à sa probabilité d'être tiré au sort dans la vraie distribution d'incertitude des paramètres (112). Par conséquent, on peut approcher la distribution d'incertitude des paramètres à l'aide de la distribution d'incertitude de θ_{RS}, et l'on peut donc en déduire les valeurs typiques et les SE des paramètres du modèle. L'algorithme SIR est présenté plus en détails Figure 16.

Le SIR nécessite de définir une distribution d'entrée (COV), un nombre de vecteurs de paramètres à échantillonner dans cette distribution d'entrée (noté M) et un nombre de vecteurs de paramètres à ré-échantillonner dans le pool des M vecteurs simulés (noté m). Par défaut, la distribution d'entrée utilisée lors de la première itération du SIR correspond à la matrice de variance-covariance estimée par l'estimateur sandwich lors de l'étape $COVARIANCE de NONMEM (cf. paragraphe 7.2) mais elle peut aussi être définie à l'aide d'un bootstrap réduit lorsqu'il n'est pas possible d'obtenir cette matrice (115).

[6] La probabilité de ré-échantillonner un vecteur θ_{RS} correspond au rapport entre l'IR de ce vecteur et la somme des IR telle que, $p(\theta_{RS}) = \frac{IR}{\sum IR}$ (114)

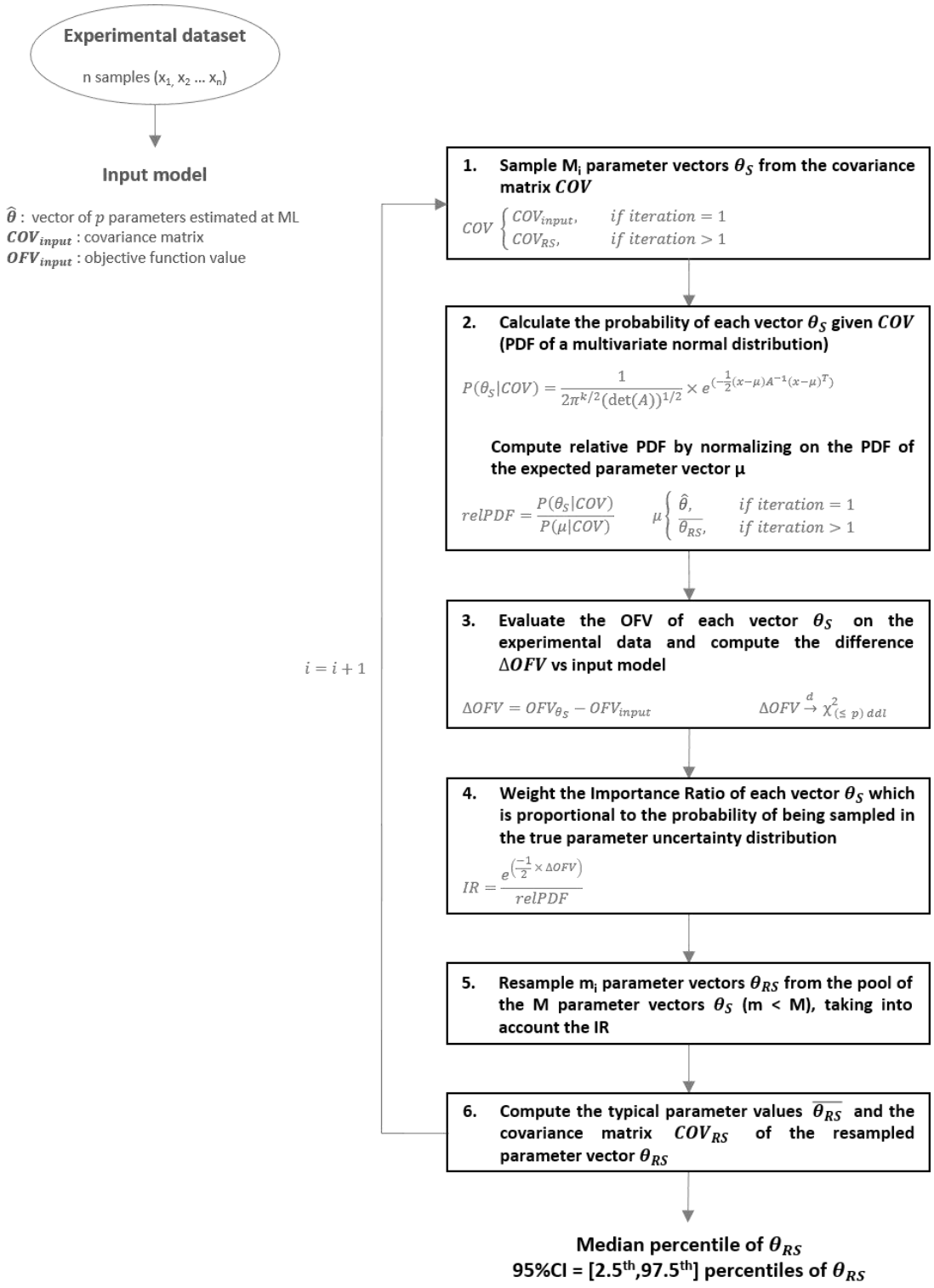


Figure 16. *Principe du SIR. Un nombre prédéfini de M vecteurs de paramètres est échantillonné dans la distribution d'entrée (par tirage aléatoire dans la matrice de variance-covariance COV) (1.). Le ratio d'importance (IR) est ensuite calculé pour chaque vecteur de paramètre θ_S précédemment simulé (2., 3. et 4.). Enfin, un nombre prédéfini de m vecteurs de paramètres sont ré-échantillonnés dans le pool des M vecteurs disponibles (par tirage au sort sans remise pondéré par leur IR) (5.). Finalement, les valeurs typiques et la matrice de covariance de la distribution de ré-échantillonnage sont recalculées (6.) et la procédure recommence à l'itération suivante. ML : Maximum de vraisemblance, PDF : fonction de densité de probabilité.*

La distribution de ré-échantillonnage est actualisée à la fin de chaque itération du SIR et sert de distribution d'entrée pour la prochaine itération. La procédure est ainsi répétée jusqu'à ce que les distributions d'entrée et de ré-échantillonnage soient similaires. La convergence du SIR est évaluée visuellement à l'aide d'un graphique diagnostic qui représente les distributions des différences d'OFV obtenues à chaque itération, à partir des M vecteurs de paramètres échantillonnés et à partir des m vecteurs de paramètres ré-échantillonnés, et ces distributions sont comparées à une distribution théorique du χ^2 avec un nombre de degrés de liberté égal au nombre de paramètres estimés. Le principe de ce diagnostic est que si la distribution des m vecteurs de paramètres ré-échantillonnés par le SIR représente la vraie distribution d'incertitude des paramètres, alors la différence d'OFV entre ces vecteurs et le vecteur des paramètres estimés au maximum de vraisemblance ($\hat{\theta}$) devrait suivre une distribution du χ^2 avec un nombre de degré de liberté égal ou inférieur au nombre de paramètres estimés (112). Ainsi, lorsque le SIR a convergé, l'incertitude des vecteurs de paramètres ré-échantillonnés permet d'approximer correctement l'incertitude des paramètres du modèle.

Comme le bootstrap non paramétrique, le SIR ne requiert pas d'hypothèse sur la distribution de l'incertitude des paramètres du modèle. Cependant, dans leur étude comparative de différentes méthodes d'évaluation de l'incertitude des paramètres, Dosne *et al.* (115) ont montré que le SIR était plus rapide que le bootstrap (en moyenne 10 fois plus rapide même si, d'après les auteurs ce résultat tendait à être surestimé). Cette réduction du temps d'exécution est en partie due au fait que le SIR n'implique pas de ré-estimation des paramètres du modèle mais seulement d'échantillonner des valeurs de paramètres.

7.5. Méthode de Monte-Carlo par Chaînes de Markov

A la différence des approches précédentes, qualifiées de fréquentistes, la méthode de Monte Carlo par Chaînes de Markov[7] (MCMC) est dérivée de l'approche Bayésienne. Le principe de cette méthode de ré-échantillonnage est d'utiliser les simulations de Monte Carlo (116) et les chaînes de Markov pour générer aléatoirement un grand nombre de vecteurs de paramètres θ, selon une distribution de probabilité π (*i.e.* la distribution cible) que l'on cherche à approcher par la distribution de θ (117–119).

Une chaîne est un processus aléatoire à n dimensions dont l'évolution d'un élément vers l'élément suivant est déterminée par une loi de probabilité. Dans une chaîne de Markov, le résultat de l'événement x réalisé au temps t dépend uniquement de l'événement précédent (au temps $t-1$) et dont la probabilité conditionnelle est donnée par $P(x_t|x_{t-1})$. Il s'agit d'un processus sans mémoire où les résultats successifs de la chaîne sont corrélés 1 à 1, à la différence des autres chaînes où le résultat de l'événement x au temps $t+1$ dépend de tous les événements passés depuis t_0.

L'algorithme MCMC se déroule en 2 étapes (118), où à chaque itération i (allant de 1 à n), un vecteur de paramètres θ^* est généré aléatoirement à partir du vecteur de paramètre précédent (θ_{i-1}) par tirage dans une distribution de probabilité $q(\theta^*|\theta_{i-1})$. Puis, une fonction d'acceptation $a(\theta_{i-1} \rightarrow \theta_i)$, préalablement définie pour évaluer la probabilité d'accepter le passage de θ_{i-1} vers θ_i, est utilisée afin d'accepter/rejeter la proposition du vecteur θ^*. Cette fonction d'acceptation est essentielle car elle assure la convergence de la distribution de θ vers la distribution cible π. Ce point est abordé plus en détails par la suite.

En pratique, l'algorithme MCMC débute par une phase de « burn-in » (phase d'échauffement) qui vise à écarter les valeurs initiales de la chaîne (96, 117). En effet, les premiers échantillons de la chaîne peuvent être issus d'une distribution ne correspondant pas

[7] N'ayant pas utilisé cette méthode au cours de mes travaux, ce paragraphe vise à présenter cette méthode de manière générale sans y apporter de point de vue critique.

à la distribution cible. Cependant, après un certain nombre d'itérations, la chaîne finit par atteindre un état stationnaire (invariant) où θ_{i-1} est systématiquement affecté à θ_i. Ainsi, la distribution de θ converge vers une distribution stationnaire qui correspond à la distribution d'intérêt π (96). Les résultats de la procédure sont utilisés pour calculer les valeurs typiques et les SE des paramètres du modèle.

L'algorithme MCMC selon la méthode de Métropolis (120) est présenté dans la Figure 17. La fonction d'acceptation utilisée pour cette méthode (Equation 22), permet d'assurer la convergence de la distribution de θ vers la distribution cible π.

$$\alpha = \frac{p(y|\theta^*)}{p(y|\theta_{i-1})} \qquad \text{Equation 22}$$

En effet, si θ^* est plus probable que θ_{i-1}, alors la probabilité de l'accepter comme nouvel élément de la chaîne vaut 1. Ceci favorise la recherche des paramètres dans les zones de forte densité de probabilité de la distribution cible. A l'inverse, si θ^* est moins probable que θ_{i-1}, alors la probabilité de l'accepter comme nouvel élément de la chaîne est égal au rapport des fonctions de densité de θ^* sur θ_{i-1}. Ceci permet d'explorer les paramètres situés dans les zones de plus faible densité de probabilité de la distribution cible. Ainsi, pour un nombre suffisamment important d'échantillons, la distribution de θ est relativement proche de la distribution cible π. A noter qu'en pratique (par exemple sur le logiciel Monolix), la méthode de Métropolis-Hastings est plus utilisée car elle constitue une généralisation de la méthode de Métropolis et qu'il existe d'autres méthodes de MCMC permettant de s'adapter aux différentes propriétés des distributions cibles et aux conditions d'acceptation des éléments de la chaîne.

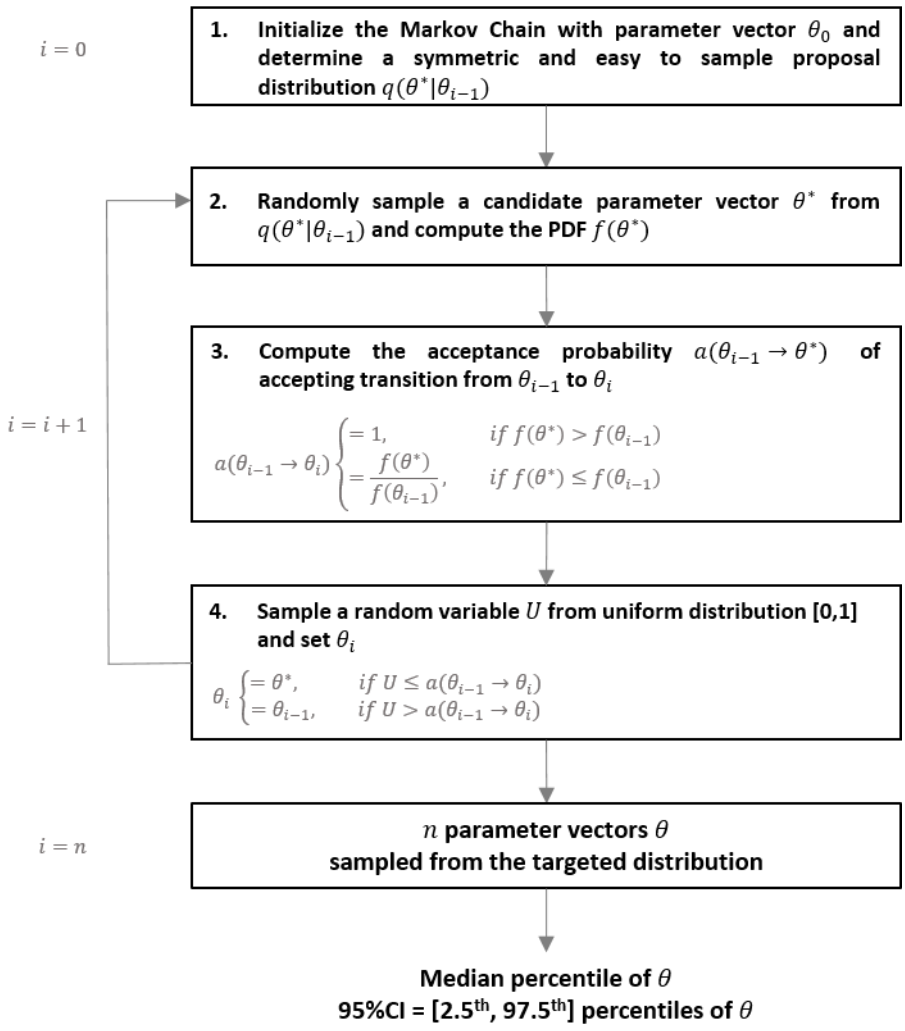


Figure 17. *Principe de la méthode MCMC selon l'algorithme de Metropolis. A chaque itération, un vecteur de paramètre θ^* est échantillonné dans la distribution symétrique $q(\theta^*|\theta_{i-1})$ par simulation de Monte Carlo (step 2.). La probabilité d'accepter ce vecteur est régit par la fonction d'acceptation qui tient compte des fonctions de densité de probabilité du vecteur proposé $f(\theta^*)$ et du vecteur précédent $f(\theta_{i-1})$ (step 3.). Pour la méthode de Métropolis, cette probabilité vaut 1 si la densité $f(\theta^*)$ est supérieure à la densité $f(\theta_{i-1})$, sinon elle est égal au rapport entre les deux fonctions de probabilité. Ainsi, soit θ^*, soit θ_{i-1} est affecté au nouvel élément de la chaîne θ_{i-1} (step 4.). Après n itérations, la chaîne atteint un état stationnaire et la distribution des paramètres θ permet d'approcher correctement la distribution cible.*

A la différence des méthodes précédentes, les échantillons générés par la méthode MCMC ne sont pas indépendants les uns des autres. En effet, chaque vecteur θ_i est fortement corrélé au vecteur précédent θ_{i-1}. Cette méthode a donc pour avantage de conserver l'information apportée par l'élément précédent de la chaîne, pour évoluer vers la distribution postérieure des paramètres du modèle. Par ailleurs, elle implique de trouver une fonction de proposition $q(\theta^*|\theta_{i-1})$ adéquate car ceci peut impacter le déroulement et les résultats du processus. Cette distribution doit être simple à échantillonner (par exemple une distribution

normale multivariée centrée sur θ_{i-1} et de matrice de variance-covariance prédéfinie) et doit être définie sur le même domaine que la distribution cible.

Pour résumer, il existe plusieurs méthodes permettant d'évaluer l'incertitude des paramètres. Néanmoins, elles peuvent conduire à des résultats différents et donc impacter la fiabilité des prédictions du modèle. Le choix de la méthode à utiliser est essentiellement guidé par la structure des données et par les hypothèses sous-jacentes du modèle. Une fois l'incertitude des paramètres correctement calculée à l'aide d'une méthode adaptée, il est possible d'évaluer la variabilité des prédictions du modèle.

7.6. Variabilité des prédictions du modèle

Après avoir estimé l'incertitude des paramètres d'un modèle, les SE des paramètres peuvent être utilisés pour construire l'intervalle de confiance au seuil 1-α % des prédictions du modèle (121). A l'aide de ces intervalles, il est possible d'évaluer la variabilité autour des prédictions de la variable d'intérêt (e.g. la densité bactérienne en CFU/mL au cours du temps dans le cadre d'une kill-curve) et s'assurer de la fiabilité du modèle, qui rappelons-le reste une abstraction de la réalité. Cette étape supplémentaire est particulièrement importante lorsque le modèle est utilisé comme outil d'aide à la décision (110).

En pratique, pour construire l'intervalle de confiance des prédictions du modèle, les vecteurs de paramètres échantillonnés précédemment à l'aide d'une méthode adéquate sont utilisés pour simuler la variable d'intérêt. On obtient ainsi des prédictions associées à une certaine variabilité. La dernière étape consiste à calculer la médiane et les 2.5 et 97.5^{èmes} percentiles (pour un risque de première erreur de 5%) pour obtenir le profil typique et l'intervalle empirique prédit par le modèle.

8. Objectifs de la thèse

Pour faire face à l'antibiorésistance les antibiotiques sont de plus en plus utilisés en combinaison. Dans ce contexte, il est primordial de rationaliser leur utilisation afin de maintenir leur efficacité à long terme, en particulier contre les bactéries Gram négatif multi-résistantes. Cette thèse vise à démontrer comment la modélisation PKPD permet d'améliorer le développement des combinaisons d'antibiotiques afin de maximiser leur efficacité et lutter contre l'émergence de résistance. Pour illustrer l'apport de cet outil, deux études seront présentées :

1. Une étude *in silico* d'optimisation de design. Dans une première partie, un design de checkerboard dynamique optimisé a été développé afin de caractériser les interactions pharmacodynamiques entre antibiotiques utilisés en combinaison, tout en réduisant considérablement la charge de travail expérimental. Dans une seconde partie, il a été montré que les performances de ce nouveau design rhombique[8] étaient comparables à celles des designs de référence et permettait un screening efficace des interactions entre antibiotiques.

2. Une étude de l'interaction pharmacodynamique entre l'association ceftazidime/avibactam et la colistine contre quatre souches cliniques de *Klebsiella pneumoniae* multi-résistantes. Dans une première partie, des expériences *in vitro* de time-kill curves ont été réalisées afin d'étudier l'effet bactéricide des antibiotiques utilisés seuls ou en combinaison et l'émergence de résistance. Dans un second temps, l'interaction pharmacodynamique entre ces molécules a été caractérisée au cours du temps à l'aide d'une approche de modélisation PKPD.

[8] Ce nouveau design tient sa dénomination de sa forme, qui se rapproche de celle d'un losange.

9. Article 1 : Optimized Rhombic Experimental Dynamic Checkerboard Designs to Elucidate Pharmacodynamic Drug Interactions of Antibiotics

Article publié dans **Pharmaceutical research**

Pharmaceutical Research (2022) 39:3267–3277
https://doi.org/10.1007/s11095-022-03396-7

ORIGINAL RESEARCH ARTICLE

Optimized Rhombic Experimental Dynamic Checkerboard Designs to Elucidate Pharmacodynamic Drug Interactions of Antibiotics

Niklas Kroemer[1] · Romain Aubry[2,3] · William Couet[2,3,4] · Nicolas Grégoire[2,3,4] · Sebastian G. Wicha[1]

Received: 10 June 2022 / Accepted: 9 September 2022 / Published online: 26 September 2022
© The Author(s) 2022

Abstract

Purpose Quantification of pharmacodynamic interactions is key in combination therapies, yet conventional checkerboard experiments with up to 10 by 10 combinations are labor-intensive. Therefore, this study provides optimized experimental rhombic checkerboard designs to enable an efficient interaction screening with significantly reduced experimental workload.

Methods Based on the general pharmacodynamic interaction (GPDI) model implemented in Bliss Independence, a novel rhombic 'dynamic' checkerboard design with quantification of bacteria instead of turbidity as endpoint was developed. In stochastic simulations and estimations (SSE), the precision and accuracy of interaction parameter estimations and classification rates of conventional reference designs and the newly proposed rhombic designs based on effective concentrations (EC) were compared.

Results Although a conventional rich design with 20-times as many combination scenarios provided estimates of interaction parameters with higher accuracy, precision and classification rates, the optimized rhombic designs with one natural growth scenario, three monotherapy scenarios per combination partner and only four combination scenarios were still superior to conventional reduced designs with twice as many combination scenarios. Additionally, the rhombic designs were able to identify whether an interaction occurred as a shift on maximum effect or EC50 with > 98%. Overall, effective concentration-based designs were found to be superior to traditional standard concentrations, but were more challenged by strong interaction sizes exceeding their adaptive concentration ranges.

Conclusion The rhombic designs proposed in this study enable a reduction of resources and labor and can be a tool to streamline higher throughput in drug interaction screening.

Keywords checkerboard design · drug interaction testing · optimized experimental design · stochastic simulation and estimation · synergy

Introduction

Resistant bacteria with decreased susceptibility towards antibiotics represent a major threat to human health. One strategy to treat less susceptible strains is to use combination therapies in order to attain a synergistic killing effect or to prevent resistance development and thereby protect the drugs for future use [1].

Methods are required to investigate pharmacodynamic interactions in a simple and efficient manner. Besides Etest, multiple-combination bacterial test (MCBT) and time-kill assays, checkerboard assays are a common method to investigate pharmacodynamic drug interactions [2]. Checkerboard experiments are based on the microdilution technique and utilize turbidity as a surrogate of bacterial growth in the broth for calculation of indices which are then translated into synergistic, antagonistic or indifferent combinational effects [3]. Conventional experimental checkerboard designs covering multiple concentrations chosen as twofold dilutions with up to 10 by 10 concentration levels can be disadvantageous due to a high number of reagents and resources needed [2].

✉ Sebastian G. Wicha
sebastian.wicha@uni-hamburg.de

1 Department of Clinical Pharmacy, Institute of Pharmacy, University of Hamburg, Hamburg, Germany

2 Inserm U1070, Poitiers, France

3 Université de Poitiers, UFR de Médecine Pharmacie, Poitiers, France

4 CHU de Poitiers, Laboratoire de Toxicologie-Pharmacologie, Poitiers, France

In addition, the criterion of evaluating the turbidity of the broth as endpoint criterion lacks sensitivity, is subjective and does not display a continuous effect read out and only informs about bacteriostatic effects and interactions beyond the turbidity threshold. To overcome this limitation, the quantification of colony forming units (CFU) as determined in 'dynamic' checkerboard experiments, can provide more detailed and specific insights into pharmacodynamics of single drugs and their interactions [4]. Together with modelling and simulation techniques the bacterial count can be a strong tool for interaction screening and for quantification of interaction parameters [4].

In order to reduce the workload, a rational reduced design based on effective concentrations (EC) was proposed by Chen *et al.* [5]. Their EC-4×4 checkerboard design, including one scenario of natural growth, six scenarios of mono-treatment and nine combination scenarios provided higher accuracy and precision than a conventional reduced design with same number of scenarios, but unoptimized concentrations [5]. Associated with checkerboard designs, a scenario was defined as an experimental combination of two drugs with distinct concentrations whereas the growth scenario contains no drug and in the mono testing scenarios solely one drug was present.

The objective of the present study was to further optimize and reduce the design of Chen *et al.* [5]. The optimization of those designs was inspired by a D-optimal design approach. D-optimality is beside other optimality criteria one of the most important ones and a design is considered optimal when it is minimizing the determinant of the inverse Fisher Information matrix [6, 7]. Such reduced designs should still be able to classify drug interactions accurately, but should be highly efficient to comply with the requirements of high-throughput analyses. The general pharmacodynamic interaction (GPDI) model implemented in Bliss Independence was used for interaction modelling in the course of the experimental design development and design evaluation [8, 9]. The applied GPDI model enables elucidation of synergistic (syn), antagonistic (ant) or asymmetric (asym) drug interactions and describes the direction of an interaction via identification of perpetrator and victim drugs [8]. Furthermore, it can distinguish between allosteric and competitive interacting drugs, i.e. interactions on the level of the maximum effect (Emax) or potency (EC50) [8].

Materials and Methods

Conceptual Workflow of Design Development and Evaluation

The workflow of the development and evaluation of the experimental designs is illustrated on Fig. 1.

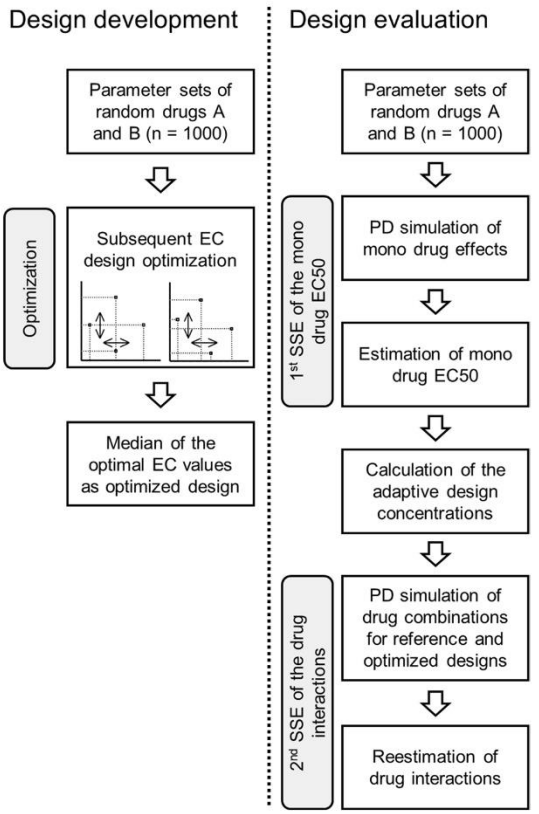


Fig. 1 Flowchart illustrating the workflow of the experimental design development and evaluation. EC: effective concentration, SSE stochastic simulation and estimation, PD: pharmacodynamic.

The optimized experimental designs were planned as adaptive designs based on EC with solely four combination scenarios. For the design development 1000 parameter sets of random drugs A and B were generated and for each drug combination an optimal set of adaptive EC-values forming an experimental design layout for estimation of the drug interactions was determined inspired by D-optimality. The median of the 1000 individual optimal designs was considered to be the optimized design layout.

In a second step, the developed designs were evaluated in stochastic simulations and estimations (SSE) and compared with reference designs with respect to their predictive performance. Therefore, an experimental screening was simulated. 1000 parameter sets of random drugs A and B were generated and in a first simulation the mono drug effects were simulated in an ordinary differential equation system. The drug EC50 were re-estimated and used to calculate the concentrations for the EC-based adaptive experimental designs. The ordinary differential equation system was then used again to simulate dynamic checkerboard experiments

utilizing the reference and optimized designs. From these simulations the pharmacodynamic drug interactions were re-estimated. Finally, the misclassification of interactions, the precision and the accuracy of the interaction estimation of the different designs were compared.

General Pharmacodynamic Interaction (GPDI) Model

The GPDI model was used for design development, simulation and estimation of drug interactions. In the GPDI model, interactions caused by a perpetrator drug at the concentration C are described as shifts of pharmacodynamic parameters (θ) of the victim drug, where θ represents the EC50 or Emax and the shifts are applied via the insertion of a GPDI term (Eq. (1)) [8]:

$$\theta \cdot \left(1 + \frac{INT \cdot C^{H_{INT}}}{EC50_{INT}^{H_{INT}} + C^{H_{INT}}}\right) \quad (1)$$

The INT parameter describes the fractional change of the pharmacodynamic parameter, $EC50_{INT}$ parameterizes the interaction potency and H_{INT} the sigmoidicity of the interaction. These parameters are directional as indicated by subscript letters in Eqs. (3)-(6) (e.g. $_{AB}$ indicates A as victim and B as perpetrator drug) and enable the description of the direction of the interaction [8]. When the GDPI term is applied on both combination partners, interactions become bidirectional and both drugs can be perpetrator and victim at the same time.

In this study, an implementation of the GPDI model in Bliss Independence [9] was used for design optimization and evaluation. The GPDI model for Bliss Independence is derived as follows: A competitive interaction type for two drugs A and B can be described as shift on EC50 (Eqs. (2)-(3)) with

$$E_A = \frac{Emax_A \cdot {C_A}^{H_A}}{\left(EC50_A \cdot \left(1 + \frac{INT_{AB} \cdot C_B^{H_{INT,AB}}}{EC50_{INT,AB}^{H_{INT,AB}} + C_B^{H_{INT,AB}}}\right)\right)^{H_A} + {C_A}^{H_A}} \quad (2)$$

and

$$E_B = \frac{Emax_B \cdot {C_B}^{H_B}}{\left(EC50_B \cdot \left(1 + \frac{INT_{BA} \cdot C_A^{H_{INT,BA}}}{EC50_{INT,BA}^{H_{INT,BA}} + C_A^{H_{INT,BA}}}\right)\right)^{H_B} + {C_B}^{H_B}} \quad (3)$$

An allosteric interaction type can be described as shift on Emax (Eqs. (4)-(5)) with

$$E_A = \frac{Emax_A \cdot \left(1 + \frac{INT_{AB} \cdot C_B^{H_{INT,AB}}}{EC50_{INT,AB}^{H_{INT,AB}} + C_B^{H_{INT,AB}}}\right) \cdot {C_A}^{H_A}}{{EC50_A}^{H_A} + {C_A}^{H_A}} \quad (4)$$

and

$$E_B = \frac{Emax_B \cdot \left(1 + \frac{INT_{BA} \cdot C_A^{H_{INT,BA}}}{EC50_{INT,BA}^{H_{INT,BA}} + C_A^{H_{INT,BA}}}\right) \cdot {C_B}^{H_B}}{{EC50_B}^{H_B} + {C_B}^{H_B}} \quad (5)$$

in which E_A and E_B describe the effect of the single drugs A and B, $Emax_A$ and $Emax_B$ display the maximum possible mono drug effects for drugs A and B, C_A and C_B each drug concentration and H_A and H_B are pharmacodynamic sigmoidicity parameters.

The polarity of each INT parameter defines the interaction type. If INT = 0, the GPDI term becomes 1 and no interaction is present. For drug interactions on EC50, -1 < INT < 0 describes a synergistic interaction as the EC50 is decreased and INT > 0 an antagonistic interaction as the EC50 is elevated. If both INT parameters have the same polarity the occurring interaction is bidirectionally synergistic or antagonistic and in opposite, the interaction becomes asymmetric when the polarity of both INT parameters is reversed. The polarity of INT is opposite, when the interaction is implemented on Emax (i.e. INT > 0 describes a synergistic interaction as Emax increases). For simplification, as in the study by Chen *et al.* [5], in the optimization and SSE study the interaction potency was fixed to the drug potency ($EC50_{INT}$ = EC50) and the interaction sigmoidicity (H_{INT}) was set to 1.

The combinational drug effects were calculated using Bliss Independence with single drug effects normalized to 1 for calculation of the probabilistic Bliss Independence term and then scaled back to the effect scale (Eqs. (6)-(7)):

$$E_{max} = \max(E_{max,A}, E_{max,B}) \quad (6)$$

$$E_{comb} = \left(\frac{E_A}{E_{max}} + \frac{E_B}{E_{max}} - \frac{E_A}{E_{max}} \cdot \frac{E_B}{E_{max}}\right) \cdot E_{max} \quad (7)$$

using the terms for E_A and E_B containing the GPDI terms as defined above (Eq. (2)-(5)).

Reference Checkerboard Designs and Novel Design Candidates

Starting point for the development of new checkerboard designs were layouts proposed by Chen *et al.* [5]. In their study, two conventional designs build on standard drug concentrations were compared to a novel, optimized design based on drug potency values. The following three designs were used as reference designs in this study:

i) The conventional rich design consisted of ten-by-ten drug concentrations (i.e. 100 testing scenarios) including one experiment without treatment (natural growth),

nine mono testing scenarios for each drug and 81 drug combination scenarios. The drug concentrations tiers were set as two-fold increments ranging from 0.25 to 64 µg/mL (Fig. 2a).

ii) The conventional sparse design was reduced to four-by-four drug concentrations (i.e. 16 testing scenarios) including one scenario without treatment, three mono testing scenarios for each drug and 9 combination scenarios. The drug concentration tiers in this sparse design were set as eight-fold increments ranging from 1 to 64 µg/mL (Fig. 2b).

iii) The optimized EC-4×4-design by Chen *et al.* [5] also covered 16 testing scenarios, but instead of standard eight-fold concentrations the concentrations depended on drug potency values (EC20, EC50, EC80) (Fig. 2c).

The following two optimized rhombic designs which were newly proposed in this study also relied on drug potency values and covered two-by-two combination scenarios, but with no horizontal rectangular shape (Fig. 3):

i) In the free rhombic design, all combination scenarios were independent from each other and the design, i.e. the length and angles of the shape of the experimental layout were solely driven by the optimization studies.

ii) The fixed rhombic design was a simplification of the free rhombic design. In this design a middle EC of one drug is used in two combination scenarios while an upper and lower concentration are tested solely in one combination scenario. This simplification was designed to have a more practical *in vitro* application as illustrated on Fig. 3.

The newly developed rhombic checkerboard designs also included one scenario without treatment (natural growth) and mono testing scenarios with two-fold concentrations ranging from 0.5·EC50 to 2·EC50. The mono testing concentrations scenarios were no component of the optimization studies.

All checkerboard concentrations (C) based on drug potency values (ECXX) were calculated based on a sigmoidal Emax model, with ECXX describing the decimal of the maximal effect (e.g. 0.2 for EC20) (Eq. (8)):

$$C = \sqrt[H]{\frac{ECXX \cdot Emax \cdot EC50^{H}}{Emax - ECXX \cdot Emax}} \tag{8}$$

Development of the Optimized Rhombic Designs

The rhombic checkerboard designs were developed using the R software (version 3.6.2)[10]. Minimizations were performed using 'optim' from the R package stats (version 3.6.3)[10].

For design development, 1000 parameter sets of two random drugs A and B were simulated to mimic typical antibacterial drugs (Fig. 1). Additionally, to simulate different types of drug interactions for each of those drug pairs three sets of interaction parameters describing a synergistic, antagonistic and asymmetric interaction were sampled and applied as interactions on EC50 and Emax. The drugs Emax values (log10 CFU/mL) were sampled between 5 and 10, the EC50 values (µg/mL) between 2 and 3 and H between 1 and 3. The INT parameters were sampled between -0.9 and 4.

For the design development, the inverse determinant of expected Fisher information matrix (FIM) was calculated and used as objective function value (OFV) (Eqs. (9)-(10)):

$$FIM = \frac{1}{\sigma^2}\left(J^{T} \cdot J\right) \tag{9}$$

$$OFV = \frac{1}{\det(FIM)} \tag{10}$$

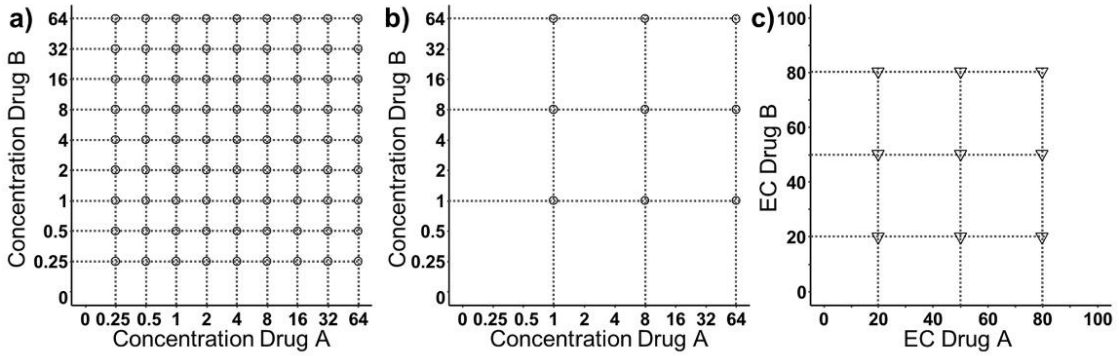


Fig. 2 Overview of the literature-based reference designs: Design (**a**) is the conventional rich design, design (**b**) is the conventional sparse design, design (**c**) is the EC-4×4-design earlier proposed by Chen *et al.* [5], based on effective concentrations EC20, EC50 and EC80. For simplification, only the combination scenarios are shown.

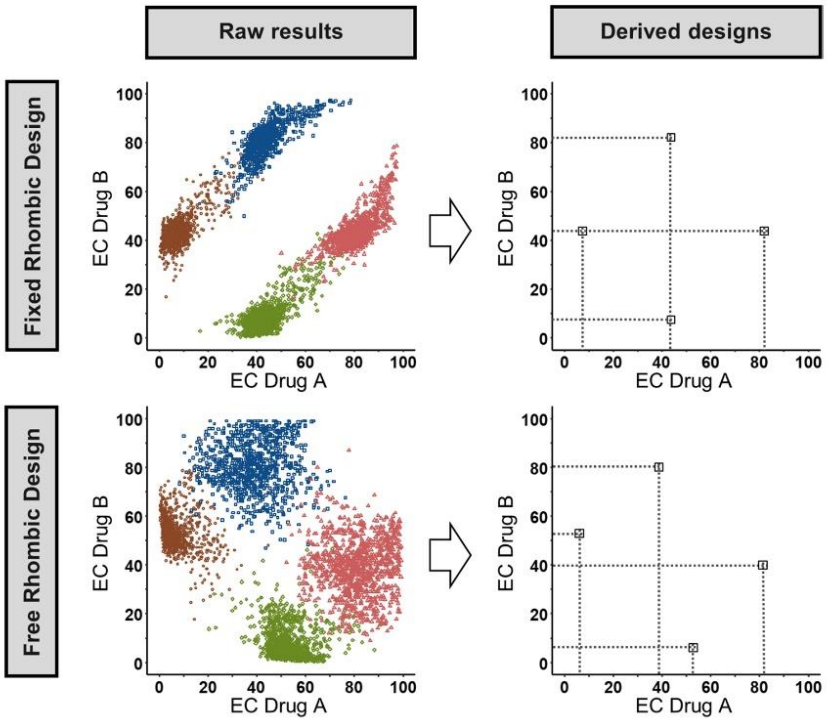


Fig. 3 Development of the optimized rhombic designs. The median of the raw results of the optimization of 1000 simulated drug concentrations (left) was considered to be the optimal fixed or free rhombic checkerboard design (right). For simplification, only the combination scenarios are shown, as the monotherapy scenarios were not included in the optimization.

with J being the Jacobian (matrix of first-order derivatives of the offered combination scenarios with respect to the model parameters) and σ^2 the additive residual variance (fixed to a constant as it does not influence the minimization). For each parameter set the drug concentrations for the adaptive designs and their static effect sizes based on the GPDI model outlined above were calculated.

The OFV was calculated separately for each parameter set of the two drugs A and B. For each parameter set interactions on EC50 or Emax including the three differently sampled interaction types (synergism, antagonism, asymmetric) were considered in the OFV as weighed sum [11] to simultaneously optimize a design for different conceivable drug interactions. All modes of interactions and interaction types were weighted same, given that each scenario shares the exact same number of parameters and data points.

Minimization of the OFV was then performed with EC-values forming the combination scenarios as design variables using Nelder-Mead [12] algorithm pre-minimizing and L-BFGS-B [13] algorithm for a final minimization.

Finally, the medians of the ECs of all 1000 simulated parameter sets were considered to be the optimal design (Fig. 1). Optimization runs converging in local minima with implausible results (e.g. estimates with boundary problems) after application of 1000 retries with different sets of initials were excluded from data analysis.

Design Evaluation in Stochastic Simulation and Estimation

The optimized designs were subsequently evaluated in stochastic simulation and estimation (SSE) studies. The SSE were performed with the R software (version 3.6.3)[10]. Differential equations were solved using the 'deSolve' package (version 1.28)[14]. To improve performance, differential equations were encoded in C, compiled as shared objects (.so) and linked to the 'deSolve' interface. Estimation of parameters was performed using 'optim' from the R package stats (version 3.6.3) [10].

For the SSE, a realistic time-kill experiment mimicking scenario was chosen: 1000 hypothetical drug combinations were randomly sampled and the effect on colony forming units (CFU) in an ordinary differential equation system (Eq. (11)) with simultaneous growth with a first order growth rate k_G and killing effect rate E was simulated.

$$\frac{dCFU}{dt} = k_G \cdot CFU - E \cdot CFU \tag{11}$$

As initial condition a typical inoculum of $5 \cdot 10^5$ CFU/mL was assumed and the growth rate (k_G) was set to 2.08 h^{-1}, which corresponds to a bacterial doubling time of 20 min,

typical for *E. coli* [15]. The addition of drug was simulated at t = 0 h and CFU were read after 4 and 24 h.

In all simulations, the EC50 of both interacting drugs was sampled between 0.1 and 60 µg/mL, the sigmoidicity parameters H_A and H_B were sampled between 1 and 3 and the Emax of both drugs were sampled conservatively between 1 and 1.5 h^{-1} to prevent the termination of runs due to excessive killing, which can lead to very small CFU counts challenging the tolerance of differential equation solver (< 1e-7 CFU/mL). To mimic common drug interactions, the interaction parameters INT were sampled from -0.9 to -0.5 and 0.5 to 4, corresponding to the additivity margins evaluated for the GPDI model [8]. In a second approach strong monodirectional antagonistic interactions were simulated to imitate a drug combination in which one drug fully suppresses the effect of the companion drug (Supplement Text 1). Additionally, the type of interaction (EC50 or Emax) was randomly sampled.

In a first SSE (Fig. 1), a determination of the mono drug pharmacodynamics before simulating the checkerboard experiments was simulated to challenge the robustness of the adaptive EC-based designs being dependent on the estimated EC50. This was done as the 'true' EC50 is usually unknown and the EC50 is also determined with uncertainty, which might impact the calculation of the concentrations in the design. This EC50 determination was based on the ODE system as outlined above and included a growth scenario and three concentration scenarios based on standard two-fold concentration scenarios around the EC50. The EC50s were estimated using a sigmoidal Emax-model (Eq. (11)). The model described the effect (E) as a function of the drug concentration (C) with the maximum effect (Emax), drug potency (EC50) and sigmoidicity of the drug effect (H) as parameters:

$$E = \frac{Emax \cdot C^H}{EC50^H + C^H} \tag{12}$$

The estimated EC50s were then used to calculate the final concentrations for the adaptive drug potency based experimental designs used for the interaction estimation. Therefore, the EC-4 × 4 and rhombic checkerboard design concentrations were calculated individually for all simulated drug combinations whereas the conventional reference designs always covered the same standard concentrations as outlined above.

In a second SSE (Fig. 1) the designs were then compared with respect to the abilities to identify drug interactions. The ODE system outlined above was used to simulate dynamic checkerboards with combined effects based on the GPDI model. For interaction estimation the mono drug pharmacodynamic parameters were provided and the interaction parameters were first assessed in a pre-evaluation using the Nelder-Mead algorithm with different polarities of the INT parameters as initial values. The OFV, that was minimized, was calculated using the extended least squares criterion [16].

The Akaike information criterion (AIC) for a potential Emax or EC50 interaction was calculated and the difference between the best fitting EC50 model and the best fitting Emax model was computed and used as decision criteria to identify the correct interaction [17]. To evaluate the ability of the different experimental designs to discriminate between EC50 and Emax interactions the minimum AIC difference for 95% of the estimations was calculated. A higher AIC difference was interpreted as a surrogate for a more distinct discrimination of the experimental design between allosteric and competitive interacting drugs.

After estimation of INT parameters, the Hessian was calculated within the 'optim' function. The standard errors of the estimates (SE's) were calculated as square root of the diagonal values on the inverse Hessian matrix evaluated at the OFV minimum. 95% confidence intervals (CI) of the INT parameter estimates were calculated as INT-parameter ± 1.96 · SE. Relative bias (rBias) (Eq. (13)) and relative imprecision (rRMSE) (Eq. (14)) were calculated as follows:

$$rBias = 100\% \cdot \frac{1}{N} \cdot \sum_i \frac{estimation_i - true_i}{true_i} \tag{13}$$

$$rRMSE = 100\% \cdot \sqrt{\frac{1}{N} \cdot \sum_i \frac{\left(estimation_i - true_i\right)^2}{true_i^2}} \tag{14}$$

with $estimation_i$ referring to the i^{th} estimated INT parameters and $true_i$ being the i^{th} true parameters used for simulations. N represents the number of true parameter-sets.

To evaluate the value of the experimental designs in a qualitative interaction screening the misclassification rate (MCR) (Eq. (15)) was calculated as a metric for a false interaction identification neglecting the absolute value of the INT parameter but assessing solely the polarity of the INT parameters.

$$MCR = 100\% - 100\% \cdot \frac{\text{correctly classified interaction}}{N} \tag{15}$$

An interaction was rated as correctly classified, when the polarity of both INT parameters including the 95% CI matched the underlying true value that was used for simulation. Additionally, the MCR for the identification of the correct mechanism of interaction (i.e. EC50 or Emax interaction) was calculated.

Results

Development of the Optimized Rhombic Designs

The reference designs and newly proposed rhombic designs are visualized on Figs. 2 and 3 respectively. The corresponding EC-values forming the rhombic designs can be obtained from Table I. Minimization problems within the optimization did not occur for the fixed rhombic design. For the free rhombic design 2% of the minimizations converged in local minima with boundary problems and were removed. Conventional checkerboard designs as the conventional rich and conventional sparse reference design do have a symmetric rectangular layout just as the EC-4×4-design proposed by Chen *et al*. as a rationally derived experimental design. In opposite to these designs, the optimization of the free design formed a rhombic design with no classic rectangular shape. The final free rhombic design is nearly mirror symmetric to the diagonal of the checkerboard. In comparison, the fixed rhombic design is forced to be mirror symmetric to be more practicable for application in *in vitro* studies.

Table I Design Variables Corresponding to the Developed Rhombic Checkerboard Designs (Fig. 2)

Free rhombic design		Fixed rhombic design	
EC39:EC81		EC44:EC82	
EC06:EC53	EC81:EC39	EC08:EC44	EC82:EC44
EC52:EC08		EC44:EC08	

Results are presented as ECXX Drug A:ECXX Drug B

In none of the developed designs the optimization led to combinations scenarios formed out of equal EC-values, as e.g. EC20:EC20, EC50:EC50 and EC80:EC80 in the EC-4×4-design.

Design Evaluation in Stochastic Simulation and Estimation

The estimation of the EC50 resulted in unbiased estimates with a mean relative imprecision of 2.10%. The accuracy and precision metrics of the different experimental designs estimating the interaction parameters are displayed on Fig. 4. The misclassification rates of all designs are illustrated on Fig. 5. The AIC differences between an EC50 or Emax model, as metric for the discrimination between allosteric and competitive interactions are shown in Table II. All designs led to small relative bias (rBias) (<2.06%) (Fig. 4), indicating that all designs were able to support an accurate estimation of the interaction parameters. Comparing the relative imprecision (rRMSE) of the different designs, the conventional rich design with its 81 combination scenarios and the EC-4×4 design with its 9 combination scenarios allowed estimation of the INT-parameters most precisely (rRMSE rich design: INT_{AB}: 16.54%, INT_{BA}: 13.91%; rRMSE EC-4×4-design: INT_{AB}: 14.19%, INT_{BA}: 14.14%). The conventional sparse design, which is like the EC-4×4-design a reduced design by a factor of nine (nine combination scenarios) was least precise (INT_{AB}: 25.16%, INT_{BA}: 24.78%).

The further reduced rhombic designs with only four combination scenarios, enabled a precision of the estimates between the EC-4×4-design and the conventional sparse design (Fig. 4).

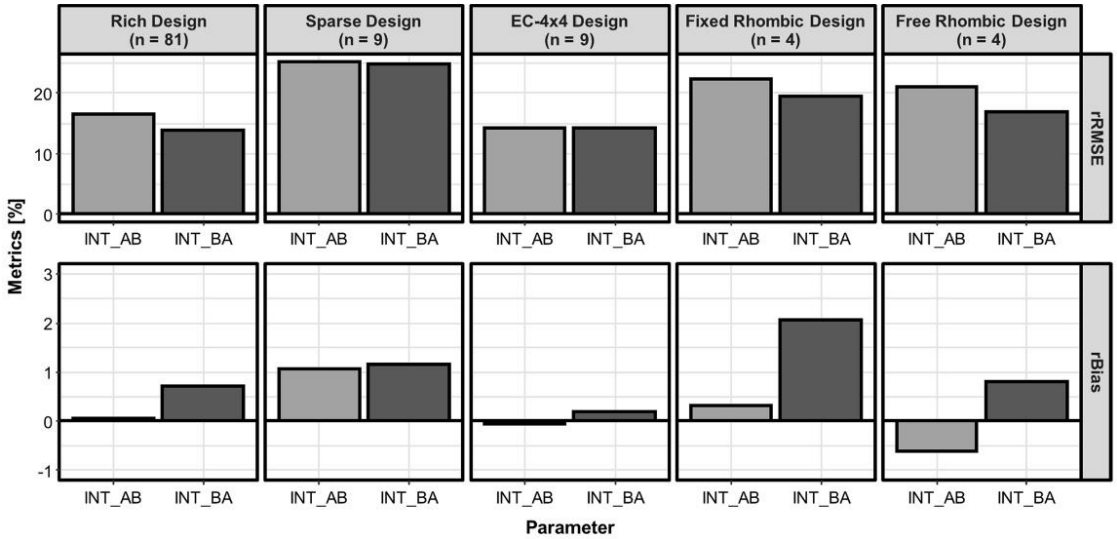


Fig. 4 The relative root mean square error (rRMSE) and relative bias (rBias) for the interaction parameters (INT_AB, INT_BA) estimated by the different checkerboard design in the SSE study. n represents the number of combination scenarios included in the respective experimental design.

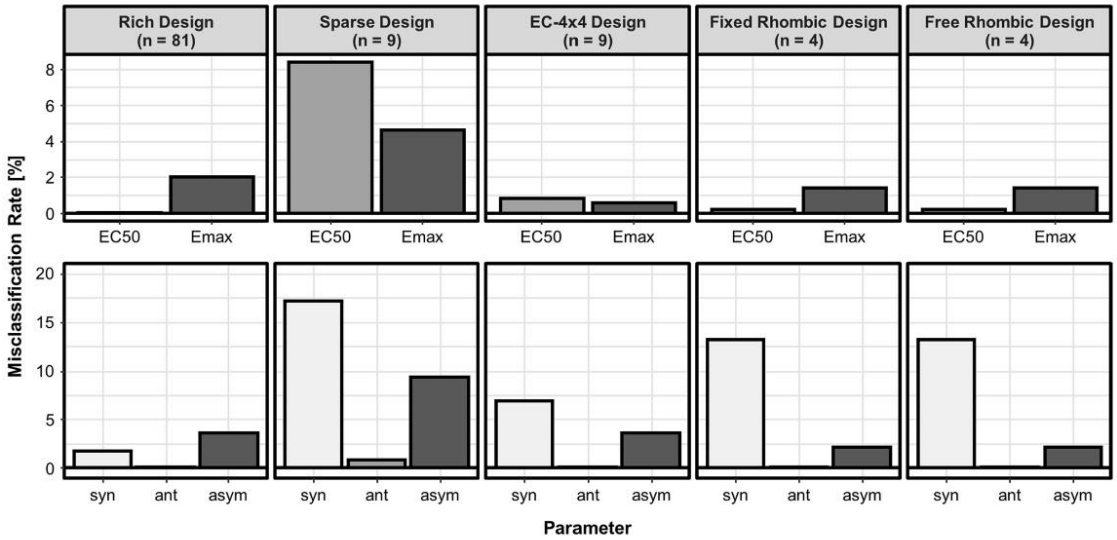


Fig. 5 Misclassification rates of the different checkerboard designs in the SSE study. Classification rates for discriminating competitive (EC50) or allosteric (Emax) interactions were calculated as well as for identifying the correct type of the interaction (syn: synergy, ant: antagonism, asym: asymmetry). n represents the number of combination scenarios included in the respective experimental design.

Table II SSE Statistics on the Ability of the Different Experimental Designs to Discriminate Between EC50 and Emax Interactions

	Reference designs			Rhombic designs	
	conventional		EC 4×4	fixed	free
	rich	sparse			
Combination scenarios	81	9	9	4	4
Min. AIC[a] difference for interaction discrimination (EC50, Emax) in ≥ 95% of the simulations	47.83	0.81	15.24	9.22	5.52

[a]AIC, Akaike Information criterion

The overall lowest misclassification rates were displayed by the conventional rich design. The EC-4×4-design and the rhombic designs led to lower misclassification rates than the conventional sparse design (Fig. 5). The free rhombic design overall misclassified less interactions than the fixed rhombic design. In all designs synergistic interactions were misclassified most often (Fig. 5).

When considering strong antagonistic monodirectional drug interactions leading to full suppression of the effect of the victim drug, the conventional designs relying on standard concentrations showed advantages against all adaptive designs with effective concentrations since the effective concentrations are less informative in such extreme cases (Supplement Text 2, Supplement Fig. 1).

The AIC difference between an interaction on Emax and EC50 for 95% of the estimations as marker for the distinctness of the discrimination between EC50 and Emax interactions was highest for the conventional rich design (47.83) and for the EC-4×4-design (15.24). Again, the rhombic designs were inferior with regard to the distinctness of the interaction discrimination than the richer EC-4×4 design and the conventional rich design but superior to the conventional reduced design (Table II).

Discussion

The optimized rhombic designs proposed in this study include solely four scenarios required for combination testing and present universal applicable designs due to their reference on effective concentrations. With their rhombic shaped arrangement of the combination scenarios rather than a conventional rectangular one, they suggest that the combinations of similar effective drug concentrations (i.e. EC50-EC50 combination) are less informative than off-diagonal concentration combinations.

These proposed designs were included in SSE studies and were compared to reference designs. In this comparison, it was considered that a preliminary EC50 determination with additional uncertainty had to be performed for the EC-based designs. The herein simulated EC50 determination led to very precise and unbiased estimates of the drug potencies and therefore had limited impact on the EC-based design in this simulated setting. Also, the other parameters of the drugs were considered to be known and fixed to the true values, when estimating the interactions. This influence will be more relevant, when transferring the optimal design in application areas, where high-quality information on the pharmacodynamics of the drugs is not available.

The substantial reduction in tested combination scenarios in the here newly proposed rhombic designs is obviously linked to a loss of information. Despite their very reduced layout, the optimized designs based on effective concentrations were still superior regarding accuracy, precision and misclassification rates compared to the conventional sparse design and they could compete with the reference designs in case of classification of interaction. Therefore, this reduction could be very useful in early phases of interaction screening to enable a higher throughput when elucidating drug interactions. The simulation studies mimicked modern, so called 'dynamic' checkerboard experiments with readout of viable bacteria, instead of turbidity. Therefore, the designs enable a wider spectrum of interaction analysis. Moreover, as the designs are based on the GPDI model, they are designed for the identification of directional interactions and can identify perpetrator and victim drugs and discriminate interactions on EC50 and Emax. In conventional checkerboards with turbidity as endpoint, single concentration testing as performed in multiple-combination bactericidal tests, time-kill assays or Etest [2], the generation of information about the combined pharmacodynamic effect surface cannot be achieved. Therefore, the workload reduction especially in dynamic checkerboards is effective and enables a more straightforward understanding of drug interactions to a fuller extent, even though the optimized designs require prior knowledge regarding the drug-response relation to determine the by design needed effective concentrations. This requires solely active drugs and therefore the designs based on effective concentrations can have limited applicability for detection of the potentiation of a drug by an inactive combination partner or coalism of two inactive drugs. Nevertheless, it could be encouraged to utilize the power of experimental design optimization techniques to support rational approaches combination designs beyond antibiotic drugs.

In opposite to the optimized design proposed by Chen *et al.* [5], which was rationally developed and evaluated with focus on EC50 interactions, the designs in this study were developed with an D-optimal inspired approach and considered interactions on Emax and EC50. Additionally, the designs were all also evaluated extensively in Bliss Independence using the GPDI model, allowing a wide variability of possible interactions on EC50 and Emax. Thus, all rhombic designs are associated with an enormous improvement in gain of information on drug interactions *versus* a reduction of workload to enable a high throughput as compared to conventional approaches. Moreover, through the usage of drug specific EC-values, testing concentrations are defined rationally and the designs allow more targeted studies of drug interactions. This can make interaction testing more efficient, even though the designs are inferior to conventional designs, when very strong drug interactions are present, which are not covered in the range of the effective concentrations for the respective design. In these cases, unspecific standard concentrations can initially be beneficial through their wider concentration range and additional testing for the adaptive effective concentration-based designs is required to enable a reliable identification of the drug interactions (Supplement Text 3).

We acknowledge the following limitations of our study: D-optimal design strategies are sensitive to underlying prior information and the developed designs suffer if the final model differs clearly from the prior model [18]. However, the chosen GPDI model is already compared and validated against different interaction models. It showed to be superior to an empiric Bliss Independence interaction model and is universally applicable [8]. Furthermore, it is able to infer about mechanistic information in the underlying interaction [8]. Beside the underlying model the optimality criterion can have an influence on the identified design candidates [19, 20]. As this study was inspired by the traditional D-optimality criterion alternative approaches like A- or E-optimality might result in slightly different designs. Nevertheless, the SSE evaluation confirmed the capabilities of the designs derived with the D-optimal inspired method in the identification of pharmacodynamic drug interactions.

The chosen optimization and evaluation settings are focused on antibiotics that may limit the direct transfer of the experimental designs, but does not exclude it. For simplification, in our design development and in the SSE studies no simultaneous interactions on EC50 and Emax were considered. In addition, base of the SSE studies was a simplified one compartment model to describe the bacterial growth. This means, that development of adaptive resistance or tolerances were quantified as interactions and not in a mechanistic fashion. Hence, further research is required, if the designs shall be used within more complex mechanistic models.

Conclusion

In this study rhombic checkerboard designs based on D-optimized effective concentrations were proposed. For the commonly used additivity criterion on pharmacodynamic interaction modelling, Bliss Independence, a fixed rhombic design with the combination scenarios EC08/EC44, EC44/EC08, EC44/EC82, EC82/EC44 is the simplest of the developed designs due to the fixed middle concentration and enables the determination of synergistic, antagonistic or asymmetric drug interactions with a reduced workload compared to conventional checkerboard designs. The new proposed designs, which reduce combination testing by 95% compared to conventional rich designs and by 55% compared to sparser design layouts, are inferior with regard to accuracy and precision to the conventional rich design and an earlier proposed EC-based design, due to a loss of information during reduction, but can be beneficially compared to a conventional sparse design in case of classification of an interaction. Thus, the present study showed that checkerboard designs based on interaction models with optimized drug specific effective concentrations are superior to conventional designs with standard concentrations and are very attractive to enable higher throughput with maintained or even increased quality of results. Additionally, a model-based evaluation of the experimental data as suggested in this study can contribute to a deeper elucidation of drug interactions. Beside the optimization of checkerboard designs, the benefit of powerful optimization strategies of experimental designs to economize and improve experimental setups could also be used on various experimental settings. The herein developed designs will be used and evaluated in further *in vitro* experiments to examine drug interactions.

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at https://doi.org/10.1007/s11095-022-03396-7.

Author Contributions SGW and NK planned the study; NK and RA conducted the research: NK wrote the original draft: NK, RA, NG, WC and SGW wrote, reviewed, edited and approved the final manuscript.

Funding Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL. This project resulted from a German–French research cooperation called 'CO-PROTECT' and was supported by a grant from the Federal Ministry of Education and Research (BMBF), Germany, grant agreement number 16GW0249K, and by a grant from the National Agency of Research (ANR), France, grant agreement number R19094GG.

Data Availability The datasets generated and analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Declarations

Conflict of Interest Niklas Kroemer, Romain Aubry, Nicolas Grégoire, William Couet and Sebastian G. Wicha declare that they have no conflict of interest.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/.

References

1. Tyers M, Wright GD. Drug combinations: a strategy to extend the life of antibiotics in the 21st century. Nat Rev Microbiol. 2019;17(3):141–55.
2. Doern CD. When does 2 plus 2 equal 5? A review of antimicrobial synergy testing. J Clin Microbiol. 2014;52(12):4124–8.
3. Orhan G, Bayram A, Zer Y, Balci I. Synergy tests by E test and checkerboard methods of antimicrobial combinations against Brucella melitensis. J Clin Microbiol. 2005;43(1):140–3.
4. Wicha SG, Kees MG, Kuss J, Kloft C. Pharmacodynamic and response surface analysis of linezolid or vancomycin combined with meropenem against Staphylococcus aureus. Pharm Res. 2015;32(7):2410–8.
5. Chen C, Wicha SG, Nordgren R, Simonsson USH. Comparisons of analysis methods for assessment of pharmacodynamic interactions including design recommendations. AAPS J. 2018;20(4):77.
6. Atkinson AC, Donev AN. Optimum experimental designs. Oxford: Oxford University Press; 1992.
7. Retout S, Duffull S, Mentré F. Development and implementation of the population Fisher information matrix for the evaluation of population pharmacokinetic designs. Comput Methods Programs Biomed. 2001;65(2):141–51.
8. Wicha SG, Chen C, Clewe O, Simonsson USH. A general pharmacodynamic interaction model identifies perpetrators and victims in drug interactions. Nat Commun. 2017;8(1):2129.
9. Bliss CI. The toxicity of poisons applied jointly. Ann Appl Biol. 1939;26(3):585–615.
10. R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing; 2020. p. https://www.R-project.org.
11. Fishburn PC. Letter to the Editor—Additive utilities with incomplete product sets: Application to priorities and assignments. Oper Res. 1967;15(3):537–42.
12. Nelder JA, Mead R. A simplex method for function minimization. Comput J. 1965;7(4):308–13.
13. Byrd RH, Lu P, Nocedal J, Zhu C. A limited memory algorithm for bound constrained optimization. SIAM J Sci Comput. 1995;16(5):1190–208.
14. Soetaert K, Petzoldt T, Setzer RW. Solving differential equations in R: Package deSolve. J Stat Softw. 2010;33(9):1–25.
15. Gibson B, Wilson DJ, Feil E, Eyre-Walker A. The distribution of bacterial doubling times in the wild. Proc R Soc B Biol Sci. 2018;285(1880):20180789.

16. Spilker ME, Vicini P. An evaluation of extended vs weighted least squares for parameter estimation in physiological modeling. J Biomed Inform. 2001;34(5):348–64.
17. Akaike H. A new look at the statistical model identification. IEEE Trans Automat Contr. 1974;19(6):716–23.
18. Seurat J, Nguyen TT, Mentré F. Robust designs accounting for model uncertainty in longitudinal studies with binary outcomes. Stat Methods Med Res. 2020;29(3):934–52.
19. Loingeville F, Nguyen TT, Riviere MK, Mentré F. Robust designs in longitudinal studies accounting for parameter and model uncertainties–application to count data. J Biopharm Stat. 2020;30(1):31–45.
20. Jones B, Allen-Moyer K, Goos P. A-optimal versus D-optimal design of screening experiments. J Qual Technol. 2021;53(4):369–82.

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

Pharmaceutical Research
Electronic Supplementary Material

Optimized rhombic experimental dynamic checkerboard designs to elucidate pharmacodynamic drug interactions of antibiotics

Niklas Kroemer[1], Romain Aubry[2,3], William Couet[2,3,4], Nicolas Grégoire[2,3,4], Sebastian G. Wicha[1,#]

[1]Dept. Of Clinical Pharmacy, Institute of Pharmacy, University of Hamburg, Hamburg, Germany

[2]Inserm U1070, Poitiers, France

[3]Université de Poitiers, UFR de Médecine Pharmacie, Poitiers, France

[4]CHU de Poitiers, laboratoire de Toxicologie-Pharmacologie, Poitiers, France

[#] Correspondance to:

Prof. Dr. Sebastian G. Wicha

sebastian.wicha@uni-hamburg.de

Tel.: +49 40 42838-3487

Dept. of Clinical Pharmacy

Institute of Pharmacy

University of Hamburg

Bundesstr. 45

20146 Hamburg

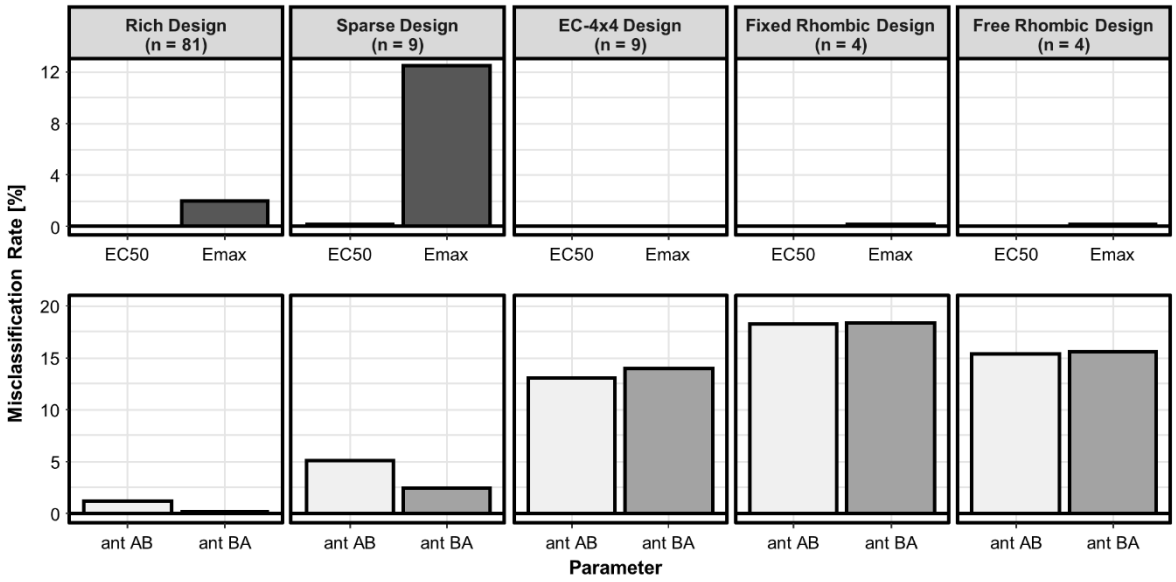
Supplement Text 1: Materials and Methods: SSE for strong monodirectional antagonisms

To evaluate the different experimental designs in their ability to identify very strong monodirectional antagonistic interactions where one drug fully suppresses the effect of the companion drug an SSE with the following adjustments was conducted: the INT-parameters for one drug was set to 99 for competitive EC50 interactions or to -0.99 for allosteric Emax antagonisms. The INT parameter of the combination partner was set to 0. To account for the monodirectional interactions the criterion for a correct classified interaction was adjusted and a conservative additivity margin for the INT parameter of -0.2 to 0.2 was added. In this case an additivity margin means a threshold value of an INT parameter that is necessary to identify a synergistic or antagonistic interaction over additivity.

Supplement Text 2: Results: SSE for strong monodirectional antagonisms

The misclassification rates for the SSE evaluating strong monodirectional antagonistic interactions are displayed on Supplement Figure 1. The misclassification of EC50 or Emax interactions are similar to interactions with more moderate interaction effect sizes. The identification of Emax interactions by the conventional sparse design was worst, which corresponded to the very small AIC differences when discriminating both types of interactions (Supplement Table I).

Comparing the misclassification rates of the antagonistic interactions, the two groups of conventional and EC-based designs clearly differed. While the conventional rich and sparse designs display misclassification rates < 5.08%, all EC-based designs misclassified > 12.99% of the antagonistic interactions.



Supplement Figure I: Misclassification rates of the different checkerboard designs in the SSE study investigating strong monodirectional antagonistic interactions. Classification rates for discriminating competitive (EC50) or allosteric (Emax) interactions were calculated as well as for identifying the correct type of the interaction (ant AB: antagonism drug A affected by drug B, ant BA: antagonism drug B affected by drug A). n represents the number of combination scenarios included in the respective experimental design.

Supplement Table I SSE statistics on the ability of the different experimental designs to discriminate between EC50 and Emax interactions when analyzing strong antagonistic interactions.

	Reference designs			**Rhombic designs**	
	conventional		**EC 4x4**	**fixed**	**free**
	rich	**sparse**			
Combination scenarios	81	9	9	4	4
Min. AIC[a] difference for interaction discrimination (EC50, Emax) in ≥ 95% of the simulations	19.05	1.03	28.85	18.05	14.10

[a]AIC, Akaike Information criterion

Supplement Text 3: Discussion: SSE for strong monodirectional antagonisms

Very strong interactions as full antagonism can be challenging for experimental designs. Especially EC-based designs showed inferior classification of the interactions, because their flexible and adaptive layout is linked to the drug potencies in opposite to wider standard concentrations as the conventional rich or conventional sparse design. Therefore, the concentrations to quantify very strong interactions can lay outside the concentration range of the experimental design, which is less likely to happen in an unspecific design with standardized concentration levels. Therefore, it would always be recommended to check the results for biological plausibility and consider retesting, when strong interactions occur.

10. Screening de l'interaction pharmacodynamique entre la ceftazidime/avibactam et la colistine

La première phase du projet Co-Protect consistait à réaliser un screening *in vitro* pour évaluer l'interaction pharmacodynamique entre la ceftazidime/avibactam (CZA) et la colistine (CST) utilisées en combinaison contre un large panel de 11 souches *E. coli* et 9 *K. pneumoniae* multirésistantes. La réalisation de ce screening a permis de mettre en application le design expérimental de checkerboard proposé dans l'Article 1. Ces interactions PD ont ensuite été caractérisées à l'aide du modèle GPDI par comparaison de l'effet attendu (*i.e.* CFU à 24 h) sous l'hypothèse d'additivité et l'effet observé. Une interaction antagoniste entre CZA et CST a systématiquement été identifiée contre les 11 souches *E. coli* (*i.e.* l'effet observé en combinaison était inférieur à celui attendu sous l'hypothèse d'indépendance de Bliss) tandis que les résultats tendaient vers une interaction synergique contre les souches de *K. pneumoniae*. Ces résultats ont été partagés au 32ème congrès ECCMID sous forme de poster, présenté ci-dessous.

À la suite de ce screening, plusieurs souches cliniques multi-résistantes de *K. pneumoniae* ont été sélectionnées pour réaliser des expériences de time-kill curve dans le but d'étudier l'effet de la ceftazidime/avibactam seule, de la colistine seule et de leur association au cours du temps et d'évaluer leur impact sur l'émergence de résistance. L'interaction PD entre ces antibiotiques a été caractérisée à l'aide du modèle GPDI (cf. paragraphe 4.6.2). Ces travaux sont présentés dans l'Article 2.

E-poster présenté au 32ème congrès ECCMID (European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Disease)

Systematic interaction screening of ceftazidime/avibactam and colistin against carbapenem-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*

Romain Aubry[1,2], Julien Buyck[1,2], Sebastian G Wicha[3], Jean-Winoc Decousser[4], Patrice Nordmann[5], William Couet[1,2,6], Nicolas Gregoire[1,2,6]

[1]Inserm U1070, Poitiers, France

[2]Université de Poitiers, UFR de Médecine-Pharmacie, Poitiers, France

[3]Dept. of Clinical Pharmacy, Institute of Pharmacy, University of Hamburg, Hamburg, Germany

[4]DYNAMYC Team – EA 7380, Faculté de Santé, Université Paris-Est-Créteil Val-De-Marne, France

[5]Medical and Molecular Microbiology, University of Fribourg, Fribourg, Switzerland

[6]CHU de Poitiers, département de toxicologie et pharmacocinétique, Poitiers, France

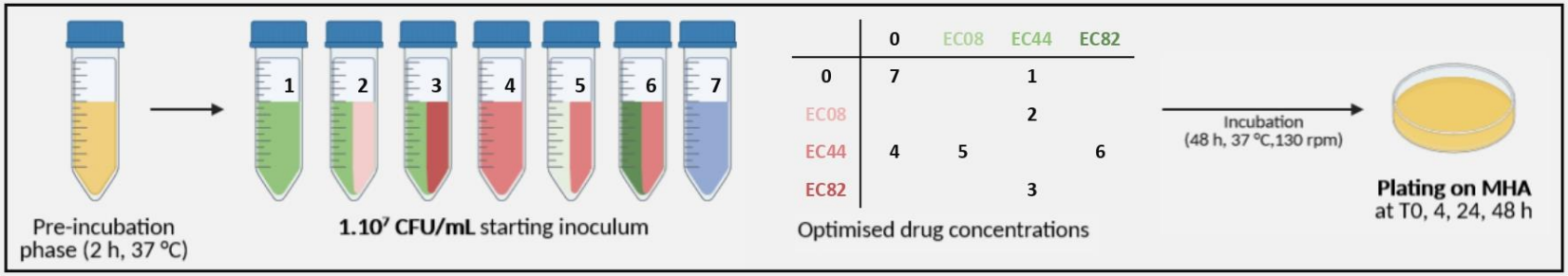
Background

Ceftazidime/avibactam (CZA) is a new beta-lactam/beta-lactamase inhibitor displaying activity against multidrug resistant Enterobacterales in particular Ambler class A carbapenemase producers (KPC, OXA-48). However **resistance to CZA** has emerged [Humpries et al., 2015; Shields et al., 2016]. **Antimicrobial combination therapies** have been proposed to protect this novel drug against resistance emergence.

The **objective** of this study was **to evaluate *in vitro* the combination of CZA with colistin (CST)**, against several carbapenem-resistant E. coli and K. pneumoniae strains.

Materials and methods

Ceftazidime/avibactam and colistin, alone or in combination, were evaluated against 20 carbapenemase producing isogenic or clinical *E. coli* and *K. pneumoniae* strains (OXA-48, KPC-2, KPC-3). The screening consisted of **MIC** and **EC50** determinations followed by **dynamic checkerboard experiments** (n=2) with optimised concentration levels [PAGE 29 (2021) Abstr 9696] to characterize the **pharmacodynamic interactions between drugs**.



Dynamic checkerboard experiment using optimised ceftazidime/avibactam and colistin concentrations

The monotherapy drug effect was described using a sigmoidal Emax model and the **general pharmacodynamic interaction (GPDI) model** [Wicha et al, 2017] was implemented with Bliss Independence to assess the **pharmacodynamic interaction between drugs** and to identify the perpetrator(s) drug responsible for the interaction as well as the affected parameter (Emax or EC50).

Results

E. coli interaction screening

All the strains were **susceptible to CZA and CST** as shown in table 1 (EUCAST breakpoints > 8 and 2 mg/L, respectively).

The observed effect of the CZA-CST combination was always lower than the predicted effect under the non interaction assumption defined by Bliss Independence. Accordingly the GPDI model systematically identified an **antagonism**. CZA and CST were identified as perpetrator of the interaction in 3 and 5 strains respectively, while bidirectional interaction (i.e. both drugs affected each other) on EC50 was observed in 3 strains.

Strain	CZA MIC (mg/L)	CST MIC (mg/L)	Interaction type	Affected PD-parameter	Perpetrator(s) of the interaction	Maximum fractional shift of the affected PD-parameter (INT)
***E. coli* Wild-type**	0.06	0.125	Antagonism	Emax	CZA	-99% [-62% ; -138%]
***E. coli* OXA-48**	0.125	0.125	Antagonism	Emax	CZA	-99% [-71% ; -129%]
***E. coli* OXA-181**	0.06	0.25	Antagonism	Emax	CZA	-95% [-61% ; -130%]
***E. coli* KPC-2**	0.06	0.25	Antagonism	Emax	CST	-84% [-54% ; -114%]
***E. coli* KPC-3**	1	0.5	Antagonism	EC50	CZA CST	+79% [57% ; 102%] +71% [47% ; 95%]
***E. coli* OLA-HAM**	0.125	0.125	Antagonism	Emax	CST	-73% [-51% ; -95%]
***E. coli* MER-MIL**	0.25	0.25	Antagonism	Emax	CST	-77% [-53% ; -100%]
***E. coli* N1067**	0.125	0.125	Antagonism	Emax	CST	-97% [-68% ; -125%]
***E. coli* N790**	0.06	0.125	Antagonism	Emax	CST	-89% [-58% ; -119%]
***E. coli* JUM-JEA**	0.25	0.06	Antagonism	EC50	CZA CST	+103% [62% ; 144%] +124% [77% ; 171%]
***E. coli* YAL-AMA**	0.25	0.25	Antagonism	EC50	CZA CST	+114% [113% ; 115%] +112% [73% ; 151%]

Table 1. Estimated interactions between CZA and CST using the GPDI model for *E. coli* strains

K. pneumoniae interaction screening

All the strains were **susceptible to CZA and CST** except one clinical *K. pneumoniae* isolate resistant to CST as shown in Table 2 (breakpoints > 8 and 2 mg/L, respectively).

According to the GPDI model, **no interaction** (additivity) between CZA and CST was found in 3 strains, while a **synergistic effect**, resulting in EC50 reduction, was observed in 5 strains and one **bidirectional asymmetry** was found in the remaining strain.

CZA and CST were identified as perpetrator of the synergy in 3 and 2 strains respectively.

Strain	CZA MIC (mg/L)	CST MIC (mg/L)	Interaction type	Affected PD-parameter	Perpetrator of the interaction	Maximum fractional shift of the affected PD-parameter (INT)
K. pneumoniae Wild-type	0.06	0.25	Synergy	EC50	CST	-27% [-15% ; -39%]
K. pneumoniae OXA-48	0.06	0.25	Asymmetry	EC50	CZA CST	-4% [-2% ; -6%] +126% [22% ; 231%]
K. pneumoniae KPC-2	0.06	0.125	Additivity	None		
K. pneumoniae KPC-3	0.25	0.25	Synergy	EC50	CZA	-9% [-4% ; -15%]
K. pneumoniae SAK-MAP	1	0.25	Synergy	EC50	CZA	-39% [-16% ; -62%]
K. pneumoniae N864	2	0.25	Synergy	EC50	CZA	-44% [-14% ; -75%]
K. pneumoniae N1082	2	0.25	Additivity	None		
K. pneumoniae R307	4	0.125	Additivity	None		
K. pneumoniae 2977	2	32	Synergy	EC50	CST	-78% [-70% ; -95%]

Table 2. Estimated interactions between CZA and CST using the GPDI model for *K. pneumoniae* strains

Conclusion

In vitro, the **combination of CZA with CST appeared more promising for the treatment of carbapenem-producing *K. pneumoniae* than *E. coli*** since the results tended towards synergy. Further experiments, including time kill curves, are being conducted to better characterise this combination in *K. pneumoniae* isolates.

11. Article 2 : An improved PKPD modelling approach to characterize the pharmacodynamic interaction over time between ceftazidime/avibactam and colistin from in vitro time-kill experiments against multidrug resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates

Article soumis dans **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**

Title

An improved PKPD modelling approach to characterize the pharmacodynamic interaction over time between ceftazidime/avibactam and colistin from *in vitro* time-kill experiments against multidrug resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates

Authors

Romain Aubry[1,2], Julien Buyck[1,2], Laure Prouvensier[1,3], Jean-Winoc Decousser[4,5], Patrice Nordmann[6,7,8], Sebastian G. Wicha[9], Sandrine Marchand[1,2,3], Nicolas Grégoire[1,2,3,#]

Institutions

[1]Inserm U1070, Poitiers, France

[2]Université de Poitiers, UFR de Médecine Pharmacie, Poitiers, France

[3]CHU de Poitiers, laboratoire ou département, Poitiers, France

[4]Department of Bacteriology and Infection Control, University Hospital Henri Mondor, Assistance Publique - Hôpitaux de Paris, Créteil, France.

[5]EA 7380 Dynamyc Université Paris - Est Créteil (UPEC), Ecole nationale vétérinaire d'Alfort (EnvA), Faculté de Médecine de Créteil, Créteil, France.

[6]Medical and Molecular Microbiology, Faculty of Science and Medicine, University of Fribourg, Fribourg, Switzerland

[7]Swiss National Reference Center for Emerging Antibiotic Resistance (NARA), University of Fribourg, Fribourg, Switzerland

[8]Institute for Microbiology, University of Lausanne and University Hospital Centre, Lausanne, Switzerland

[9]Deptartment of Clinical Pharmacy, Institute of Pharmacy, University of Hamburg, Hamburg, Germany

[#]Correspondance to: nicolas.gregoire@univ-poitiers.fr; Tel: +33 5 49 36 64 36

Keywords

Antimicrobial combination, PKPD modelling, ceftazidime/avibactam, colistin

Abstract

Background

Assessment of pharmacodynamic (PD) interactions between antibiotics is usually done using checkerboard at 24h. Time-kill curves (TKC) allow the evaluation of interactions over time but may pose interpretation problems.

Objectives

The objective of this study was to characterize the PD interaction over time between ceftazidime/avibactam (CZA) and colistin (CST) using TKC against four multi-drug resistant *Klebsiella pneumoniae* susceptible to both antibiotics and expressing a widespread carbapenemase determinant KPC-3.

Methods

In vitro TKCs were performed and analysed using PKPD modelling. The general pharmacodynamic interaction model was used to characterize PD interactions between drugs. The 95% confidence intervals (95%CIs) of the expected additivity and of the observed interaction were built using parametric bootstraps and compared to evaluate the *in vitro* PD

interaction over time. Further simulations were conducted to investigate the effect of the combination at varying concentrations typically observed in patients.

Results

Regrowth was observed in TKCs at high concentrations of drugs alone (from 4 to 32x MIC) while the combination systematically prevented the regrowth at concentrations close to the MIC. Significant synergy or antagonism were observed under specific conditions but overall, 95%CIs overlapped widely over time indicating an additive interaction between antibiotics. Moreover, simulations of typical PK profile at standard dosages indicated that the interaction should be additive in clinical conditions.

Conclusion

The nature of the PD interaction varied with time and concentration in TKC. Against the four *K. pneumoniae* isolates, the CZA+CST combination was predicted to be additive and to prevent the emergence of resistance at clinical concentrations.

Introduction

Among the most difficult to treat bacterial infections, those caused by carbapenem-resistant Enterobacterales (CRE) which include carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* (KPC) constitute a major threat (1). Ceftazidime/avibactam (CZA) is a recent beta-lactam/beta-lactamase inhibitor displaying activity against many types of multi-drug resistant (MDR) Gram-negative bacteria including KPC producers (2). Despite its limited use, *in vitro* and *in vivo* resistance to CZA have been described in *K. pneumoniae* (3-5). To prevent and/or cure of emerging antimicrobial resistance, antibiotic combination therapy is one of the strategy (6). In

this context, old antibiotics such as polymyxins (colistin (CST) and polymyxin B) have regained interest to increase the antimicrobial panoply and possibly prevent emergence of resistance. Previous *in vitro* studies have reported heterogeneous synergy rates of polymyxins in combination with many antibiotics against *K. pneumoniae* (7-9) but only few studies have considered the combination with CZA (10, 11). Because of the diversity of combinations and bacterial strains, it is necessary to develop suitable methodology for selecting best drug combinations.

Traditionally, pharmacodynamic (PD) interactions of combined antibiotics are evaluated by *in vitro* checkerboard experiments, visual evaluation of the bacterial growth at 24 h, calculation of the fractional inhibitory concentration index (FICI) and classified as synergy, additivity or antagonism (12). However, several drawbacks have been reported for this methodology since the effect, measured at a single time point, is based on a discrete output (growth / no growth of the bacteria) and does not inform about the emergence of resistances over time (13,14).

In vitro time-kill curves (TKC) have been extensively used to study the time-course of effect of antibiotics alone and bacterial regrowth (15, 16), but have been poorly used to investigate antibiotic combinations (17, 18). The longitudinal data from TKCs in combination can be analysed using semi-mechanistic pharmacokinetic/pharmacodynamic (PKPD) models (19-22). As it is the case with checkerboard data, it may be useful to classify the PD interactions observed in these experiments as synergistic, additive, or antagonistic. However, compared to the checkerboards, there is an additional degree of complexity since the interactions are also evaluated over time.

Characterization of the type of interaction requires to predict the expected effect under an assumption of additivity of the effects of each antibiotic (e.g. Loewe additivity (68)(23) or Bliss independence (24)). Among the few papers that reported TKCs with antibiotics in combination and characterized the type of interaction using PKPD models, the criterion for model selection was based on a statistical comparison of the interaction parameter (25-27). However, a significant change of the interaction parameter does not necessarily translate into a significant change of the combination effect. To our knowledge, no study has characterized a PD interaction based on the statistical comparison of effects over time. Such analysis would be to compare the confidence intervals of the effect predicted under the additivity assumption to those obtained experimentally in combination, and where an overlap of these intervals would mean a non-significant difference (*i.e.* an additive interaction) (28). The construction of these confidence intervals is based on the uncertainty of the parameter estimates which can be calculated by different methods including the asymptotic variance-covariance matrix (29), the parametric or non-parametric bootstraps (30) and the Sampling Importance Resampling (SIR) (31).

The objective of this study was to characterize the PD interaction over time between CZA and CST using TKC data against four MDR *K. pneumoniae* isolates expressing the same carbapenemase. A comparison of 95% confidence intervals between the observed effect in combination and the expected effect under the additivity assumption was performed and further simulations were conducted to investigate the effect of the combination at varying concentrations typically observed in patients.

Materials and Methods

Antibiotics

Ceftazidime and avibactam were purchased from MedChemExpress (NJ, USA). Colistin was purchased from Sigma Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France). Stock solutions of antibiotics (10,240 mg/L) were prepared in sterile water, stored at -80°C and diluted in Mueller Hinton Broth II cation-adjusted (MHB) on the day of experiment to achieve the desired concentrations.

Strains

Four clinical *K. pneumoniae* isolates, susceptible to CZA and CST, obtained from the National Reference Center for Emerging Antibiotic Resistance (NARA, Fribourg, Switzerland), were selected from its human strain collection from 2019 to 2021. They were used for *in vitro* time-kill experiments for an in-depth evaluation of the CZA+CST combination.

In vitro susceptibility testing

Minimum Inhibitory Concentrations (MIC) of CST and of CZA in the presence of 4 mg/L of avibactam were determined for each strain by microdilution, according to the EUCAST guidelines (32).

Static time-kill experiments

In vitro time-kill experiments included a growth control, single drug experiments with CST ranging from 0.125 to 32 times the MIC with two-fold serial dilution or CZA (with fixed avibactam concentration of 4 mg/L) ranging from 0.125 to 8 times the MIC. Combinations of both drugs were tested at several concentrations (at least 16 combinations of CZA+CST, ranging from 0.25+0.25 to 2+2 times the MIC, were systematically performed for each strain).

One microliter of frozen bacteria was taken from -80°C storage and incubated overnight in 10 mL of MHB at 35 ± 2°C with constant shaking (130 rpm). A 200 µL volume of this bacterial suspension was diluted in 10 mL of MHB and pre-incubated (2 h, 35 ± 2°C, 130 rpm) to reach exponential growth phase. The optical density (600 nm) was adjusted between 0.08 and 0.11, corresponding to ± 1.10^8 CFU/mL bacterial density. Then, 50 µL of the bacterial suspension were added to each culture tube to achieve a 5.10^5 CFU/mL inoculum. The preparation containing the antibiotics at targeted concentrations was incubated at 35 ± 2°C with constant shaking (130 rpm) for 30 h. Samples were taken at 0, 2, 4, 8, 24 and 30 h, serially diluted in NaCl 0.9% and plated on MHA using an easySpiral automatic plater (Interscience, France). Plates were incubated 24 h at 35 ± 2°C and CFU were enumerated using a SCAN 300 colony counter (Interscience, France). The lower limit of quantification was 200 CFU/mL. Each experimental condition was tested one to four times.

Sequencing before/after antibiotic exposure

All isolates were sequenced before drug exposure in order to investigate their resistance genes. Briefly, the genomes were sequenced using Illumina technology, as previously described (33).

Then, the genomes were assembled with Shovill v1.0.4 (34) and the genetic background and resistome were identified using Kleborate version 2.0.0 software (35). In case of regrowth at 24 h, a volume of 1 mL from culture tubes with CZA alone, CST alone or the combination was sampled, centrifuged at 2500 RCF for 6 minutes and bacterial pellets were picked up and cultured to investigate gene mutations following the procedure described above. The growth control was also sampled at 24 h to exclude random mutations unlinked to antibiotic treatment.

PKPD modelling of single drug effects and expected additivity in TKC

The procedure for the development of the PKPD model and the evaluation of the PD interaction is illustrated on the flowchart Figure 1. Datasets were prepared using R software (version 3.6.2) and the parameters of the model were estimated using NONMEM software (version 7.4) with the Laplacian algorithm. Data below the limit of quantification were handled using Beal's M3 method (36). Evaluation and selection of the model were based on objective function value (OFV), goodness of fit plots (including individual fits, predicted vs observed CFU and Visual Predictive Checks (VPCs)) and accuracy of parameter estimates (relative standard errors).

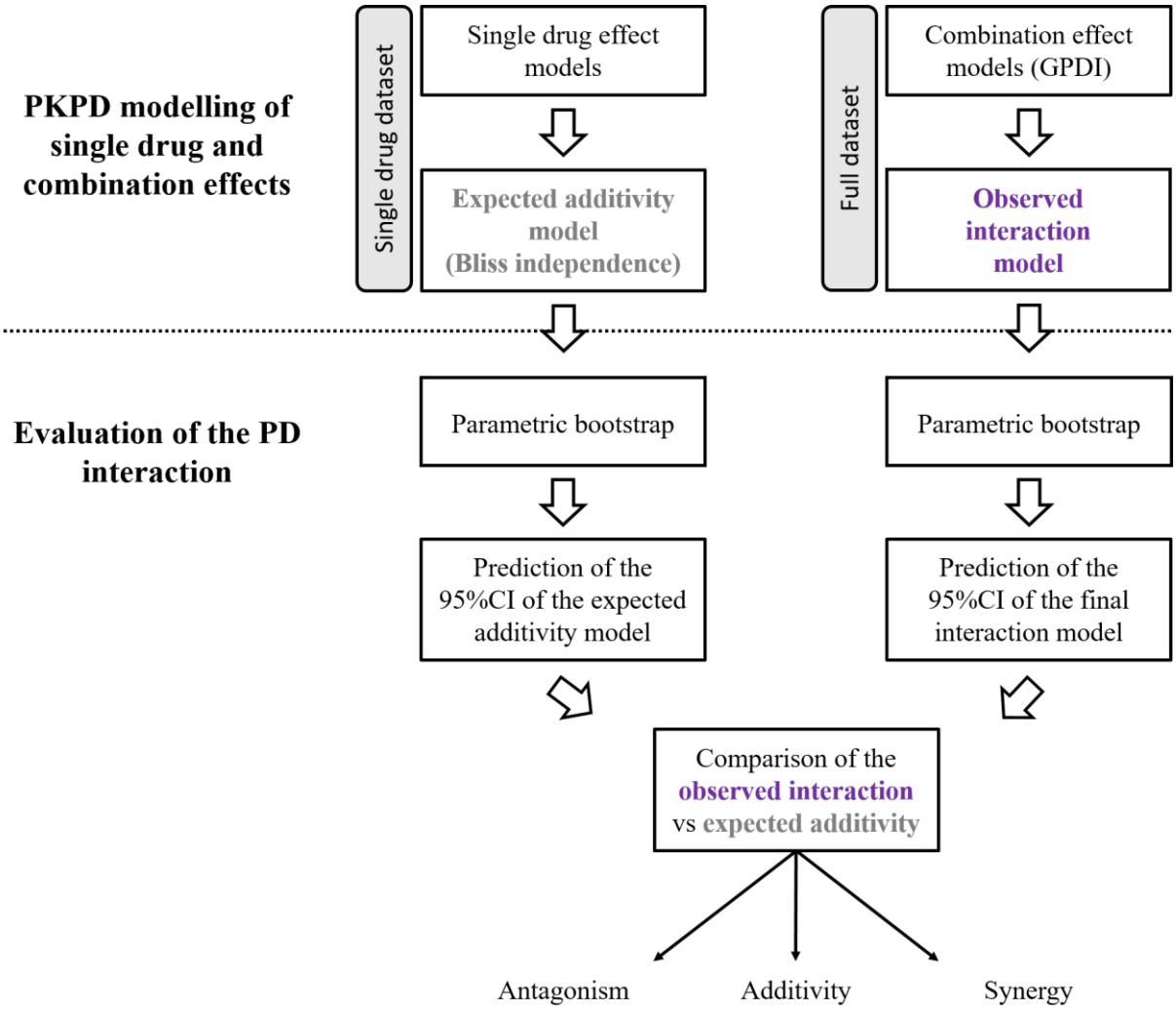


Figure 1. Flowchart for the development of the PKPD model and the evaluation of the PD interaction

In the first step of the analysis, only the time-kill data from the growth control and from the single drug experiments were used to determine the single drug effect models. The inoculum size was estimated and a logistic growth model with a single homogeneous bacterial population was used to describe the growth control experiments. Both CZA and CST were assumed to induce bacterial killing according to a sigmoidal Emax model.

In order to explain the bacterial regrowth observed in TKCs, it was assumed that bacteria could developed adaptive resistances under antibiotic exposure. This process was modelled using two

virtual compartments describing the fraction of bacteria in the adapted or in the non-adapted state to the drug (16). At start of the experiment, all bacteria were assumed non-adapted. No reversal of adaptive resistance was considered since the drug concentrations were assumed constant during the experiment.

After testing different adaptation models on Emax and EC_{50}, the adaptive resistance of the bacteria over time was assumed to proportionally reduce the Emax parameter, until reaching a residual effect of the corresponding drug when all bacteria reached the adapted state (see Supplementary Code S1). The only random effect estimated in the model was the residual error in CFU prediction, considered additive in $\log_{10}$ scale.

The same structure of the model was used to describe the effect of CZA or CST against the four isolates but different parameter values were estimated for each one. Finally, the expected additivity model, describing the effect of the combination under the additivity assumption (*i.e.* in absence of PD drug interaction), was defined using the Bliss Independence criterion (67). The NONMEM control stream of the expected additivity model for the NARA1295 isolate is provided in Supplementary Code S1.

Construction of the 95% confidence interval (95%CI) of the expected additivity

To assess the uncertainty of the model predictions and build the 95%CI of the expected additivity, a parametric bootstrap was applied with the SSE script of PsN 2.9.2 (37). A thousand datasets were simulated using the expected additivity model previously developed, considering residual variability of the model. Subsequently, for each simulated dataset, the parameters of the expected additivity model were estimated. Runs with unsuccessful minimization or with

non zero-gradient at last iteration were excluded. Finally, individual predictions over time were obtained for each simulation and summary statistics (median, 2.5 and 97.5 percentiles) of bacterial counts were calculated over time in order to build the 95%CI.

PKPD modelling of the observed combination effects in TKC

In the second step of the analysis, combination effect models were developed using all the time-kill data (including growth control, single drug and combination experiments). The previous structural model for antibiotics alone was kept and the general pharmacodynamic interaction (GPDI) model (Equation 1) (38), implemented under the Bliss Independence hypothesis, was added to characterize the PD interactions between drugs.

$$\theta_{INT} = \theta_{mono} \times \left(1 + \frac{INT \times C_{perpetrator}^{\gamma INT}}{EC_{50_INT}^{\gamma INT} + C_{perpetrator}^{\gamma INT}}\right) \qquad \text{Equation 1}$$

Where θ_{INT} is the PD parameter of the victim drug (*i.e.* the drug affected by the interaction) modified in the presence of the perpetrator drug (*i.e.* the drug responsible for the interaction), θ_{mono} is the PD parameter of the victim drug used alone, INT (%) is the maximal fractional change of the affected PD parameter of the victim drug, EC_{50_INT} (mg/L) is the perpetrator drug concentration required to achieve 50% of INT and γ_{INT} is the sigmoidicity parameter for the combination effect.

The perpetrator drug could affect either the Emax, the EC_{50} or the K_{on} parameter of the victim drug. When several single interactions significantly decreased the OFV compared to the expected additivity, these interactions were combined in a single model. The selection of the model that best described the observed interaction, so called observed interaction model, was

based on the difference in OFV between models (likelihood ratio test with a first order risk, alpha, of 5%). The NONMEM control stream of the observed interaction model for the NARA1295 isolate is provided in Supplementary Code S2. Visual predicted Checks (VPCs) were drawn based on 1000 simulations using the observed interaction model, with the residual error as the only random effect. Median, 10^{th} and 90^{th} percentiles were calculated at each sampling time and VPCs were plotted to assess the ability of the model to describe the observed data.

Evaluation of the pharmacodynamic interaction in TKC

The 95%CI of the observed interaction was built following the same parametric bootstrap methodology than previously described for the 95%CI of the expected additivity. Both 95%CIs were laid out on the same figure for comparison. If the 95%CI of the observed interaction was lower than the 95%CI of the expected additivity (*i.e.* the upper boundary of the 95%CI of the observed interaction was under the lower boundary of the 95%CI of the expected additivity), a higher bacterial killing was observed and the combination was considered synergistic. If both 95%CIs overlapped the interaction was considered additive as no significant difference could be highlighted. If the 95%CI of the observed interaction was higher than the expected additivity (*i.e.* the lower boundary of the 95%CI of the observed interaction was above the upper limit of the 95%CI of the expected additivity), a lower bacterial killing was observed and the interaction was considered antagonistic. As the comparison was performed over the total duration of the time-kill, the type of interaction could vary over time.

Simulation of the combination effect at varying clinical concentrations

In order to evaluate the PD interaction predicted by our model in the case of variable concentrations (and not fixed as in TKCs), the expected effect in combination was simulated at concentrations mimicking the concentrations obtained for a typical patient after administration of standard dosage regimens. PKPD simulations were performed using the PK model of CZA from *Sy et al.* (39) and the PK model of CST from *Kristoffersson et al.* (40) assuming a typical patient (weight = 74.4 kg, creatinine clearance = 120 mL/min). The clinical dosing regimen of ceftazidime/avibactam 2/0.5 g was administered every 8 h as a 2-h intravenous infusion and a loading dose of 9 million units (MIU) of colistin methanesulfonate sodium (CMS) followed by maintenance CMS doses (4.5 MIU) every 12 hours were administered as 30-minutes intravenous infusions.

Results

In vitro susceptibility testing

MICs of CZA and CST and the resistance genes of the four *K. pneumoniae* isolates are presented in Table 1. All the strains were susceptible to CZA (MICs ranging from 2 to 8 mg/L, EUCAST resistance breakpoint > 8 mg/L (41)) and to CST (MICs ranging from 0.125 to 0.25 mg/L, EUCAST resistance breakpoint > 2 mg/L (41)).

Table 1. Susceptibility to ceftazidime/avibactam and colistin of the *K. pneumoniae* isolates

MIC: Minimum inhibitory concentration; CZA: ceftazidime/avibactam (fixed at 4 mg/L), EUCAST resistance breakpoint > 8 mg/L; CST: colistin, EUCAST resistance breakpoint > 2 mg/L. [1] Resistance genes were identified using Kleborate software (35)

K. pneumoniae isolate	ST	Resistance genes[1]	CZA MIC (mg/L)	CST MIC (mg/L)
NARA1295	ST512	KPC-3, SHV-11 (35Q), TEM-1D, OmpK35 (25%), OmpK36 (GD)	8	0.125
NARA1584	ST101	KPC-3, SHV-1, OmpK35 (17%), OmpK36 (TD)	8	0.125
NARA1182	ST512	KPC-3, SHV-11 (35Q), OmpK35 (25%), OmpK36 (GD)	4	0.125
NARA 864	ST348	KPC-3, SHV-11 (35Q), TEM-1D, OXA-9	2	0.25

PKPD modelling of single drug and combination effects in TKC

A schematic representation of the model is shown on Figure 2. The model parameters characterizing the PD interaction between CZA and CST are given in Table 2. The full parameter estimates (including single drug effect models and bacterial growth) is given in Table S1. The fit between model predictions and observations is confirmed by the VPCs presented on Figure 3 for the NARA1295 isolate and on Figure S1-S3 for the other ones.

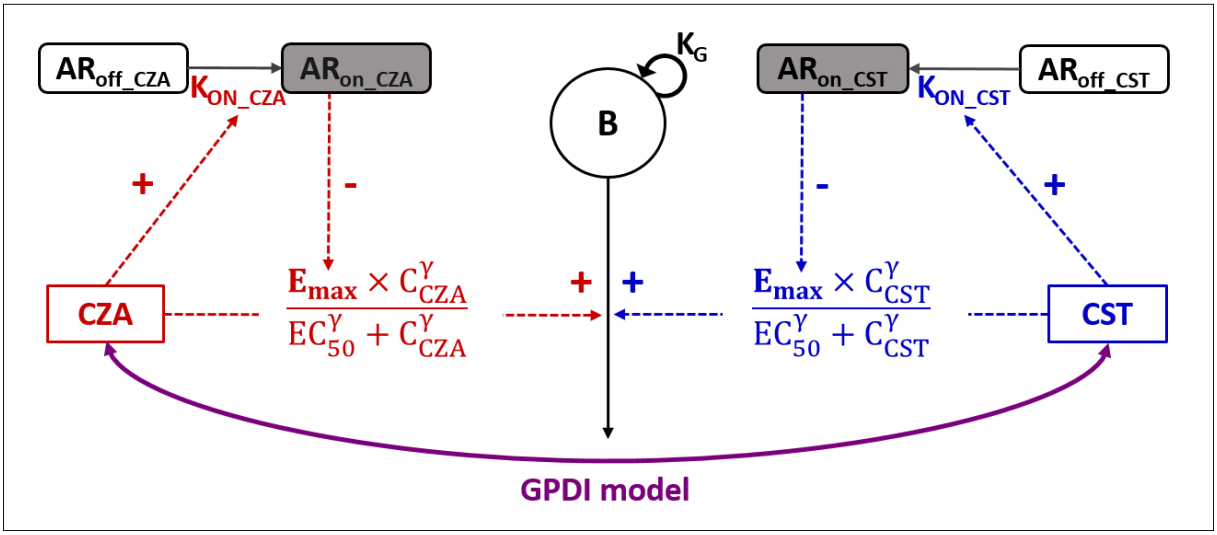


Figure 2. Pharmacodynamic model representation for time-kill experiments

B, total bacterial population; K_G, growth rate; AR_{off} and AR_{on}, states of adaptation; K_{on}, adaptation rate. Emax, maximum bactericidal effect (reduced proportionally to AR_{on} until reaching a residual drug effect); EC50, concentration for which effect is 50% of Emax; γ, power parameter for effect. The GPDI model was implemented to describe the interaction between CZA and CST (38).

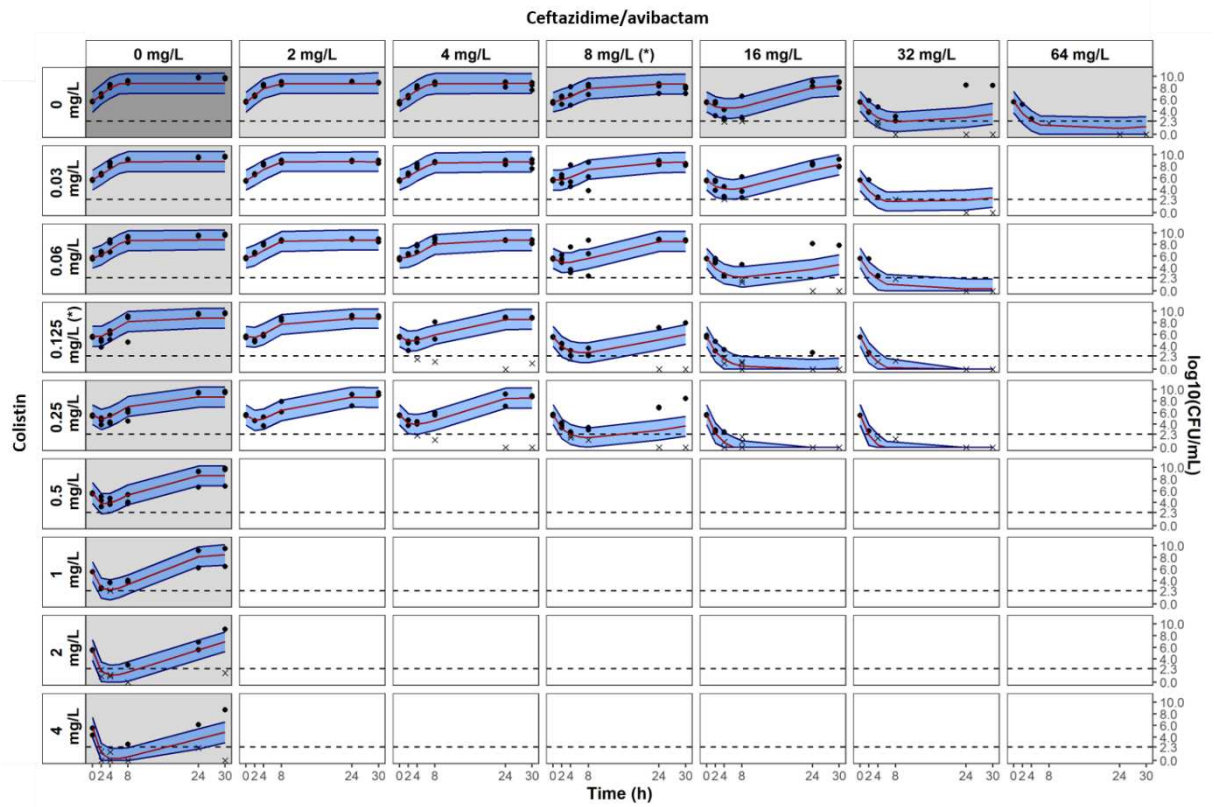


Figure 3. Visual Predictive Checks of the observed interaction model of time kill experiments for *K. pneumoniae* NARA1295

Grey and white panels are associated to single drug and combination experiments, respectively. Measured CFU are represented by dots. For graphical representation, data below limit of quantification are represented by cross at their measured values. Median percentile from simulations with the observed interaction model is represented by red line and the 80% prediction interval between 10^{th} and 90^{th} percentiles is represented by the blue shaded areas. Limit of quantification is represented by the dashed line at 2.3 log_{10}CFU/mL. MICs of CZA and CST are indicated by (*). Avibactam concentration was fixed at 4 mg/L.

For each isolate, after an initial decay (typically faster with CST than with CZA), regrowth was observed with drug alone at concentrations equal to their respective MICs. Depending on the strain, the concentrations of CZA or CST required to avoid the emergence of resistance were 4 to 8x the MIC and 16 to 32x the MIC respectively. In combination, concentrations of both drugs in the range of 1 to 2x the MIC systematically prevented the emergence of resistance.

Concentrations of 2 to 4x the MIC of CZA combined with low CST concentrations from 0.25 to 1x the MIC were also able to prevent the emergence of resistance.

Evaluation of the pharmacodynamic interaction in TKC

According to the GPDI model, CST decreased the EC_{50} of CZA by approximately 50% at maximum in the NARA1295, NARA1584 and NARA1182 isolates (Table 2). In the *K. pneumoniae* NARA864, CST reduced the Emax of CZA by 65% at maximum (Table 2).

Table 2. Interaction parameter estimates of the observed interaction models

[1](-) indicates a decrease of the parameter due to the interaction. CST: colistin; CZA: ceftazidime/avibactam (fixed to 4 mg/L). RSE%, Relative Standard Error (%).

Parameter	**Description**	***K. pneumoniae* NARA1295** **Median (RSE%)**	***K. pneumoniae* NARA1584** **Median (RSE%)**	***K. pneumoniae* NARA1182** **Median (RSE%)**	***K. pneumoniae* NARA864** **Median (RSE%)**
Perpetrator	Drug responsible for the interaction	CST	CST	CST	CST
INT_EC_{50}[1]	Maximal fractional change of the EC50 of the victim drug (%)	-51.4 (10%)	-48.3 (10%)	-48.6 (12%)	-
$EC_{50_INT_EC50}$	Concentration of the perpetrator drug required to achieve 50% of INT_EC_{50} (mg/L)	0.06 (5%)	0.06 (4%)	0.07 (17%)	-
γ_{INT_EC50}	Sigmoïdicity parameter for the combination effect	10 (fixed)	10 (fixed)	10 (fixed)	-
INT_Emax[1]	Maximal fractional change of the Emax of the victim drug (%)	-	-	-	-65.8 (16%)
$EC_{50_INT_Emax}$	Concentration of the perpetrator drug required to achieve 50% of INT_Emax (mg/L)	-	-	-	0.39 (fixed)
γ_{INT_Emax}	Sigmoïdicity parameter for the combination effect	-	-	-	1 (fixed)

Significant synergistic effects were observed at late times for the NARA1295 isolate at CZA concentrations lower than 8 mg/L (highlighted in green on Figure 4). On the contrary, significant antagonistic effects were observed for the NARA864 at CZA concentrations of 0.25-0.5 mg/L and CST at 0.25-0.5 mg/L (highlighted in red on Figure 5). For both NARA1584 and NARA1182, the 95%CI of the expected additivity and the 95%CI of the observed interaction model overlapped widely, indicating additive effects (Figure S4-S5). It should be noted that for those strains, the 95%CI of the expected additivity was wide and limited the power of the statistical comparison.

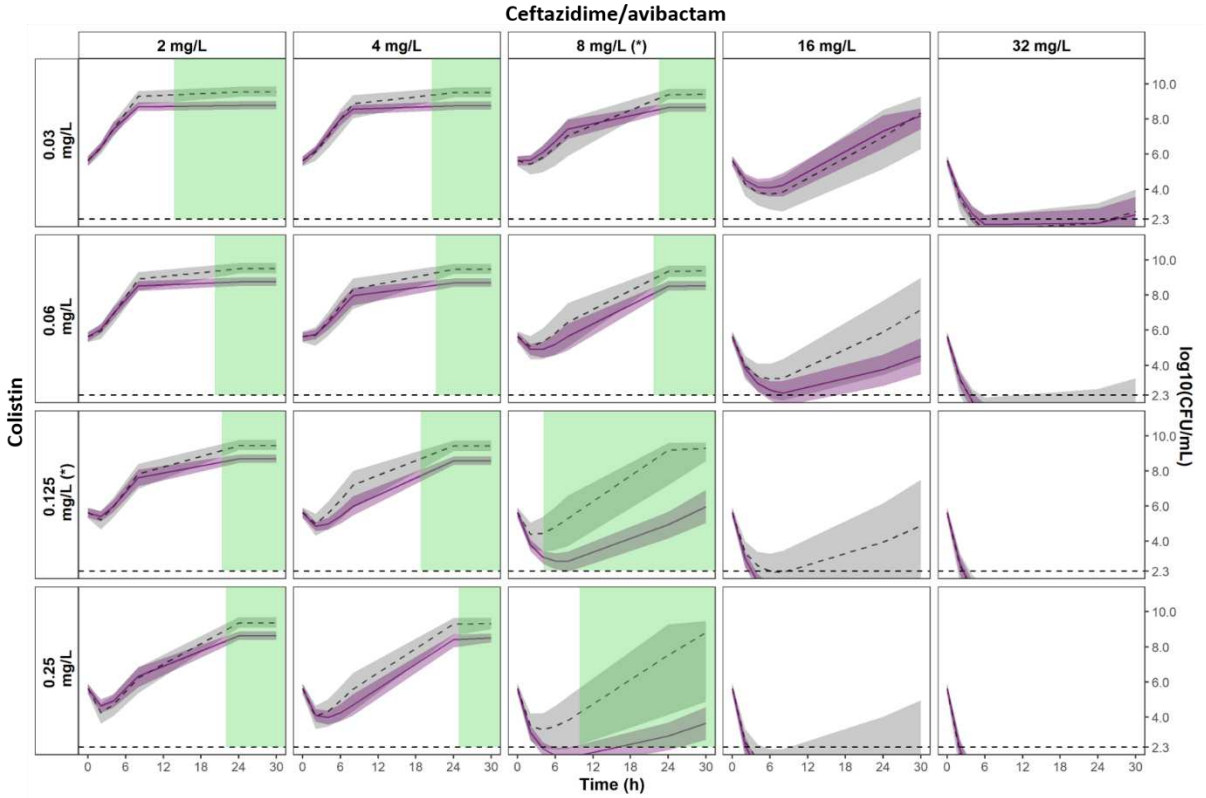


Figure 4. Comparison of the 95%CIs of the observed interaction versus the expected additivity for the *K. pneumoniae* NARA1295

The 95%CI of the expected additivity, obtained by parametric bootstrap, is represented by grey areas (n=980 runs) and the corresponding median percentile is represented by the dashed line. The 95%CI of the observed interaction is represented by light purple areas and the median percentile is represented by the solid line (n=976 runs). Statistically significant areas of synergy (non-overlapping 95%CI) are highlighted in green. The limit of quantification is represented by the horizontal dashed line at 2.3 log_{10}CFU/mL. MICs of CZA and CST are indicated by (*).

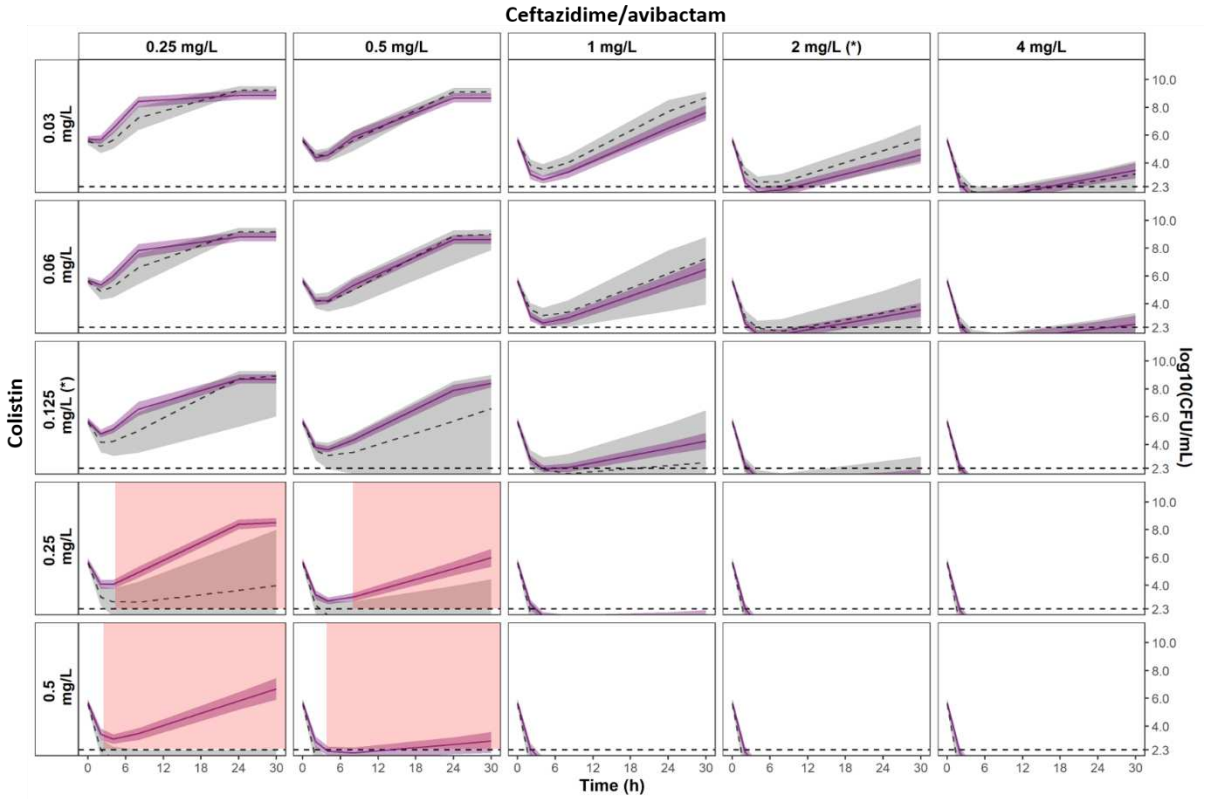


Figure 5. Comparison of the 95%CIs of the observed interaction versus the expected additivity for *K. pneumoniae* NARA864

The 95%CI of the expected additivity, obtained by parametric bootstrap, is represented by grey areas (n=1000 runs) and the corresponding median percentile is represented by the dashed line. The 95%CI of the observed interaction is represented by light purple areas and the median percentile is represented by the solid line (n=1000 runs). Statistically significant areas of antagonism (non-overlapping 95%CI) are highlighted in red. The limit of quantification is represented by the horizontal dashed line at 2.3 $\log_{10}$CFU/mL. MICs of CZA and CST are indicated by (*).

Simulation of the combination effect at clinical concentrations

Simulation results for the *K. pneumoniae* NARA1295 are presented in Figure 6. The usual dosing regimen of CST administered alone was predicted to be ineffective meanwhile CZA alone produced early killing of the bacteria followed by regrowth (Figure 6B). By combining both dosing regimens, the simulations predicted a complete eradication of the bacteria without regrowth. Moreover, simulations performed using the additivity assumption of the observed effects for antibiotics alone and simulations performed using the interaction model built from

the observed effects in combinations were very close, with 95%CIs systematically overlapping (Figure 6B). This meant that for varying concentrations such as those observed under clinical conditions, our *in vitro* data suggested that the PD interaction between CZA and CST should be additive.

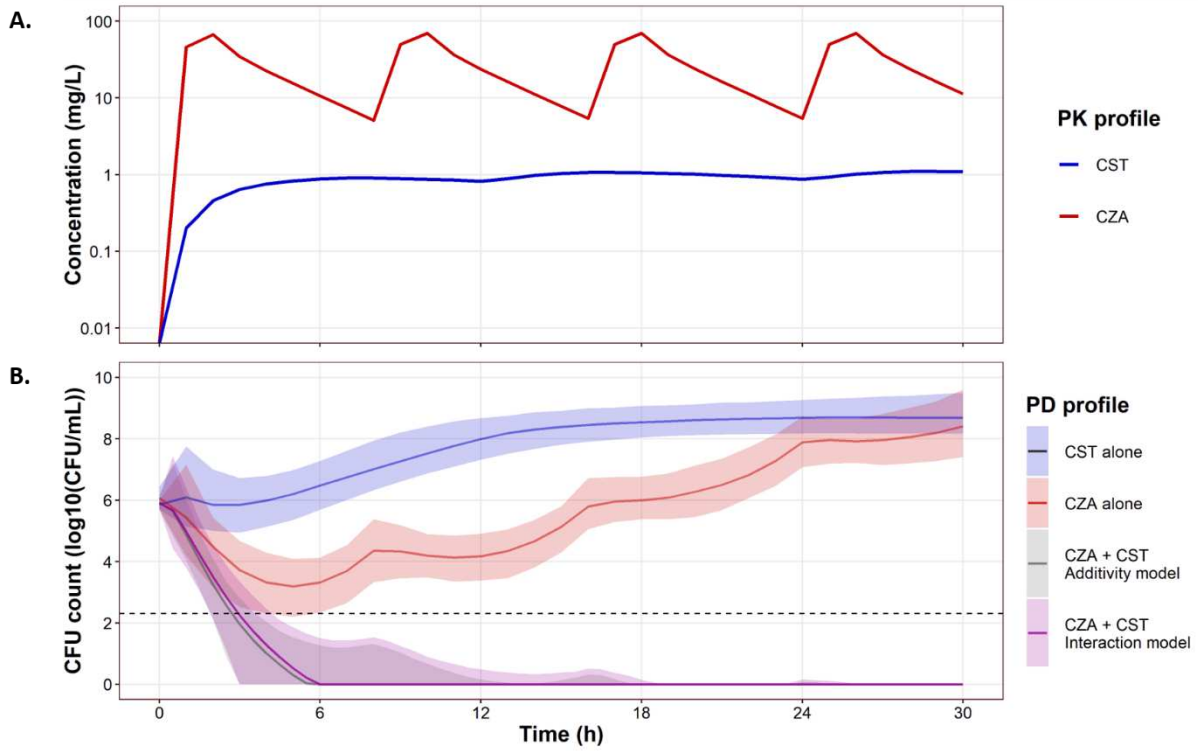


Figure 6. Simulation of expected *in vitro* effects (lower panel) in combination for typical concentration profiles (upper panel) obtained in patients after standard CZA (2/0.5 g q8h as 2-h infusion) and CST (9 MIU CMS + 4.5 MIU CMS q12h as 30-min infusion) doses.

Since the combined effect of the usual CZA and CST dosages was very strong, alternatives dosing regimens were simulated. Depending on the type of administration (intermittent or continuous infusion) and the simulated doses (to achieve the targeted average concentrations), the interaction could be additive or synergistic (Figures S6 and S7, simulated with large dataset to have a high statistical power).

Discussion

Various methods for characterizing PD interactions between antibiotics can be found in the scientific literature. The most frequent is the checkerboard method with turbidity readout at 24 h and calculation of FICI. If we had interpreted our experimental time-kill results as checkerboards, *i.e.* considering only the measurements at 24 h and a visible turbidity for bacterial counts higher than 1.10^7 CFU/mL, the combination would have been additive in the NARA1295 (FICI=0.5), NARA1182 (FICI=0.5) and NARA864 (FICI=0.8) and synergistic in the NARA1584 (FICI=0.4). Few articles in the literature characterized *in vitro* antibiotic PD interactions from time-kill experiments using semi-mechanistic PKPD modelling (42). In these cases, the comparison with different additivity models (Bliss, Loewe or other) was done by evaluating the improvement of the likelihood of the PKPD model when adding an interaction parameter. Considering only the statistical comparison of the interaction parameter, the effect would have been considered synergistic in three isolates (NARA1295, NARA1584 and NARA1182) and antagonistic in the remaining one (NARA864). However, interpreting a change in a PD parameter in combination may be complicated while the CFU profiles over time can highlight how this change impacts the effect. This was previously done by Chen *et al.* (43) to characterize the interaction between anti-tuberculosis drugs. They graphically compared the typical CFU profiles predicted under the expected additivity assumption to the typical profiles observed in combination. Yet, this "graphical" approach lacked a criterion for classifying the interaction as antagonistic, additive or synergistic. Therefore, we calculated the 95%CIs of the CFU profiles in order to conclude statistically about the type of interaction observed over time at different concentration levels. Overall, the results showed that, in the range of tested concentrations, the effects of CZA and CST were additive over time. However, looking in more detail synergistic effects were observed under specific conditions for NARA1295 and

NARA1584 (Figure 4 and S4, respectively) and antagonistic effects were observed when high concentrations of CST and low concentrations of CZA were associated for NARA864 (Figure 5).

A limitation of these results was that the type of interaction varied with antibiotic concentrations and time, so it was difficult to conclude globally for the combination studied. Of primary interest to clinicians is whether or not the combination will be effective in a clinical setting, *i.e.* with varying concentrations over time. This is why the expected *in vitro* effects for antibiotic concentrations typically observed in patients were simulated using PK models from the literature and the PD model developed with our experimental data. These simulations showed that the CZA+CST combination, used at usual dosing regimens against these four isolates, should be additive. It is also interesting to note that our simulations showed that the type of interaction could depend on the dosage regimen. Indeed, the type of interaction varied according to the concentration range and time, and thus we were able to determine some dosage regimens for which a synergistic effect was predicted while for others an additive effect was expected (Figures S6 and S7). In our case there was no need to look for a synergistic dosing regimen since our results suggested that the usual regimens should be effective, but one can imagine scenarios where dosing regimens could be optimized by seeking synergistic rather than additive (or antagonistic) interactions. Also, it should be noted that instead of doing simulations based on the PD model obtained from time-kill experiments with constant antibiotic concentrations, it would have been preferable to perform experiments with variable concentrations (hollow-fiber system), but these are much more labour intensive.

In order to construct the confidence intervals for comparing the profiles predicted under the expected additivity and the profiles obtained experimentally in combination, we performed a parametric bootstrap. Other methods for estimating parameter uncertainty were possible, and the variance-covariance matrix, computed during the $COVARIANCE step in NONMEM, was the fastest and easiest way to assess parameter uncertainty. However, the corresponding 95%CIs were quite large, and this method being not very robust under certain conditions (31), we tested other methods. A non-parametric bootstrap (with resampling in the original dataset) was not appropriate because stratification by concentration level would have led to an insufficient number of data per condition and to a resampling equivalent to the initial dataset. We therefore performed a parametric bootstrap, and the estimated 95%CI were significantly narrower than those obtained with the NONMEM variance-covariance matrix. As a comparison, we also performed a Sampling Importance Resampling (SIR) procedure (31, 44), using the covariance matrix from NONMEM $COV step as proposal distribution, and the results obtained were close to those of the parametric bootstrap (data not shown). There are therefore several possibilities for estimating the uncertainties of the model parameters and it is important to choose one that is adapted to the data. This choice will affect the size of the confidence intervals and therefore the conclusion regarding the type of interaction.

The power of the statistical comparison of the predicted effects, *i.e.* the probability of concluding to a significant difference from the predicted effects under the expected additivity model, depended on the width of the confidence intervals. In order to reduce the 95%CI of the expected additivity and increase the discriminating power of this analysis, it is necessary to limit the uncertainty of the PD model. This can be done by gathering more single drug data, or

by adapting the structure of the PKPD model to each antibiotic/strain pair. In order to facilitate inter-strain comparisons we chose the same PD model for the four isolates, but using different models we could have reduced the parameters uncertainty and thus reduced the 95%CI. Also, optimal design methodology can be used to develop the most informative experiment (42).

The PD interactions were characterized by comparison to the expected additivity defined by Bliss independence. We made this choice based on the assumption that CZA and CST effects were independent. However, we could have used another definition for classifying the PD interactions and the proposed method is applicable with other definitions such as Loewe additivity. In addition, the effect of the combination could be compared to the most active single agent or to a pharmacologically relevant threshold (e.g. a decrease in CFU counts ≥ 2-log10 compared to the most active single agent).

The CZA+CST combination was little studied *in vitro*. Shields et al. characterized the interaction between CZA and CST on carbapenem-resistant Enterobacterales (including KPC-producing *K. pneumoniae*) using TKCs but at a single CST concentration (2 mg/L) (10). They defined the synergy as a decrease in CFU counts at 24 h higher than 2-$\log_{10}$ compared to the most active single agent and the antagonism as an increase in CFU counts at 24 h higher than 1-$\log_{10}$ compared to the most active single agent and found synergy for 13% (3/24) of the strains, additivity for 41% (10/24) of the strains and antagonism for 46% (11/24) of the strains. Yet, it is undesirable to use only the CFU counts at 24 h since TKCs also provide information on the bacterial regrowth over time. Of note, none of the regrowth observed at 24 h in the

presence of one or both antibiotics was systematically related to gene mutations. Our approach showed that on our strains, the CZA+CST interaction was mainly additive and that synergistic or antagonistic effects could be observed at certain times and for specific concentration levels. Moreover, our results demonstrated that the clinical dosing regimens of both drugs administered in combination prevented the emergence of resistance against all the *K. pneumoniae* isolates whereas bacterial regrowth was observed with drugs given alone, particularly in those with MICs close to the breakpoint. Overall, these results support the potential of the CZA+CST combination.

In conclusion, our results showed that the type of interaction varied as a function of concentrations and time. The checkerboard methodology, which evaluates the interaction at a given time, is therefore insufficient. Time-kill curves, associated with PKPD modelling, can help to answer this question, particularly to characterize the pharmacodynamic interaction that is expected in clinical practice. Against these four MDR *K. pneumoniae* isolates, the CZA+CST combination was predicted to be additive at clinical concentrations and to prevent the emergence of resistance.

Acknowledgments

We thank Agnès Audurier (Université de Poitiers) and Théo Sauzet (Inserm U1070) for the technical support.

This project resulted from a German–French research cooperation called 'CO-PROTECT' and was supported by a grant from the Federal Ministry of Education and Research (BMBF), Germany, grant agreement number 16GW0249K, and by a grant from the National Agency of Research (ANR), France, grant agreement number ANR-19-AMRB-0003-01.

Author contributions

JB, NG and SM designed the study; RA and LP performed experiments; PN and JWD provided isolates and performed sequencing; RA, NG, SGW analysed the data; RA and NG wrote the manuscript; all authors reviewed the manuscript.

References

1. Nordmann P, Poirel L. 2019. Epidemiology and Diagnostics of Carbapenem Resistance in Gram-negative Bacteria. Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am 69:S521–S528.

2. van Duin D, Bonomo RA. 2016. Ceftazidime/Avibactam and Ceftolozane/Tazobactam: Second-generation β-Lactam/β-Lactamase Inhibitor Combinations. Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am 63:234–241.

3. Humphries RM, Yang S, Hemarajata P, Ward KW, Hindler JA, Miller SA, Gregson A. First Report of Ceftazidime-Avibactam Resistance in a KPC-3-Expressing Klebsiella pneumoniae Isolate. Antimicrob Agents Chemother 59:6605–6607.

4. Shields RK, Chen L, Cheng S, Chavda KD, Press EG, Snyder A, Pandey R, Doi Y, Kreiswirth BN, Nguyen MH, Clancy CJ. Emergence of Ceftazidime-Avibactam Resistance Due to Plasmid-Borne blaKPC-3 Mutations during Treatment of Carbapenem-Resistant Klebsiella pneumoniae Infections. Antimicrob Agents Chemother 61:e02097-16.

5. Findlay J, Poirel L, Juhas M, Nordmann P. 2021. KPC-Mediated Resistance to Ceftazidime-Avibactam and Collateral Effects in Klebsiella pneumoniae. Antimicrob Agents Chemother 65:e0089021.

6. Tyers M, Wright GD. 2019. Drug combinations: a strategy to extend the life of antibiotics in the 21st century. Nat Rev Microbiol 17:141–155.

7. Scudeller L, Righi E, Chiamenti M, Bragantini D, Menchinelli G, Cattaneo P, Giske CG, Lodise T, Sanguinetti M, Piddock LJV, Franceschi F, Ellis S, Carrara E, Savoldi A, Tacconelli E. 2021. Systematic review and meta-analysis of in vitro efficacy of antibiotic combination therapy against carbapenem-resistant Gram-negative bacilli. Int J Antimicrob Agents 57:106344.

8. Lenhard JR, Nation RL, Tsuji BT. 2016. Synergistic combinations of polymyxins. Int J Antimicrob Agents 48:607–613.

9. Zusman O, Avni T, Leibovici L, Adler A, Friberg L, Stergiopoulou T, Carmeli Y, Paul M. 2013. Systematic review and meta-analysis of in vitro synergy of polymyxins and carbapenems. Antimicrob Agents Chemother 57:5104–5111.

10. Shields RK, Nguyen MH, Hao B, Kline EG, Clancy CJ. 2018. Colistin Does Not Potentiate Ceftazidime-Avibactam Killing of Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae In Vitro or Suppress Emergence of Ceftazidime-Avibactam Resistance. Antimicrob Agents Chemother 62:e01018-18.

11. Mikhail S, Singh NB, Kebriaei R, Rice SA, Stamper KC, Castanheira M, Rybak MJ. 2019. Evaluation of the Synergy of Ceftazidime-Avibactam in Combination with Meropenem, Amikacin, Aztreonam, Colistin, or Fosfomycin against Well-Characterized Multidrug-Resistant Klebsiella pneumoniae and Pseudomonas aeruginosa. Antimicrob Agents Chemother 63:e00779-19.

12. Bellio P, Fagnani L, Nazzicone L, Celenza G. 2021. New and simplified method for drug combination studies by checkerboard assay. MethodsX 8:101543.

13. Landersdorfer CB, Nation RL. 2021. Limitations of Antibiotic MIC-Based PK-PD Metrics: Looking Back to Move Forward. Front Pharmacol 12:770518.

14. Couet W. 2018. Pharmacokinetics/pharmacodynamics characterization of combined antimicrobial agents: a real challenge and an urgent need. Clin Microbiol Infect 24:687–688.

15. M26-A: Methods for Determining Bactericidal Activity of Antimicrobial Agents; Approved Guideline 14.

16. Nielsen EI, Friberg LE. 2013. Pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling of antibacterial drugs. Pharmacol Rev 65:1053–1090.

17. Rao GG, Li J, Garonzik SM, Nation RL, Forrest A. 2018. Assessment and modelling of antibacterial combination regimens. Clin Microbiol Infect 24:689–696.

18. den Hollander JG, Horrevorts AM, van Goor ML, Verbrugh HA, Mouton JW. 1997. Synergism between tobramycin and ceftazidime against a resistant Pseudomonas aeruginosa strain, tested in an in vitro pharmacokinetic model. Antimicrob Agents Chemother 41:95–100.

19. Minichmayr IK, Aranzana-Climent V, Friberg LE. 2022. Pharmacokinetic/pharmacodynamic models for time courses of antibiotic effects. Int J Antimicrob Agents 60:106616.

20. Pearson RA, Wicha SG, Okour M. 2022. Drug Combination Modeling: Methods and Applications in Drug Development. J Clin Pharmacol https://doi.org/10.1002/jcph.2128.

21. Aranzana-Climent V, Buyck JM, Smani Y, Pachón-Diaz J, Marchand S, Couet W, Grégoire N. 2020. Semi-mechanistic PK/PD modelling of combined polymyxin B and minocycline against a polymyxin-resistant strain of Acinetobacter baumannii. Clin Microbiol Infect 26:1254.e9-1254.e15.

22. Chauzy A, Gaelzer Silva Torres B, Buyck J, de Jonge B, Adier C, Marchand S, Couet W, Grégoire N. 2019. Semimechanistic Pharmacodynamic Modeling of Aztreonam-Avibactam

Combination to Understand Its Antimicrobial Activity Against Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacteria. CPT Pharmacomet Syst Pharmacol 8:815–824.

23. Loewe S. 1928. Die quantitativen Probleme der Pharmakologie. Ergeb Physiol 27:47–187.

24. Bliss CI. 1939. The Toxicity of Poisons Applied Jointly. Ann Appl Biol 26:585–615.

25. Docobo-Pérez F, Drusano GL, Johnson A, Goodwin J, Whalley S, Ramos-Martín V, Ballestero-Tellez M, Rodriguez-Martinez JM, Conejo MC, van Guilder M, Rodríguez-Baño J, Pascual A, Hope WW. 2015. Pharmacodynamics of fosfomycin: insights into clinical use for antimicrobial resistance. Antimicrob Agents Chemother 59:5602–5610.

26. Zhao C, Wistrand-Yuen P, Lagerbäck P, Tängdén T, Nielsen EI, Friberg LE. 2020. Combination of polymyxin B and minocycline against multidrug-resistant Klebsiella pneumoniae: interaction quantified by pharmacokinetic/pharmacodynamic modelling from in vitro data. Int J Antimicrob Agents 55:105941.

27. Ly NS, Bulitta JB, Rao GG, Landersdorfer CB, Holden PN, Forrest A, Bergen PJ, Nation RL, Li J, Tsuji BT. 2015. Colistin and doripenem combinations against Pseudomonas aeruginosa: profiling the time course of synergistic killing and prevention of resistance. J Antimicrob Chemother 70:1434–1442.

28. Payton ME, Greenstone MH, Schenker N. 2003. Overlapping confidence intervals or standard error intervals: What do they mean in terms of statistical significance? J Insect Sci 3:34.

29. Bauer RJ. 2019. NONMEM Tutorial Part I: Description of Commands and Options, with Simple Examples of Population Analysis. CPT Pharmacomet Syst Pharmacol https://doi.org/10.1002/psp4.12404.

30. Thai H-T, Mentré F, Holford NHG, Veyrat-Follet C, Comets E. 2014. Evaluation of bootstrap methods for estimating uncertainty of parameters in nonlinear mixed-effects models: a simulation study in population pharmacokinetics. J Pharmacokinet Pharmacodyn 41:15–33.

31. Dosne A-G, Bergstrand M, Harling K, Karlsson MO. 2016. Improving the estimation of parameter uncertainty distributions in nonlinear mixed effects models using sampling importance resampling. J Pharmacokinet Pharmacodyn 43:583–596.

32. EUCAST reading guide for broth microdilution v4.0. 2022. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing.

33. Bourrel AS, Poirel L, Royer G, Darty M, Vuillemin X, Kieffer N, Clermont O, Denamur E, Nordmann P, Decousser J-W, IAME Resistance Group. 2019. Colistin resistance in Parisian inpatient faecal Escherichia coli as the result of two distinct evolutionary pathways. J Antimicrob Chemother 74:1521–1530.

34. Seemann T. 2023. Shovill. Perl.

35. Lam MMC, Wick RR, Watts SC, Cerdeira LT, Wyres KL, Holt KE. 2021. A genomic surveillance framework and genotyping tool for Klebsiella pneumoniae and its related species complex. Nat Commun 12:4188.

36. Beal SL. 2001. Ways to fit a PK model with some data below the quantification limit. J Pharmacokinet Pharmacodyn 28:481–504.

37. SSE user guide. PsN 5.3.0. Revised 2018-10-03. https://uupharmacometrics.github.io/PsN/docs.html.

38. Wicha SG, Chen C, Clewe O, Simonsson USH. 2017. A general pharmacodynamic interaction model identifies perpetrators and victims in drug interactions. Nat Commun 8.

39. Sy SKB, Zhuang L, Sy S, Derendorf H. 2019. Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Ceftazidime-Avibactam Combination: A Model-Informed Strategy for its Clinical Development. Clin Pharmacokinet 58:545–564.

40. Kristoffersson AN, Rognås V, Brill MJE, Dishon-Benattar Y, Durante-Mangoni E, Daitch V, Skiada A, Lellouche J, Nutman A, Kotsaki A, Andini R, Eliakim-Raz N, Bitterman R, Antoniadou A, Karlsson MO, Theuretzbacher U, Leibovici L, Daikos GL, Mouton JW, Carmeli Y, Paul M, Friberg LE. 2020. Population pharmacokinetics of colistin and the relation to survival in critically ill patients infected with colistin susceptible and carbapenem-resistant bacteria. Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis 26:1644–1650.

41. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters, version 12.0, 2022. https://www.eucast.org/clinical_breakpoints/. Retrieved 13 July 2022.

42. Brill MJE, Kristoffersson AN, Zhao C, Nielsen EI, Friberg LE. 2018. Semi-mechanistic pharmacokinetic-pharmacodynamic modelling of antibiotic drug combinations. Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis 24:697–706.

43. Chen C, Wicha SG, de Knegt GJ, Ortega F, Alameda L, Sousa V, de Steenwinkel JEM, Simonsson USH. 2017. Assessing Pharmacodynamic Interactions in Mice Using the Multistate Tuberculosis Pharmacometric and General Pharmacodynamic Interaction Models. CPT Pharmacomet Syst Pharmacol 6:787–797.

44. Dosne A-G, Bergstrand M, Karlsson MO. 2017. An automated sampling importance resampling procedure for estimating parameter uncertainty. J Pharmacokinet Pharmacodyn 44:509–520.

Supplemental material

Table S1. Full parameter estimates of the observed interaction models

Parameter	Description	*K. pneumoniae* N1295 Median (RSE%)	*K. pneumoniae* N1584 Median (RSE%)	*K. pneumoniae* N1182 Median (RSE%)	*K. pneumoniae* N864 Median (RSE%)
INOC	Estimated inoculum size (log_{10}CFU/mL)	5.63 (2%)	5.62 (2%)	5.53 (2%)	5.68 (2%)
K_G	Apparent growth rate constant (h^{-1})	1.40 (13%)	1.77 (9%)	1.78 (13%)	1.84 (fixed)
Bmax	Maximal bacterial population supported by the system (log_{10}CFU/mL)	8.80 (1%)	9.13 (1%)	8.43 (1%)	9.01 (2%)
$Emax_{_CZA}$	Maximum kill rate constant of CZA (h^{-1})	4.59 (19%)	6.27 (14%)	7.51 (12%)	9.17 (16%)
EC_{50_CZA}	CZA concentration required to achieve 50% of $Emax_{_CZA}$ (mg/L)	13.39 (12%)	13.47 (10%)	2.51 (12%)	0.46 (6%)
γ_{CZA}	Sigmoïdicity parameter for CZA effect	2.13 (16%)	1.84 (10%)	1.53 (11%)	1.79 (9%)
K_{ON_CZA}	Rate constant for development of adaptive resistance to CZA (h^{-1})	0.24 (51%)	0.32 (32%)	0.36 (25%)	0.66 (25%)
K_{OFF}	Rate constant for reversal of adaptive resistance (h^{-1})	0 (fixed)	0 (fixed)	0 (fixed)	0 (fixed)
$ARmax_{_CZA}$	Maximal reduction of $Emax_{_CZA}$ when bacteria are in the adapted state (%)	71.9 (8%)	73.0 (5%)	78.6 (4%)	82.5 (3%)
$Emax_{_CST}$	Maximum kill rate constant of CST (h^{-1})	13.12 (41%)	8.78 (23%)	14.31 (50%)	8.81 (31%)
EC_{50_CST}	CST concentration required to achieve 50% of $Emax_{_CST}$ (mg/L)	0.60 (46%)	0.33 (15%)	0.33 (19%)	0.21 (11%)
γ_{CST}	Sigmoïdicity parameter for CST effect	0.96 (17%)	1.13 (11%)	1.21 (12%)	1.16 (6%)
K_{ON_CST}	Rate constant for development of adaptive resistance to CST (h^{-1})	0.65 (56%)	0.52 (39%)	1.18 (61%)	0.75 (47%)
$ARmax_{_CST}$	Maximal reduction of $Emax_{_CST}$ when bacteria are in the adapted state (%)	91.8 (3%)	83.1 (4%)	87.0 (6%)	80.3 (6%)
Perpetrator	Drug responsible for the interaction	CST	CST	CST	CST
INT_EC_{50}[1]	Maximal fractional change of the EC50 of the victim drug (%)	-51.4 (10%)	-48.3 (10%)	-48.6 (12%)	-
$EC_{50_INT_EC50}$	Concentration of the perpetrator drug required to achieve 50% of INT_EC_{50} (mg/L)	0.06 (5%)	0.06 (4%)	0.07 (17%)	-
γ_{INT_EC50}	Sigmoïdicity parameter for the combination effect	10 (fixed)	10 (fixed)	10 (fixed)	-
INT_Emax[1]	Maximal fractional change of the Emax of the victim drug (%)	-	-	-	-65.8 (16%)
$EC_{50_INT_Emax}$	Concentration of the perpetrator drug required to achieve 50% of INT_Emax (mg/L)	-	-	-	0.39 (fixed)
γ_{INT_Emax}	Sigmoïdicity parameter for the combination effect	-	-	-	1 (fixed)
RES_ADD	Additive residual error (log_{10}CFU/mL)	1.74 (7%)	1.01 (7%)	1.44 (7%)	2.25 (6%)

[1] (-) indicates are decrease of the parameter and (+) indicates an increase of the parameter due to the interaction

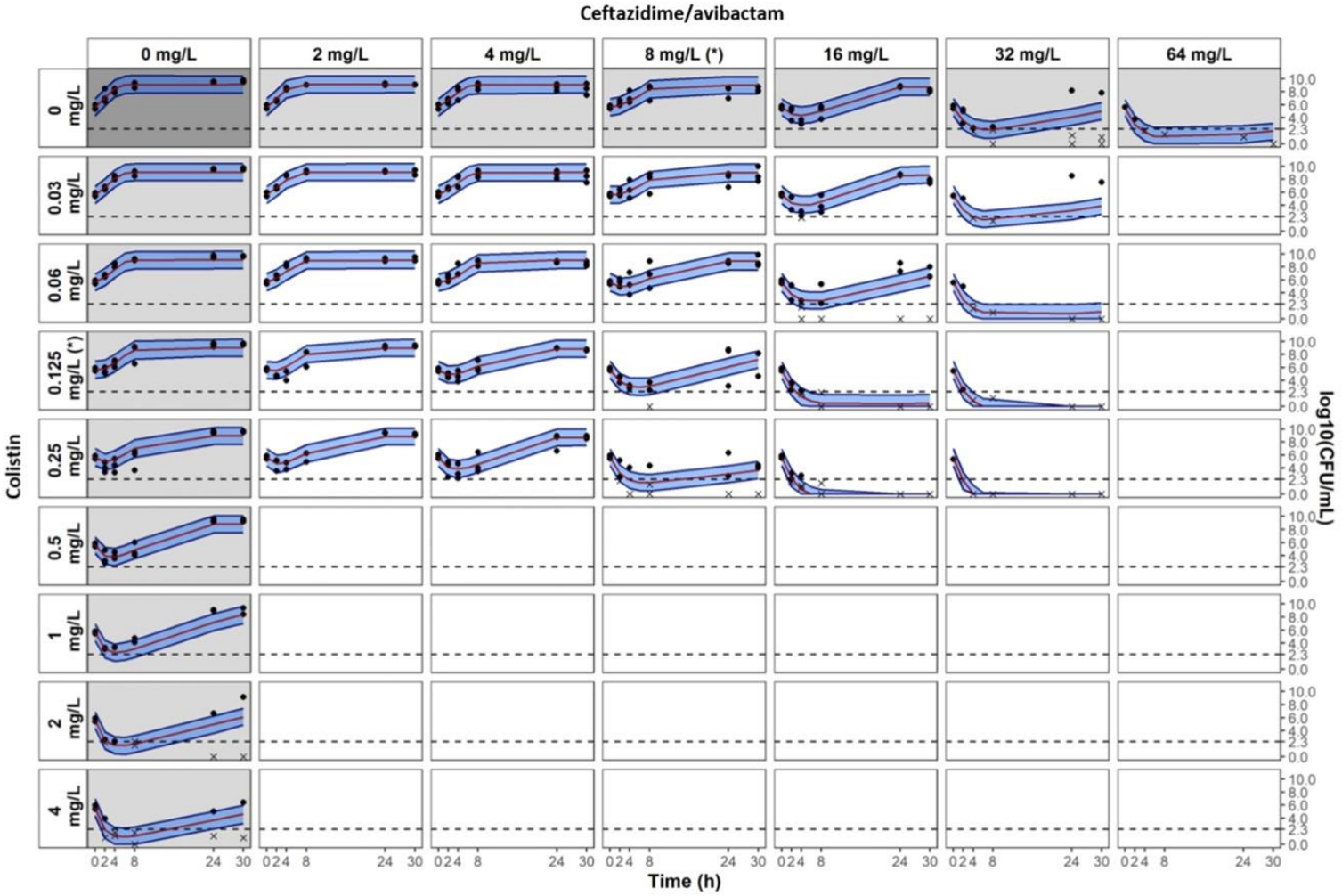


Figure S1. Visual Predictive Checks of the observed interaction model for *K. pneumoniae* NARA1584 isolate

Grey and white panels are associated to single drug and combination experiments, respectively. Measured CFU are represented by dots. For graphical representation, data below limit of quantification are represented by cross at their measured values. Median percentile from simulations with the observed interaction model is represented by red line and the 80% prediction interval between 10^{th} and 90^{th} percentiles is represented by the blue shaded areas. Limit of quantification is represented by the dashed line at 2.3 log_{10}CFU/mL. MICs are indicated by (*). Avibactam concentration was fixed at 4 mg/L.

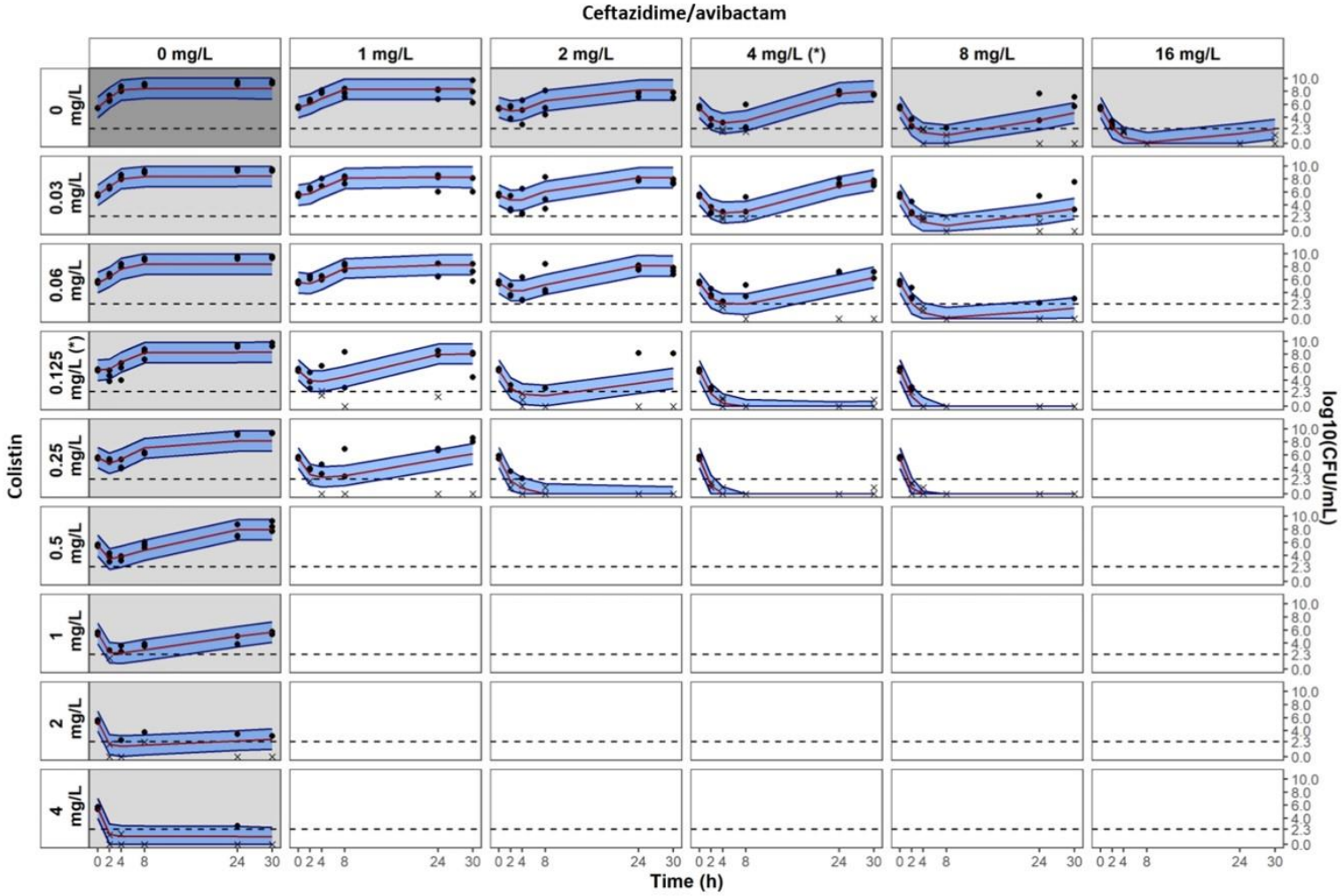


Figure S2. Visual Predictive Checks of the observed interaction model for *K. pneumoniae* NARA1182 isolate

Grey and white panels are associated to single drug and combination experiments, respectively. Measured CFU are represented by dots. For graphical representation, data below limit of quantification are represented by cross at their measured values. Median percentile from simulations with the observed interaction model is represented by red line and the 80% prediction interval between 10th and 90th percentiles is represented by the blue shaded areas. Limit of quantification is represented by the dashed line at 2.3 log_{10}CFU/mL. MICs are indicated by (*). Avibactam concentration was fixed at 4 mg/L

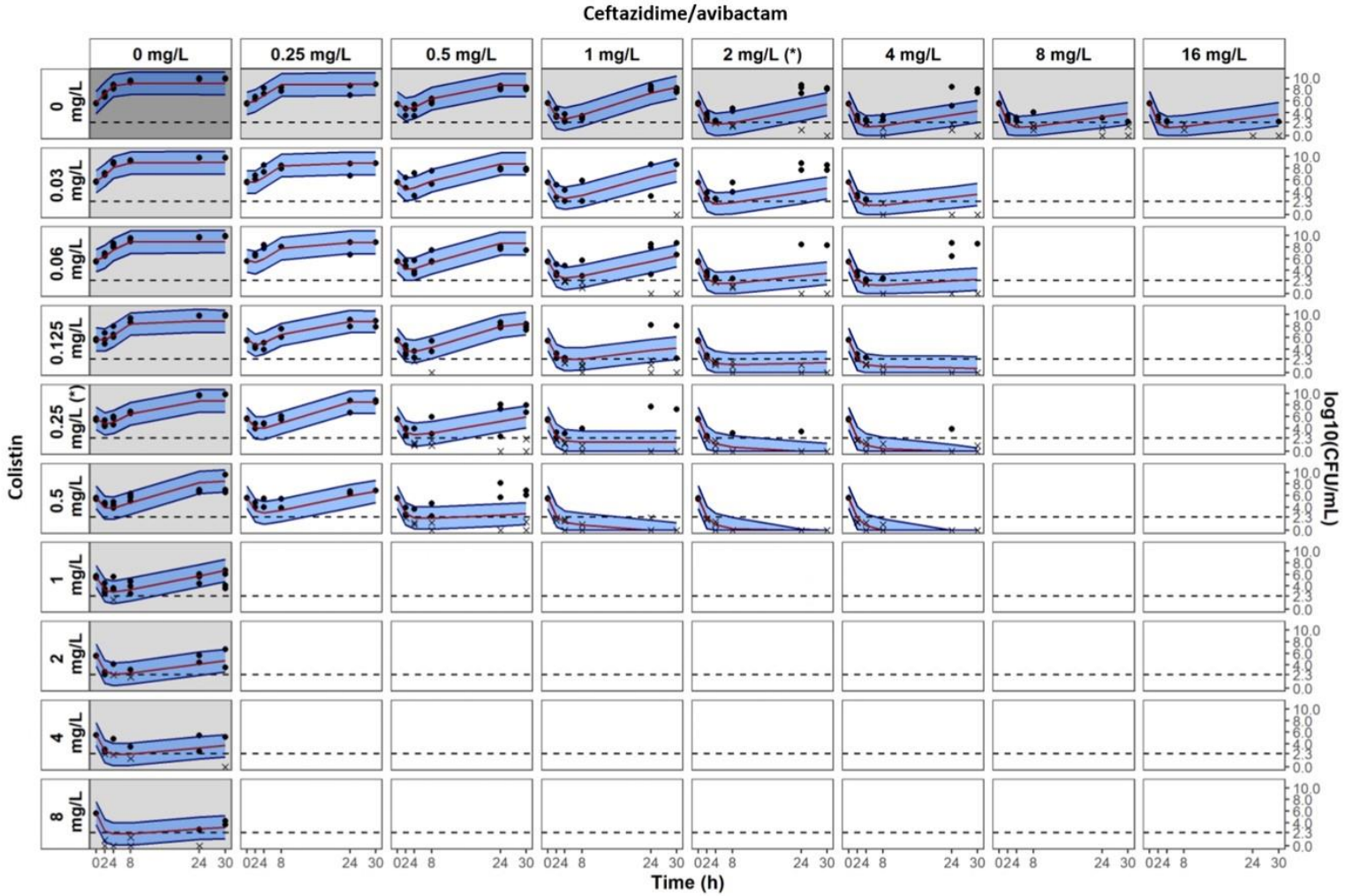


Figure S3. Visual Predictive Checks of the observed interaction model for *K. pneumoniae* NARA864 isolate

Grey and white panels are associated to single drug and combination experiments, respectively. Measured CFU are represented by dots. For graphical representation, data below limit of quantification are represented by cross at their measured values. Median percentile from simulations with the observed interaction model is represented by red line and the 80% prediction interval between 10^{th} and 90^{th} percentiles is represented by the blue shaded areas. Limit of quantification is represented by the dashed line at 2.3 $\log_{10}$CFU/mL. MICs are indicated by (*). Avibactam concentration was fixed at 4 mg/L.

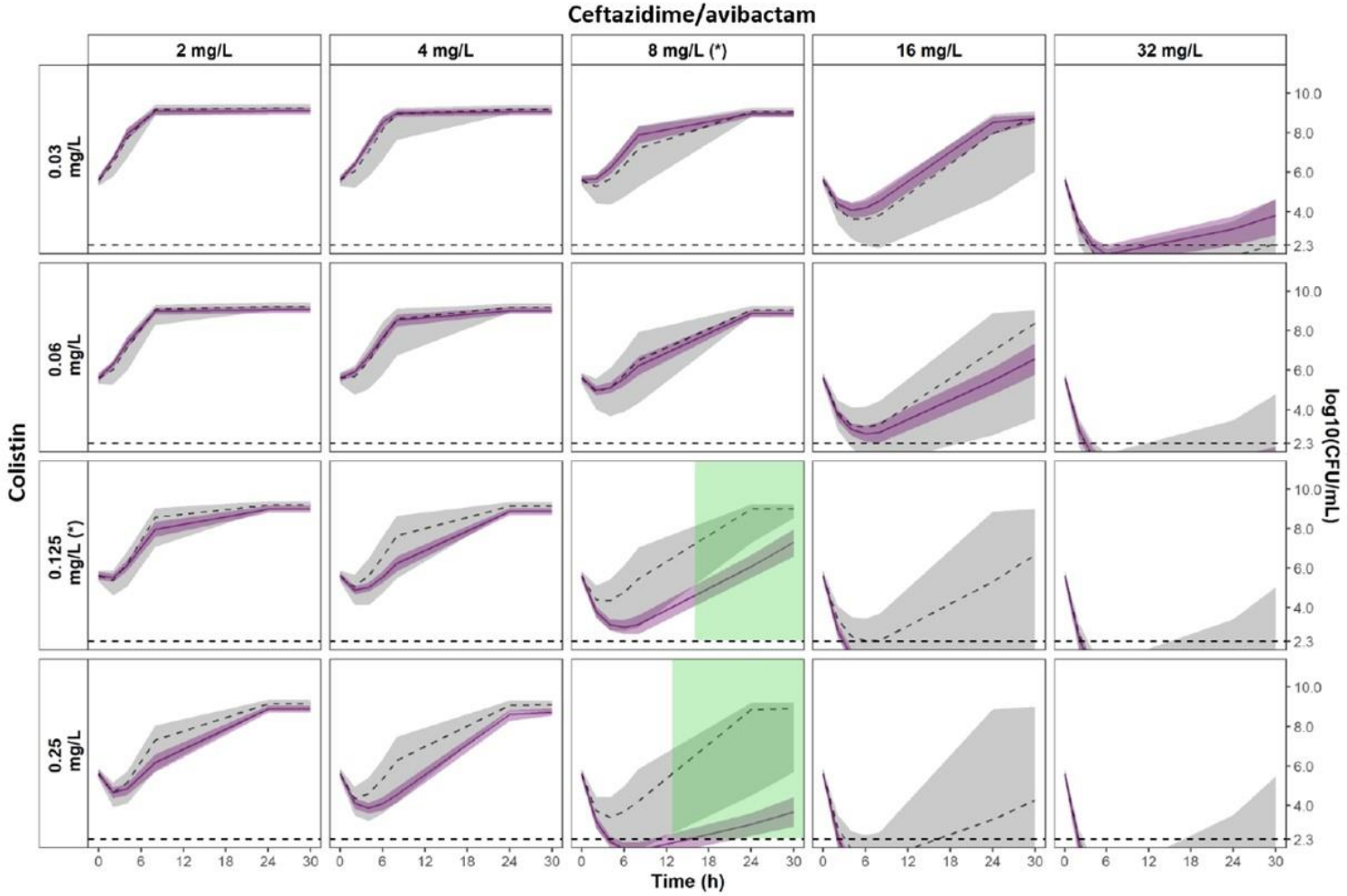


Figure S4. Comparison of the 95%CIs of the observed interaction versus the expected additivity for *K. pneumoniae* NARA1584

The 95%CI of the expected additivity, obtained by parametric bootstrap, is represented by grey areas (n=988 runs) and the corresponding median percentile is represented by the dashed line. The 95%CI of the observed interaction is represented by light purple areas and the median percentile is represented by the solid line (n=1000 runs). Statistically significant areas of synergy (non-overlapping IC95%) are highlighted in green. The limit of quantification is represented by the horizontal dashed line at 2.3 $\log_{10}$CFU/mL. MICs of CZA and CST are indicated by (*).

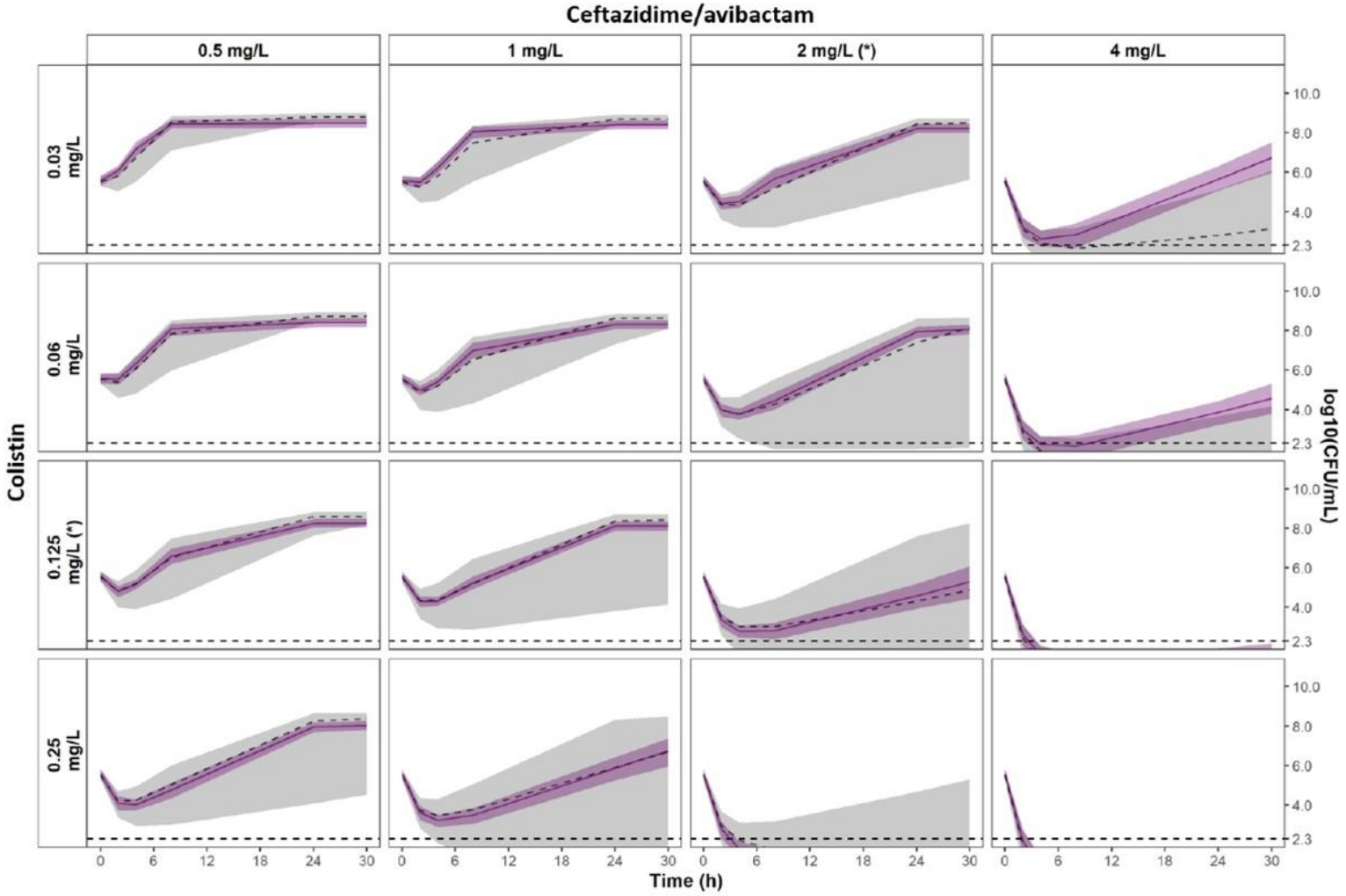


Figure S5. Comparison of the 95%CIs of the observed interaction versus the expected additivity for *K. pneumoniae* NARA1182

The 95%CI of the expected additivity, obtained by parametric bootstrap, is represented by grey areas (n=992 runs) and the corresponding median percentile is represented by the dashed line. The 95%CI of the observed interaction is represented by light purple areas and the median percentile is represented by the solid line (n=930 runs). The limit of quantification is represented by the horizontal dashed line at 2.3 $\log_{10}$CFU/mL. MICs of CZA and CST are indicated by (*).

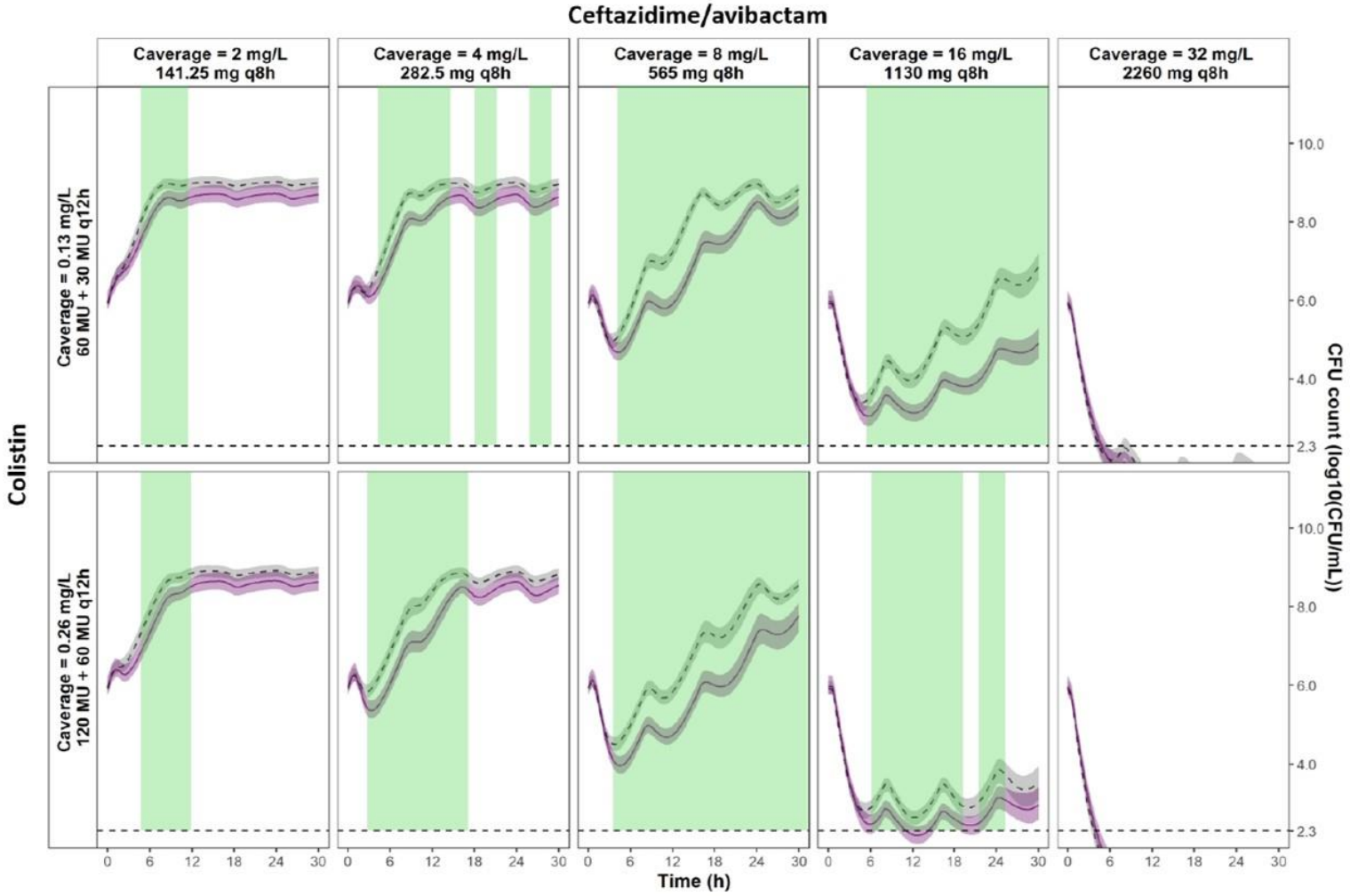


Figure S6. Simulations of the combination effects after CZA and CST intermittent infusions

The 95%CI of the expected additivity, obtained by parametric bootstrap, is represented by grey areas (n=1000 runs) and the median percentile is represented by the dashed line. The 95%CI of the observed interaction is represented by light purple areas (n=1000 runs) and the median percentile is represented by the solid line. Significant differences between both 95%CIs are highlighted in green and indicate synergy. The limit of quantification is represented by the horizontal dashed line at 2.3 $\log_{10}$CFU/mL. In order to obtain sufficiently narrow intervals and have a high statistical power, PK and PD profiles were simulated every 30 minutes for 30h.

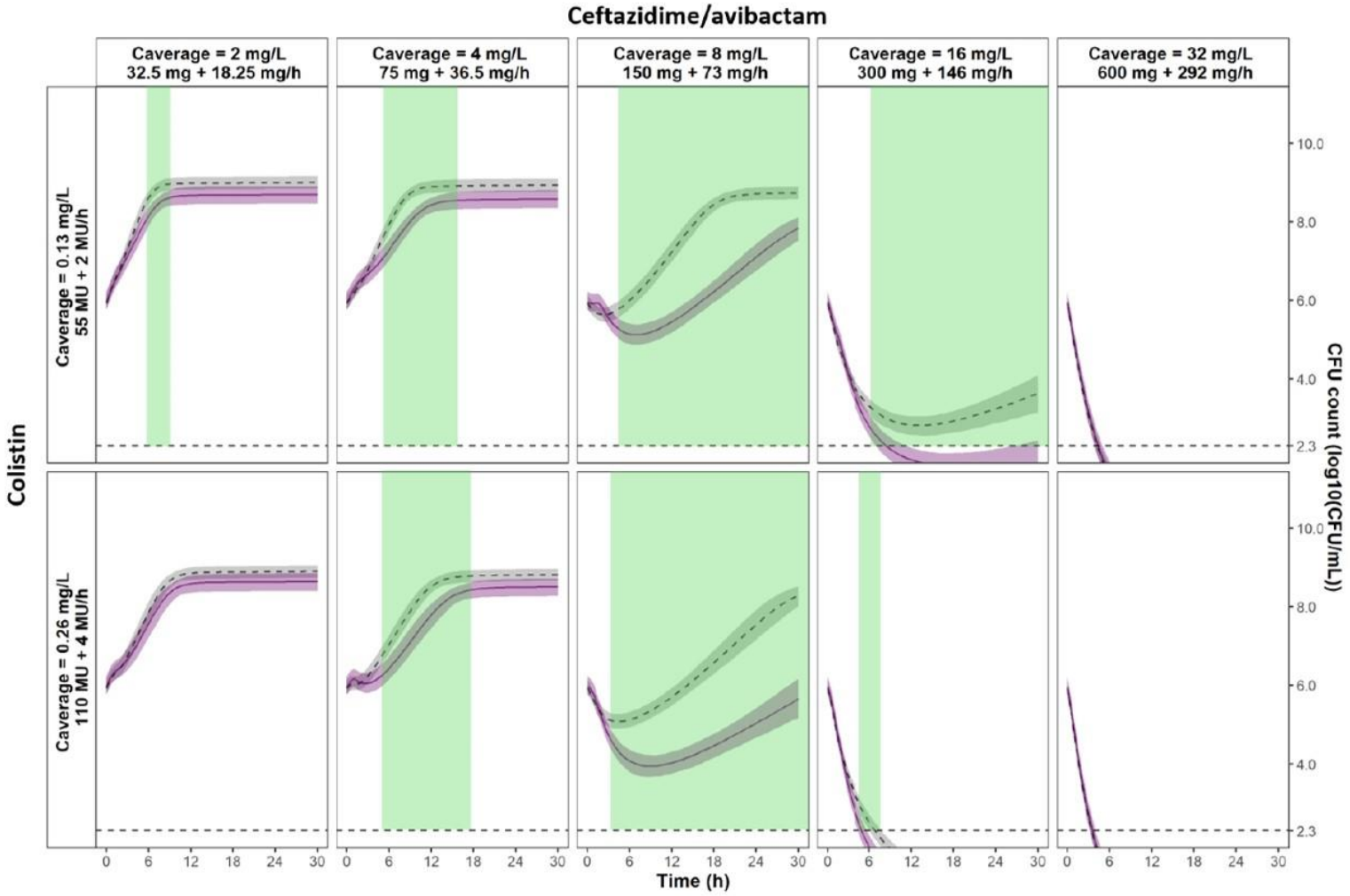


Figure S7. Simulations of the combination effects after CZA and CST loading doses followed by continuous infusion

The 95%CI of the expected additivity, obtained by parametric bootstrap, is represented by grey areas (n=1000 runs) and the median percentile is represented by the dashed line. The 95%CI of the observed interaction is represented by light purple areas (n=1000 runs) and the median percentile is represented by the solid line. Significant differences between both 95%CIs are highlighted in green and indicate synergy. The limit of quantification is represented by the horizontal dashed line at 2.3 $\log_{10}$CFU/mL. In order to obtain sufficiently narrow intervals and have a high statistical power, PK and PD profiles were simulated every 30 minutes for 30h.

Code S1. NONMEM control stream of the expected additivity model for the NARA1295

```
;; 2. Description: CZA + CST monotherapies
;; x1. Author: RAU

$PROBLEM        In-vitro effect of the combination Ceftazidime/Avibactam + Colistin on the K. pneumoniae 334 N1174

$INPUT    ID CAZ_CONC CST_CONC TIME DV CMT AMT EVID MDV BLQ INOC_th INOC_obs EXPID=DROP

$DATA I:/2020-COPROTECT/Data/Clean/Time_Kill_Curve/Combination_CZA-CST/TK_334_CZA-CST_dataset_mono.csv
IGNORE=I

$SUBROUTINES      ADVAN13 TOL=9

$MODEL
COMP=(CAZ_CONC)          ; Ceftazidime concentration (µg/mL) - Avibactam at fixed concentration (4 µg/mL)
COMP=(CST_CONC)          ; Colistin concentration (µg/mL)
COMP=(BTOT)              ; Total bacteria
COMP=(ARON_CZA)          ; Adapted fraction to CZA
COMP=(AROFF_CZA)         ; Non adapated fraction to CZA
COMP=(ARON_CST)          ; Adapted fraction to CST
COMP=(AROFF_CST)         ; Non adapated fraction to CST

$PK
INOC=THETA(1)     ; Estimated inoculum size (log10(CFU/mL))
KG=THETA(2)       ; Bacterial growth rate constant (1/h)
BMAX=THETA(3)     ; Bacterial count in the stationary phase (log10 (CFU/mL))

EMAX_CZA=THETA(4)        ; Maximum killing rate of CZA effect (h-1)
EC50_CZA=THETA(5)        ; CZA concentration needed to reach 50% of EMAX (mg/L)
GAMMA_CZA=THETA(6)       ; Hill's factor

KON_CZA=THETA(7)         ; Rate of adaptation development to CZA(1/h)
KOFF=THETA(8)            ; Rate of adaptation reversal (l/h) fixed to 0
AR_CZA=THETA(9)  ; ARmax_CZA = Fractional reduction of EMAX_CZA when bacteria are adapated

EMAX_CST=THETA(10)       ; Maximum killing rate of CST effect (h-1)
EC50_CST=THETA(11)       ; CST concentration needed to reach 50% of EMAX (mg/L)
GAMMA_CST=THETA(12)      ; Hill's factor

KON_CST=THETA(13)        ; Rate of adaptation development to CST(1/h)
AR_CST=THETA(14)         ; ARmax_CST = Fractional reduction of EMAX_CST when bacteria are adapated

; Initial conditions
IF(A_0FLG.EQ.1) THEN
A_0(1)=CAZ_CONC
A_0(2)=CST_CONC
A_0(3)=10**INOC
A_0(4)=0
A_0(5)=1
A_0(6)=0
A_0(7)=1
ENDIF

$DES
; Logistic bacterial growth model
PLATEAU=1-(A(3)/10**BMAX)

; Adaptation to Ceftazidime/Avibactam
ADAPT_CZA=0
IF(A(1).GT.0) ADAPT_CZA=KON_CZA
E_ADAPT_CZA=AR_CZA*A(4) ; Residual effect of CZA against adapated bacteria
```

```
; Adaptation to Colistin
ADAPT_CST=0
IF(A(2).GT.0) ADAPT_CST=KON_CST
E_ADAPT_CST=AR_CST*A(6) ; Residual effect of CST against adapated bacteria

; Ceftazidime/Avibactam drug effect
KILL_CZA=0
IF(A(1).GT.0) KILL_CZA=(EMAX_CZA*(1-
E_ADAPT_CZA)*A(1)**GAMMA_CZA)/(EC50_CZA**GAMMA_CZA+A(1)**GAMMA_CZA) ; Killing effect of CZA

; Colistin drug effect
KILL_CST=0
IF(A(2).GT.0) KILL_CST=(EMAX_CST*(1-
E_ADAPT_CST)*A(2)**GAMMA_CST)/(EC50_CST**GAMMA_CST+A(2)**GAMMA_CST) ; Killing effect of CST

; Bliss Independence
IF(EMAX_CZA.GT.EMAX_CST) EMAX=EMAX_CZA
IF(EMAX_CZA.LT.EMAX_CST) EMAX=EMAX_CST
E_COMB=((KILL_CZA/EMAX)+(KILL_CST/EMAX)-((KILL_CZA/EMAX)*(KILL_CST/EMAX)))*EMAX ; Effect is normalised on
EMAX to remain between 0 and 1 and then rescaled

; ODE
DADT(1)=0           ; Ceftazidime concentration constant over time
DADT(2)=0           ; Colistin concentration constant over time
DADT(3)=(KG*PLATEAU - E_COMB)*A(3) ; Total bacteria over time
DADT(4)=ADAPT_CZA*A(5)-KOFF*A(4) ; Adapted fraction over time
DADT(5)=KOFF*A(4)-ADAPT_CZA*A(5) ; Non adapted fraction over time
DADT(6)=ADAPT_CST*A(7)-KOFF*A(6) ; Adapted fraction over time
DADT(7)=KOFF*A(6)-ADAPT_CST*A(7) ; Non adapted fraction over time

$THETA
(5.64)     ; INOC
(1.47)     ; KG
(9.56)     ; BMAX
(4.76)  ; EMAX_CZA
(12.2)     ; EC50_CZA
(2.01)  ; GAMMA_CZA
(0.236)    ; KON_CZA
(0) FIX    ; KOFF
(0.719)    ; AR_CZA
(13.2)     ; EMAX_CST
(0.296)    ; EC50_CST
(1.08)     ; GAMMA_CST
(0.958)  ; KON_CST
(0.918) ; AR_CST

$SIGMA 0.5          ; SIGMA

$OMEGA 0 FIX       ; IIV_KON_CZA

$ERROR
A1=A(1)
A2=A(2)
A3=A(3)
A4=A(4)
A5=A(5)
A6=A(6)
A7=A(7)
```

```
BTOT_ERR = A3
IF(BTOT_ERR<1e-6) BTOT_ERR=1e-6

;Sim_start
IF(CMT.EQ.3.AND.BLQ.EQ.1) THEN ;M3 method for data BLQ
IPRED = LOG10(BTOT_ERR)
W= SQRT(SIGMA(1))
IRES = -9999
IWRES = -9999
F_FLAG=1
MDVRES=1
LOQ=LOG10(200) ;; LOQ = 200 CFU/mL
DUM=(LOQ-IPRED)/(W+0.00001)
CUMD=PHI(DUM) ;; PHI = cumulative density function
Y = CUMD
ENDIF

IF(CMT.EQ.3.AND.BLQ.EQ.0) THEN
;Sim_end
;Sim_start
;IF(CMT.EQ.3) THEN
;Sim_end
IPRED = LOG10(BTOT_ERR)
W= SQRT(SIGMA(1))
IRES = DV-IPRED
IWRES = (IRES/(W+0.00001))
;Sim_start
F_FLAG=0
MDVRES=0
;Sim_end
ERR1= EPS(1)
Y= IPRED+ERR1
ENDIF

$ESTIMATION METHOD=1 INTERACTION LAPLACIAN MAXEVAL=9999 SIGDIG=3 SIGL=9 SIGLO=9 PRINT=5 NOABORT
POSTHOC

$COVARIANCE       PRINT=E UNCONDITIONAL

$TABLE ID TIME CAZ_CONC CST_CONC DV CMT AMT BLQ A1 IPRED IWRES EVID CWRES ONEHEADER NOPRINT FILE=sdtab29
$TABLE ID TIME A1 A2 ADAPT_CZA A4 A5 E_ADAPT_CZA ADAPT_CST A6 A7 E_ADAPT_CST KILL_CZA KILL_CST A3 IPRED
ONEHEADER NOPRINT FILE=patab29.csv FORMAT=,F12.2
```

Code S2. NONMEM control stream of the observed interaction model for the NARA1295

```
;; 2. Description: INT2_CST
;; x1. Author: RAU

$PROBLEM          In-vitro effect of the combination Ceftazidime/Avibactam + Colistin on the K. pneumoniae 334

$INPUT    ID CAZ_CONC CST_CONC TIME DV CMT AMT EVID MDV BLQ INOC_th INOC_obs EXPID=DROP

$DATA I:/2020-COPROTECT/Data/Clean/Time_Kill_Curve/Combination_CZA-CST/TK_334_CZA-CST_dataset1.csv IGNORE=I

$SUBROUTINES      ADVAN13 TOL=9
```

```
$MODEL
COMP=(CAZ_CONC)          ; Ceftazidime concentration (µg/mL) - Avibactam at fixed concentration (4 µg/mL)
COMP=(CST_CONC)          ; Colistin concentration (µg/mL)
COMP=(BTOT)              ; Total bacteria
COMP=(ARON_CZA)          ; Adapted fraction to CZA
COMP=(AROFF_CZA)         ; Non adapated fraction to CZA
COMP=(ARON_CST)          ; Adapted fraction to CST
COMP=(AROFF_CST)         ; Non adapated fraction to CST

$PK
INOC=THETA(1)    ; Estimated inoculum size (log10(CFU/mL))
KG=THETA(2)      ; Bacterial growth rate constant (1/h)
BMAX=THETA(3)    ; Bacterial count in the stationary phase (log10 (CFU/mL))

EMAX_CZA=THETA(4)        ; Maximum killing rate of CZA effect (h-1)
EC50_CZA=THETA(5)        ; CZA concentration needed to reach 50% of EMAX (mg/L)
GAMMA_CZA=THETA(6)       ; Hill's factor

KON_CZA=THETA(7)         ; Rate of adaptation development to CZA(1/h)
KOFF=THETA(8)            ; Rate of adaptation reversal (l/h) fixed to 0
AR_CZA=THETA(9)  ; ARmax_CZA = Fractional reduction of EMAX_CZA when bacteria are adapated

EMAX_CST=THETA(10)       ; Maximum killing rate of CST effect (h-1)
EC50_CST=THETA(11)       ; CST concentration needed to reach 50% of EMAX (mg/L)
GAMMA_CST=THETA(12)      ; Hill's factor

KON_CST=THETA(13)        ; Rate of adaptation development to CST(1/h)
AR_CST=THETA(14)         ; ARmax_CST = Fractional reduction of EMAX_CST when bacteria are adapated

INT=THETA(15)    ; Interaction parameter = maximal fractional change of the affected PD parameter of the victim drug due
to the interaction
INT_EC50=THETA(16)       ; Concentration to reach half of INT (mg/L)
INT_GAMMA=THETA(17)      ; Sigmoidicity parameter of the interaction relationship

; Initial conditions
IF(A_0FLG.EQ.1) THEN
A_0(1)=CAZ_CONC
A_0(2)=CST_CONC
A_0(3)=10**INOC
A_0(4)=0
A_0(5)=1
A_0(6)=0
A_0(7)=1
ENDIF

$DES
; Logistic bacterial growth model
PLATEAU=1-(A(3)/10**BMAX)

; Adaptation to Ceftazidime/Avibactam
ADAPT_CZA=0
IF(A(1).GT.0) ADAPT_CZA=KON_CZA
E_ADAPT_CZA=AR_CZA*A(4) ; Residual effect of CZA against adapated bacteria

; Adaptation to Colistin
ADAPT_CST=0
IF(A(2).GT.0) ADAPT_CST=KON_CST
```

```
E_ADAPT_CST=AR_CST*A(6) ; Residual effect of CST against adapated bacteria

; GPDI model (to be adapted accordingly to the interaction)
INTERACTION=0 ; no interaction in single drug experiment
IF(A(1).GT.0.AND.A(2).GT.0) INTERACTION=(INT*A(2)**INT_GAMMA)/(INT_EC50**INT_GAMMA+A(2)**INT_GAMMA) ;
GPDI model describing PD interaction

; Ceftazidime/Avibactam drug effect
KILL_CZA=0
IF(A(1).GT.0) KILL_CZA=(EMAX_CZA*(1-
E_ADAPT_CZA)*A(1)**GAMMA_CZA)/((EC50_CZA*(1+INTERACTION))**GAMMA_CZA+A(1)**GAMMA_CZA) ; Killing effect
of CZA, modified by INTERACTION

; Colistin drug effect
KILL_CST=0
IF(A(2).GT.0) KILL_CST=(EMAX_CST*(1-
E_ADAPT_CST)*A(2)**GAMMA_CST)/(EC50_CST**GAMMA_CST+A(2)**GAMMA_CST) ; Killing effect of CST

; Bliss Independence
IF(EMAX_CZA.GT.EMAX_CST) EMAX=EMAX_CZA
IF(EMAX_CZA.LT.EMAX_CST) EMAX=EMAX_CST
E_COMB=((KILL_CZA/EMAX)+(KILL_CST/EMAX)-((KILL_CZA/EMAX)*(KILL_CST/EMAX)))*EMAX ; Effect is normalised on
EMAX to remain between 0 and 1 and then rescaled

; ODE
DADT(1)=0           ; Ceftazidime concentration constant over time
DADT(2)=0           ; Colistin concentration constant over time
DADT(3)=(KG*PLATEAU - E_COMB)*A(3) ; Total bacteria over time
DADT(4)=ADAPT_CZA*A(5)-KOFF*A(4) ; Adapted fraction over time
DADT(5)=KOFF*A(4)-ADAPT_CZA*A(5) ; Non adapted fraction over time
DADT(6)=ADAPT_CST*A(7)-KOFF*A(6) ; Adapted fraction over time
DADT(7)=KOFF*A(6)-ADAPT_CST*A(7) ; Non adapted fraction over time

$THETA
(5.54)      ; INOC
(1.89)      ; KG
(9.18)      ; BMAX
(4.93) ; EMAX_CZA
(10.7)      ; EC50_CZA
(1.84) ; GAMMA_CZA
(0.214)  ; KON_CZA
(0) FIX     ; KOFF
(0.642)  ; AR_CZA
(13.1)  ; EMAX_CST
(0.256)     ; EC50_CST
(0.97)  ; GAMMA_CST
(0.948)  ; KON_CST
(0.873)  ; AR_CST
(-0.1)      ; INT
(0.256) ; INT_EC50
(10) FIX    ; INT_GAMMA

$SIGMA 0.5          ; SIGMA

$OMEGA 0 FIX        ; IIV_KON_CZA

$ERROR
A1=A(1)
```

```
A2=A(2)
A3=A(3)
A4=A(4)
A5=A(5)
A6=A(6)
A7=A(7)

BTOT_ERR = A3
IF(BTOT_ERR<1e-6) BTOT_ERR=1e-6

;Sim_start
IF(CMT.EQ.3.AND.BLQ.EQ.1) THEN ;M3 method for data BLQ
IPRED = LOG10(BTOT_ERR)
W= SQRT(SIGMA(1))
IRES = -9999
IWRES = -9999
F_FLAG=1
MDVRES=1
LOQ=LOG10(200) ;; LOQ = 200 CFU/mL
DUM=(LOQ-IPRED)/(W+0.00001)
CUMD=PHI(DUM) ;; PHI = cumulative density function
Y = CUMD
ENDIF

IF(CMT.EQ.3.AND.BLQ.EQ.0) THEN
;Sim_end
;Sim_start
;IF(CMT.EQ.3) THEN
;Sim_end
IPRED = LOG10(BTOT_ERR)
W= SQRT(SIGMA(1))
IRES = DV-IPRED
IWRES = (IRES/(W+0.00001))
;Sim_start
F_FLAG=0
MDVRES=0
;Sim_end
ERR1= EPS(1)
Y= IPRED+ERR1
ENDIF

$ESTIMATION METHOD=1 INTERACTION LAPLACIAN MAXEVAL=9999 SIGDIG=3 SIGL=9 SIGLO=9 PRINT=5 NOABORT
POSTHOC

$COVARIANCE       PRINT=E UNCONDITIONAL

$TABLE ID TIME CAZ_CONC CST_CONC DV CMT AMT BLQ A1 IPRED IWRES EVID CWRES ONEHEADER NOPRINT
FILE=sdtab124
$TABLE ID TIME A1 A2 ADAPT_CZA A4 A5 E_ADAPT_CZA ADAPT_CST A6 A7 E_ADAPT_CST INTERACTION KILL_CZA KILL_CST
A3 IPRED ONEHEADER NOPRINT FILE=patab124.csv FORMAT=,F12.2
```

12. Article 3 : PKPD modelling of the inoculum effect of combined ceftazidime/avibactam and colistin against a multidrug resistant *Klebsiella pneumoniae* isolate

Article **en cours d'écriture**

Title

PKPD modelling of the inoculum effect of combined ceftazidime/avibactam and colistin against a multidrug resistant *Klebsiella pneumoniae* isolate

Authors

Romain Aubry[1,2], Julien Buyck[1,2], Alexia Chauzy[1,2], Laure Prouvensier[1,3], Jean-Winoc Decousser[4,5], Patrice Nordmann[6,7,8], Sebastian G. Wicha[9], Sandrine Marchand[1,2,3], Nicolas Grégoire[1,2,3,#]

Institutions

[1]Inserm U1070, Poitiers, France

[2]Université de Poitiers, UFR de Médecine Pharmacie, Poitiers, France

[3]CHU de Poitiers, laboratoire ou département, Poitiers, France

[4]Department of Bacteriology and Infection Control, University Hospital Henri Mondor, Assistance Publique - Hôpitaux de Paris, Créteil, France.

[5]EA 7380 Dynamyc Université Paris - Est Créteil (UPEC), Ecole nationale vétérinaire d'Alfort (EnvA), Faculté de Médecine de Créteil, Créteil, France.

[6]Medical and Molecular Microbiology, Faculty of Science and Medicine, University of Fribourg, Fribourg, Switzerland

[7]Swiss National Reference Center for Emerging Antibiotic Resistance (NARA), University of Fribourg, Fribourg, Switzerland

[8]Institute for Microbiology, University of Lausanne and University Hospital Centre, Lausanne, Switzerland

[9]Deptartment of Clinical Pharmacy, Institute of Pharmacy, University of Hamburg, Hamburg, Germany

[#]Correspondance to: nicolas.gregoire@univ-poitiers.fr; Tel: +33 5 49 36 64 36

Keywords

Antimicrobial combination, PKPD modelling, ceftazidime/avibactam, colistin, inoculum effect

Abstract

Background

The inoculum effect (IE) characterizes a decrease of the antimicrobial effect of antibiotics at high starting inoculum. To face antimicrobial resistance, antibiotic combinations are being increasingly used. In this context, the effect of combined drug is likely to be affected by IE, especially with drugs for which an IE has already been described.

Objectives

The objective of this study was to characterize the IE of a multidrug resistant *K. pneumoniae* isolate on the combination of ceftazidime/avibactam (CZA) and colistin (CST).

Methods

In vitro time-kill curves were performed with drugs alone and in combination at four different inocula. The IE of each drug was described using PKPD modelling and the interaction of CZA

and CST on the IE of the other drug was further investigated using the GPDI model, meaning that CZA could affect the IE of CST and inversely.

Results

A rapid killing of the bacteria was observed at 10^4 CFU/mL inoculum. For both 5.10^5 and 10^7 CFU/mL inoculum, an initial decay of the bacteria followed by regrowth was observed with drugs alone while the combination in the range of 1x to 2x the MIC prevented the bacterial resistance. Eradication was never achieved for the high 10^8 CFU/mL inoculum. The IE was best modelled as a reduction of the Emax of CZA and as an increase of the EC_{50} of CST with increasing inoculum, however, no significant interaction on IE was found, meaning that IE independently affected the effects of CZA and CST when both drugs were combined.

Conclusion

Starting inoculum was found to significantly affect CZA and CST activities. Bacterial eradication without regrowth was achieved in combination except at the highest inoculum against this *K. pneumoniae* isolate.

Introduction

The inoculum effect (IE) characterizes a decrease of the antimicrobial effect of antibiotics at high starting inoculum (1). This complex phenomenon has been extensively investigated *in vitro* and has been reported to be dependent on the antibiotic/strain pair (2). However, antibiotic combinations are being increasingly used to face antimicrobial resistance (3). In this context, IE is likely to impact the effect of combined drugs, especially with the ones for which an IE has been described. Previous *in vitro* studies have reported a minor to moderate IE of ceftazidime/avibactam (CZA) against Enterobacterales (4-6), while a significant IE of colistin (CST) has been demonstrated in many occasions in Enterobacterales (7-9).

Several mechanisms have been proposed to explain the IE, including an unbalanced ratio between the free antibiotic concentration and the bacterial density (10), an enhanced production of β-lactamases (1,2, 11), an increased subpopulation of resistant bacteria (12, 13), a change in the physiological state of the bacteria (13), a decrease in the expression of penicillin-binding proteins (14), a rapid development of biofilms (15) and quorum sensing (12). Because EUCAST and CLSI guidelines usually rely on a standard 5.10^5 CFU/mL inoculum (16, 17), the IE is not taken into considerations for determining clinical breakpoints. Therefore, antibiotic regimens used to treat infections with elevated bacterial burden, such as endocarditis, meningitis or abscesses (18), may become ineffective and favour the antimicrobial resistance.

Traditionally, the IE was defined as an eightfold or higher MIC increase at high inoculum ($\geq 10^7$ CFU/mL) compared to the standard inoculum size (18). Although practical, the MIC only provide evidence of a change in the drug susceptibility when the bacterial inoculum increases. The IE was also investigated based on more informative time-kill experiments and the relationship between the inoculum size and the antibiotic activity was further characterized using pharmacokinetic/pharmacodynamic (PKPD) modelling (12, 13, 19). This quantitative approach was used to predict the time-course of the bacterial density depending on drug concentrations and on the starting inoculum. The IE of antibiotic combination has only been studied once, relying on CFU counts comparison at several time points (8). However, to our knowledge, no article has reported antibiotic interaction on the IE, *i.e.* can one drug have an impact on the IE of the other drug?

The objective of this study was to characterize the IE of a multidrug resistant KPC-producing *K. pneumoniae* isolate on the combination of CZA and CST. To do so, time-kill experiments with several starting inoculum were performed and the IE was evaluated for antibiotics used alone and in combination, using PKPD modelling.

Materials and Methods

Antibiotics

Ceftazidime and avibactam were purchased from MedChemExpress (NJ, USA). Colistin was purchased from Sigma Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France). Stock solutions of antibiotics (10240 mg/L) were prepared in sterile water, stored at -80°C and diluted in Mueller Hinton Broth II cation-adjusted (MHB) on the day of experiment to achieve the desired concentrations.

Strains

A clinical *K. pneumoniae* isolates (NARA864), obtained from the National Reference Center for Emerging Antibiotic Resistance (NARA, Fribourg, Switzerland) and susceptible to CZA (MIC = 2 mg/L with fixed avibactam concentration of 4 mg/L) and CST (MIC = 0.25 mg/L) was used. This strain had already been used to study the CZA/CST interaction in a previous work.

Static time-kill experiments

In vitro time-kill experiments included a growth control, single drug experiments with ceftazidime ranging from 0.5 to 8 mg/L with two-fold serial dilution (with fixed avibactam concentration of 4 mg/L) or CST alone ranging from 0.06 to 8 mg/L. The CZA + CST

combination was tested at several concentrations ranging from 0.5 + 0.06 mg/L to 4 + 0.5 mg/L, respectively. Bacterial inoculum of 10^4, 5.10^5, 10^7 and 10^8 CFU/mL were investigated.

One microliter of frozen bacteria was taken from -80°C storage and incubated overnight in 10 mL of MHB at 35 ± 2°C with constant shaking (130 rpm). A 200 µL volume of this bacterial suspension was diluted in 10 mL of MHB and pre-incubated (2 h, 35 ± 2°C, 130 rpm) to reach exponential growth phase. The optical density (600 nm) was adjusted between 0.08 and 0.11, corresponding to ± 10^8 CFU/mL bacterial density. Then, this bacterial suspension was either centrifuged at 2500 RCF for 6 min and the pellet was resuspended in 1 mL of MHB to obtain a 10^8 CFU/mL inoculum, or adequately diluted to achieve a 10^4, 5.10^5 or 10^7 CFU/mL inoculum. The preparation (containing the antibiotics at targeted concentrations) was incubated at 35 ± 2°C with constant shaking (130 rpm) for 30 h. Samples were taken at 0, 2, 4, 8, 24 and 30 h, serially diluted in NaCl 0.9% and plated on MHA using an easySpiral automatic plater (Interscience, France). Plates were incubated 24 h at 35 ± 2°C and CFU were enumerated using a SCAN 300 colony counter (Interscience, France). The lower limit of quantification was 200 CFU/mL. Each experimental condition was tested one to four times.

PKPD modelling of the expected effect w/o IE

Datasets were prepared using R software (version 3.6.2) and the parameters of the model were estimated using NONMEM software (version 7.4) with the Laplacian algorithm. Data below the limit of quantification were handled using Beal's M3 method (20). Evaluation and selection of the model were based on objective function value (OFV), goodness of fit plots (including

individual fits, predicted vs observed CFU and Visual Predictive Checks (VPCs)) and accuracy of parameter estimates (relative standard errors). The procedure for the development of the PKPD model and the evaluation of the IE is illustrated on the flowchart Figure 1.

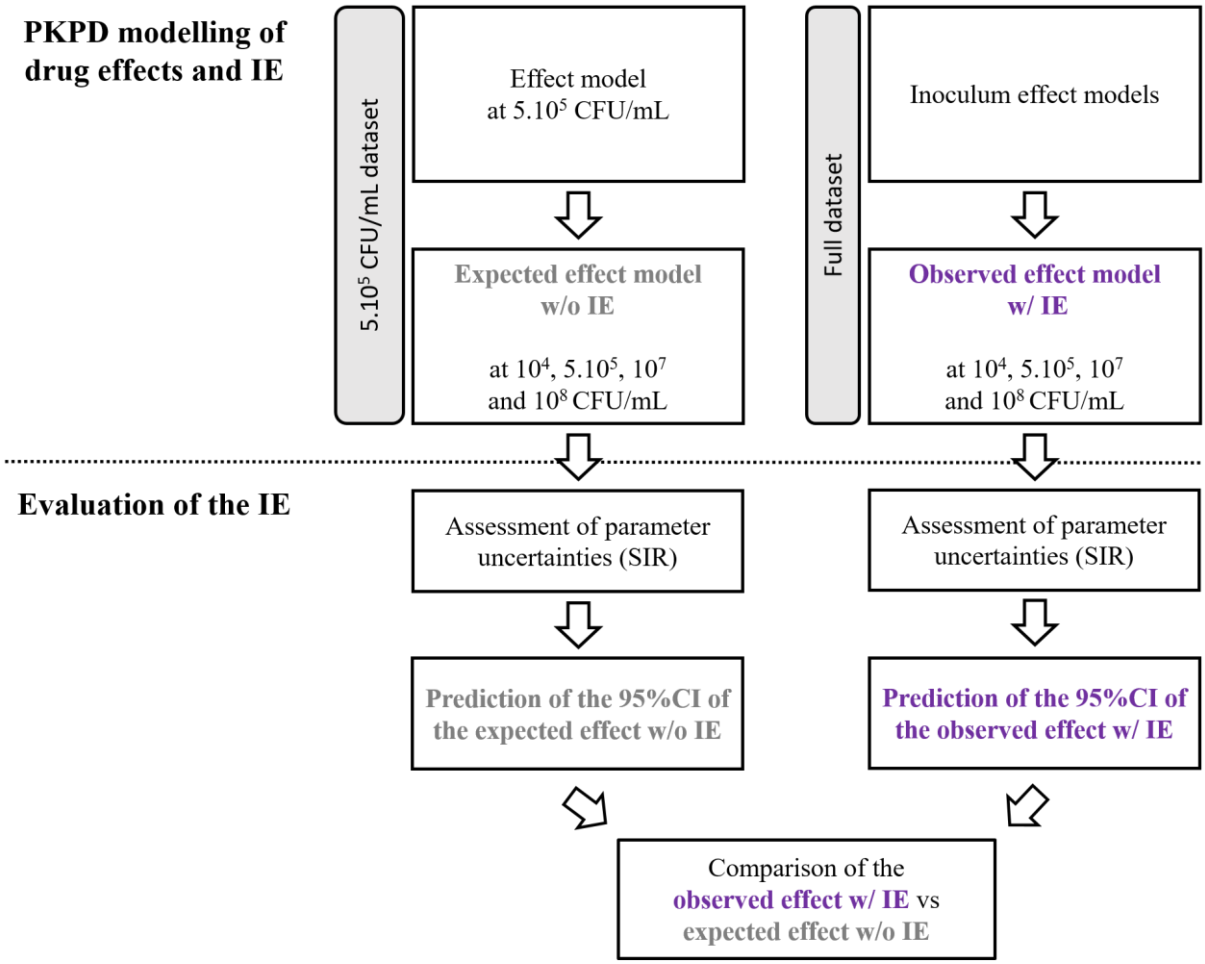


Figure 1. Flowchart for the development of the PKPD model and the evaluation of the inoculum effect

SIR, Sampling Importance Resampling (21)

Firstly, the PKPD model describing the single drug and combination effects at 5.10^5 CFU/mL starting inoculum was adapted from our previously published model, the difference being the addition of inter-experimental variability on the inoculum. Briefly, the bacterial growth followed a logistic model, both CZA and CST induced bacterial killing according to a sigmoidal Emax model and the regrowth of the bacteria was modelled assuming the emergence of adaptive resistance over time. The adaptation of the bacteria proportionally reduced the Emax parameter over time, until reaching a residual effect of the corresponding drug when all bacteria reached the adapted state. The general pharmacodynamic interaction (GPDI) model (22), implemented under the Bliss Independence hypothesis, was used to characterize the PD interaction between CZA and CST.

Construction of the 95% confidence interval of the expected effect w/o IE

To assess the uncertainty of parameter estimates and build the 95%CI of the expected effect w/o IE, a Sampling Importance Resampling (SIR) procedure was applied with the SIR tool of PsN 5.3.0 (23). The covariance matrix estimated during the $COV step from the expected effect model w/o IE was used as initial proposal distribution. The number of samples was set to M = (1000, 1000, 1000, 2000, 2000) and the number of resamples was set to m = (200, 400, 600, 800, 1000). The SIR convergence was graphically assessed using the dOFV distribution diagnostic plot (21, 23) and additional iterations were added if the convergence was not reached at the end of the procedure. Subsequently, the individual predictions were simulated from the 1000 parameter vectors determined by SIR and summary statistics (median, 2.5 and 97.5 percentiles) of bacterial counts were calculated over time for each inoculum size in order to

build the 95%CI of the expected effect. To account for variability in inocula other than 5.10^5 CFU/mL, the size of the inocula as well as the inter-experimental variability were estimated for each theoretical inoculum, *i.e.* 10^4, 10^7 and 10^8 CFU/mL using solely CFU counts at T0.

PKPD modelling of the observed IE

Secondly, the PKPD model describing the inoculum effect was developed using all experimental data as illustrated on Figure 2. The drug effect models and the PD interaction between CZA and CST previously developed at 5.10^5 CFU/mL were re-estimated. The inocula and associated variabilities were fixed and the inoculum effect was characterized with several mathematical functions (linear, power and sigmoidal) and could result in a change in Emax, EC_{50} or K_{on} parameter of each antibiotic. Further PD interaction on the inoculum effect of each drug was also investigated using the GPDI model, meaning that CZA could have an impact on the inoculum effect of CST and vice versa. The selection of the model that best described the observed data, so called observed effect model, was based on the difference in OFV between models (likelihood ratio test with a first order risk, alpha, of 5%). Visual predicted Checks (VPCs) were drawn based on 1000 simulations using the observed effect model with IE. Median, 10^{th} and 90^{th} percentiles were calculated at each sampling time and VPCs, stratified on inoculum size and on drug concentrations, were plotted to assess the ability of the model to describe the observed data.

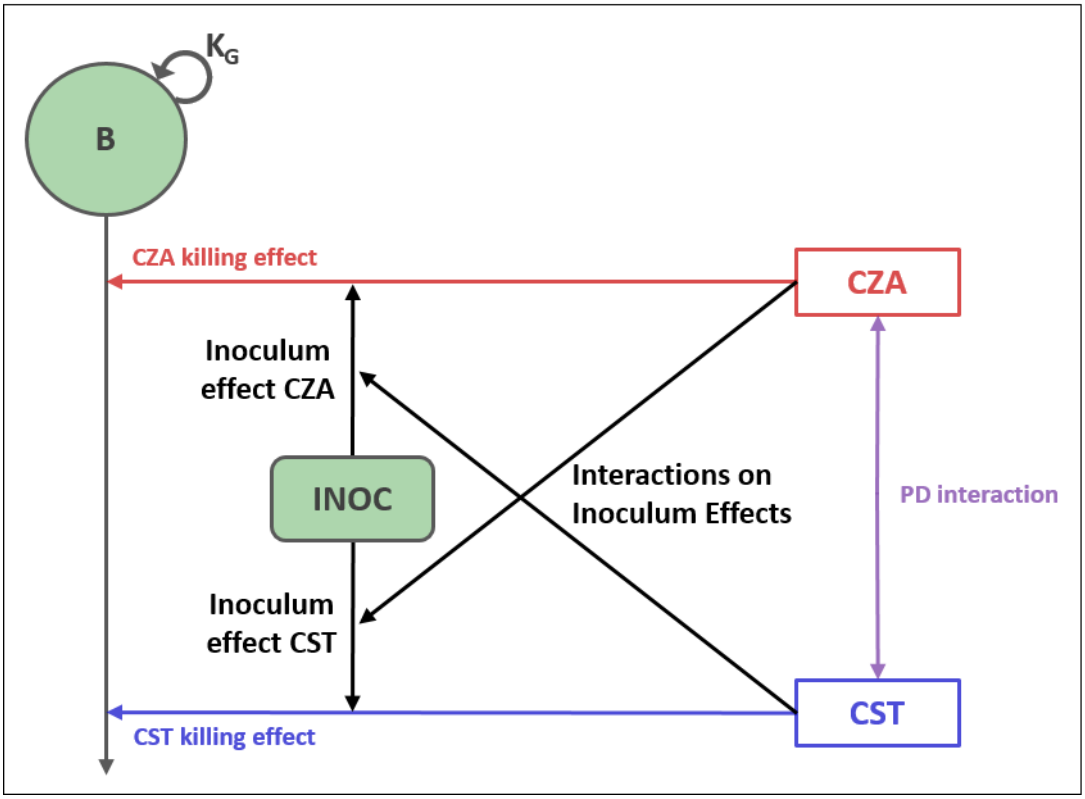


Figure 2. Development of the PKPD model with inoculum effect

B, total bacterial population; K_G, growth rate; INOC, starting inoculum; CZA, ceftazidime/avibactam; CST, colistin; IE, inoculum effect. The GPDI model (22) was used to investigate the PD interaction between CZA and CST and the PD interaction on inoculum effect of each drug.

Impact of the inoculum effect on TKC

In order to evaluate the impact of the IE on single drug and combination effects, the observed effect predicted by the model with IE was compared to the expected effect predicted in absence of IE. The 95%CI of the observed effect with IE was built following the same SIR procedure than previously described for the 95%CI of the expected effect w/o IE and both 95%CIs were laid out on the same figure for comparison. If the 95%CI of the observed effect with IE was

higher than the expected effect w/o IE (*i.e.* the lower boundary of the 95%CI of the observed effect was above the upper limit of the 95%CI of the expected effect), a lower bacterial killing was observed and the IE was considered to significantly reduce the drug effects. If both 95%CIs overlapped, no difference could be highlighted and the IE was considered not significant. If the 95%CI of the observed effect with IE was lower than the expected effect w/o IE (*i.e.* the upper boundary of the 95%CI of the observed effect was under the lower limit of the 95%CI of the expected effect), a significantly higher bacterial killing was observed. The comparison was performed over time for each inoculum size and at different drug concentrations.

Results

PKPD modelling of the observed drug effect and inoculum effect

A schematic representation of the PKPD model is shown on Figure 3. Typical values of the parameters considering a standard inoculum of 5.10^5 CFU/mL and their uncertainties estimated by SIR are given in Table 1. For each inoculum, the fit between model predictions and observed TKC data was confirmed by the VPCs presented on Figure 4 for the 10^8 CFU/mL starting inoculum and on Figure S1-S3 for the 10^4, 5.10^5, 10^7 CFU/mL starting inoculum, respectively.

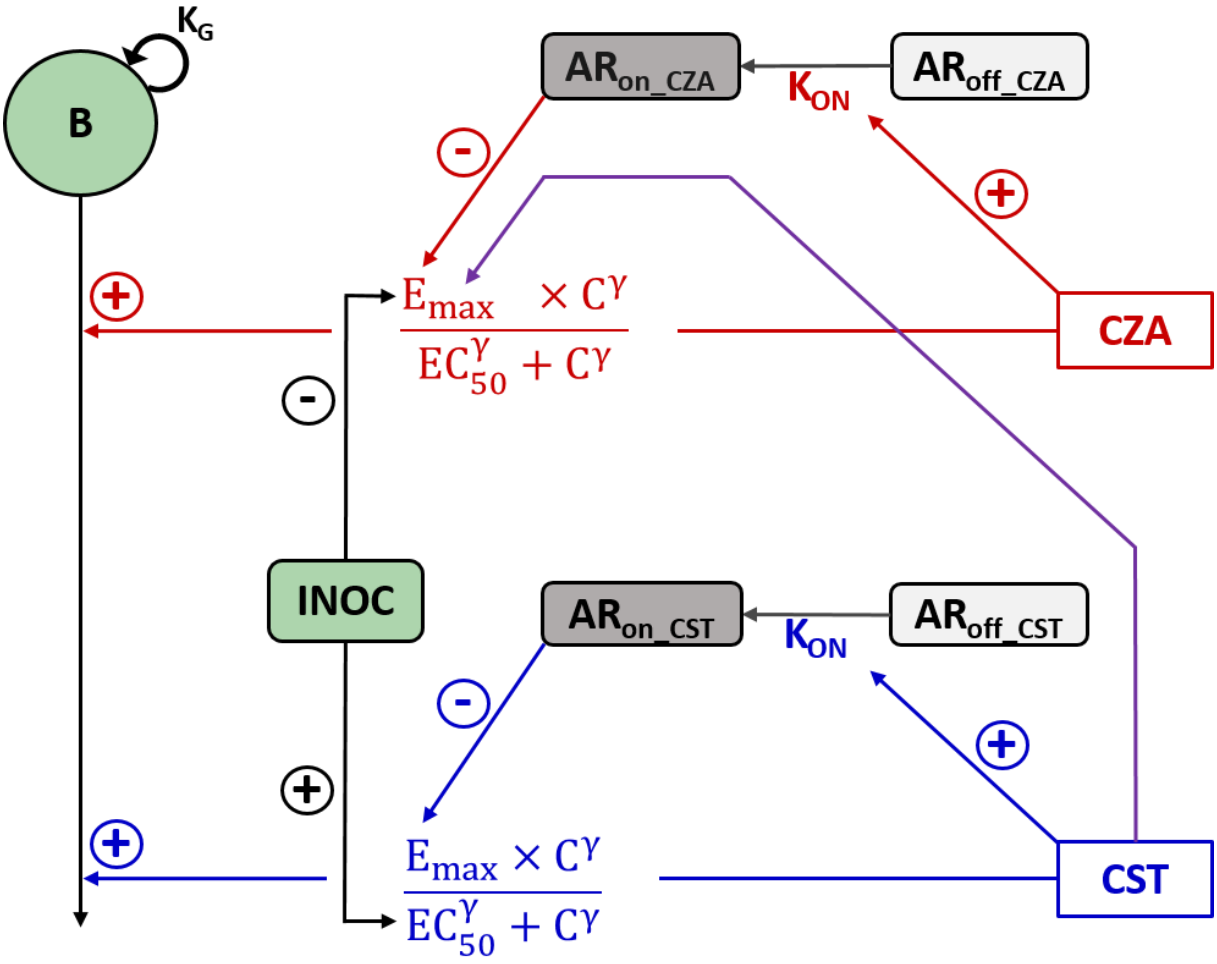


Figure 3. PKPD model schematic diagram

B, total bacterial population; K_G, growth rate; INOC, starting inoculum; AR_{off} and AR_{on}, states of adaptation; K_{on}, adaptation rate. Emax, maximum bactericidal effect (reduced proportionally to AR_{on} until reaching a residual drug effect); EC_{50}, concentration for which effect is 50% of Emax; γ, power parameter for effect. The GPDI model (symbolized by the purple *) characterized the reduction of $Emax_{CZA}$ due to CST (22). $Emax_{CZA}$ was reduced with increasing inoculum while EC_{50_CST} was increased.

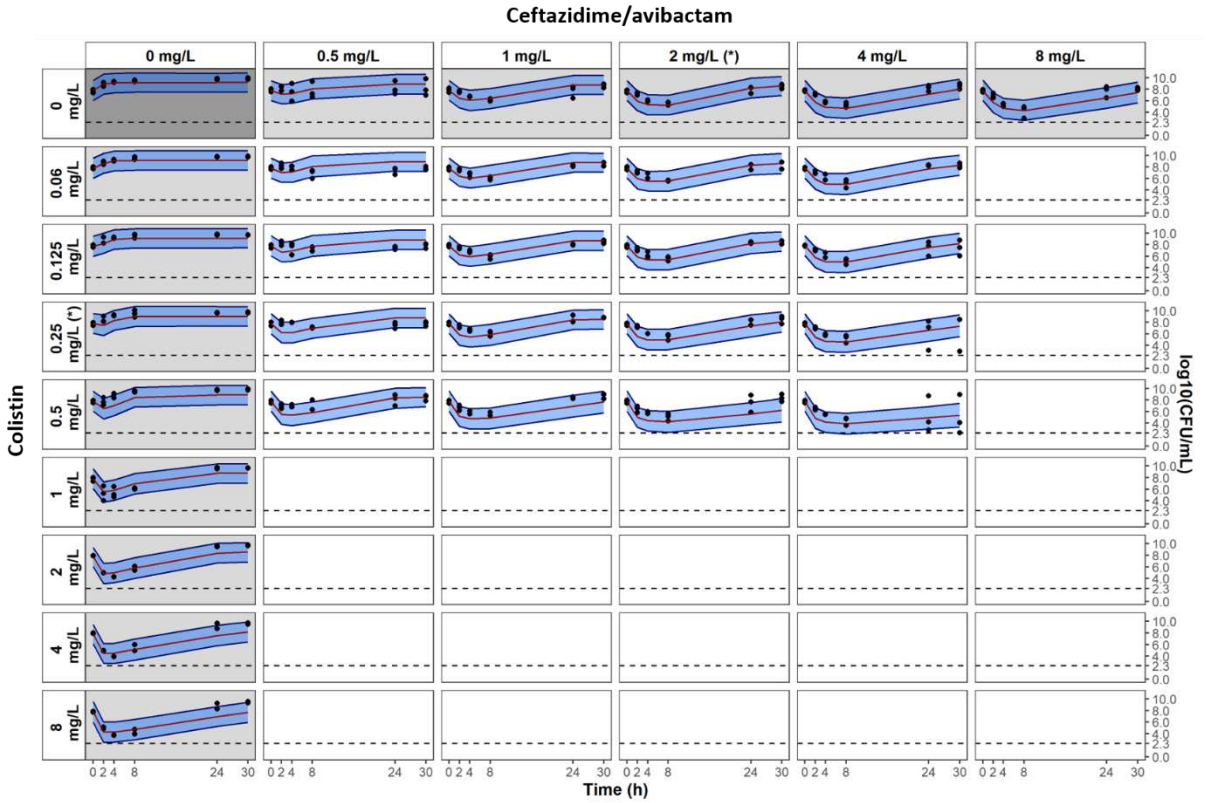


Figure 4. Visual Predictive Checks of the PKPD model at 10^8 CFU/mL inoculum

Grey and white panels are associated to single drug and combination experiments, respectively. Measured CFU are represented by dots. For graphical representation, data below limit of quantification are represented by cross at their measured values. Median percentile from simulations with the observed interaction model is represented by red line and the 80% prediction interval between 10^{th} and 90^{th} percentiles is represented by the blue shaded areas. Limit of quantification is represented by the dashed line at 2.3 $\log_{10}$CFU/mL. MICs of CZA and CST are indicated by (*). Avibactam concentration was fixed at 4 mg/L.

For a 10^4 CFU/mL starting inoculum, a rapid killing of the bacteria was achieved with drugs alone and in combination, except at lowest concentrations (Figure S1). For both 5.10^5 and 10^7 CFU/mL inoculum, an initial decay of the bacteria followed by regrowth was observed with CZA and CST alone while the combination in the range of 1x to 2x the MIC prevented the emergence of resistance (Figure S2 and S3, respectively). Bacterial eradication was never achieved for the high inoculum (*i.e.* 10^8 CFU/mL), even at highest drug concentrations (Figure 4).

The IE was best modelled as a reduction of the Emax of CZA and as an increase of the EC_{50} of CST with increasing inoculum according to Equation 1.

$$\theta_{DRUG} = \theta_{DRUG_STD} \times \left(\frac{INOC}{\log_{10}(5.10^5)}\right)^{\gamma IE_{DRUG}} \qquad \text{Equation 1}$$

Where θ_{DRUG} is the parameter value of the corresponding drug (*i.e.* $Emax_{CZA}$ (h^{-1}) or EC_{50_CST} (mg/L)) at the estimated inoculum, θ_{DRUG_STD} is the typical parameter value of the corresponding drug estimated at the standard 5.10^5 CFU/mL starting inoculum, $INOC$ ($\log_{10}$ CFU/mL) is the estimated inoculum size for each experiment and γIE_{DRUG} is estimated coefficient to describe the IE of the corresponding drug.

Consequently, the $Emax_{CZA}$ varied from 6.0 h^{-1} to 5.2 h^{-1} (-13%) and the EC_{50_CST} from 0.15 mg/L to 0.44 mg/L (+193%) when the inoculum increased from 10^4 to 10^8 CFU/mL, respectively. However, no significant interaction on IE was found, meaning that CST IE was not affected by CZA and that CZA IE was not affected by CST. Therefore, the IE independently affected the effects of CZA and CST when both drugs were combined.

Table 1. Parameter estimates of the observed effect model

CST: colistin; CZA: ceftazidime/avibactam (fixed to 4 mg/L); IE: inoculum effect; NS: Not Significant; RSE%: Relative Standard Error (%) estimated using Sampling Importance Resampling (21). [1] $\mathrm{Emax_{CZA}} = \mathrm{Emax_{CZA_STD}} \times \left(\frac{\mathrm{INOC}}{\log_{10}(5.10^5)}\right)^{\gamma \mathrm{IE_{CZA}}}$; [2] $\mathrm{EC50_{CST}} = \mathrm{EC50_{CST_STD}} \times \left(\frac{\mathrm{INOC}}{\log_{10}(5.10^5)}\right)^{\gamma \mathrm{IE_{CST}}}$; [3] None of the interactions on inoculum effects was significant

Description	Parameter	Estimate (RSE%)
Inoculum size		
Estimated inoculum size at time 0 ($\log_{10}$CFU/mL)	INOC	3.86 (fixed)
		5.54 (fixed)
		6.65 (fixed)
		7.76 (fixed)
Inter-experimental variability (%)	IEV_INOC	4.30 (fixed)
Inoculum effect CZA[1]		
Maximum kill rate constant of CZA (h^{-1}) at 5.10^5 CFU/mL	$\mathrm{Emax_{CZA_STD}}$	5.59 (3%)
Inoculum effect on $\mathrm{Emax_{CZA}}$	$\gamma \mathrm{IE_{CZA}}$	-0.21 (13%)
Inoculum effect CST[2]		
CST concentration required to achieve 50% of $\mathrm{Emax_{CST}}$ (mg/L) at 5.10^5 CFU/mL	$\mathrm{EC50_{CST_STD}}$	0.26 (9%)
Inoculum effect on $\mathrm{EC50_{CST}}$	$\gamma \mathrm{IE_{CST}}$	1.53 (10%)
Interactions on inoculum effects[3]		
Interaction of CZA on the inoculum effect of CST	$\mathrm{E_{CZA}_IE_{CST}}$	0
Interaction of CST on the inoculum effect of CZA	$\mathrm{E_{CST}_IE_{CZA}}$	0

Impact of the inoculum effect on TKC

The results demonstrated that for a 10^4 CFU/mL starting inoculum, single drug and combination effects were not significantly affected by the IE. Indeed, the 95%CI of the observed effect with IE systematically overlapped the 95%CI of the expected effect without IE (Figure 5). For a 10^7 CFU/mL inoculum, similar results were observed with non-significant impact of the IE (Figure S4). However, the effect of the CZA+CST combination was significantly reduced for a 10^8 CFU/mL inoculum at almost all concentrations (Figure 6). Interestingly, by predicting the effect only from the inoculum data at 5.10^5 CFU/mL (no consideration of the IE), concentrations higher or equal to the MICs of both drugs (2 mg/L of CZA + 0.25 mg/L of CST) were expected to achieve high killing whereas bacterial regrowth was observed at this elevated inoculum.

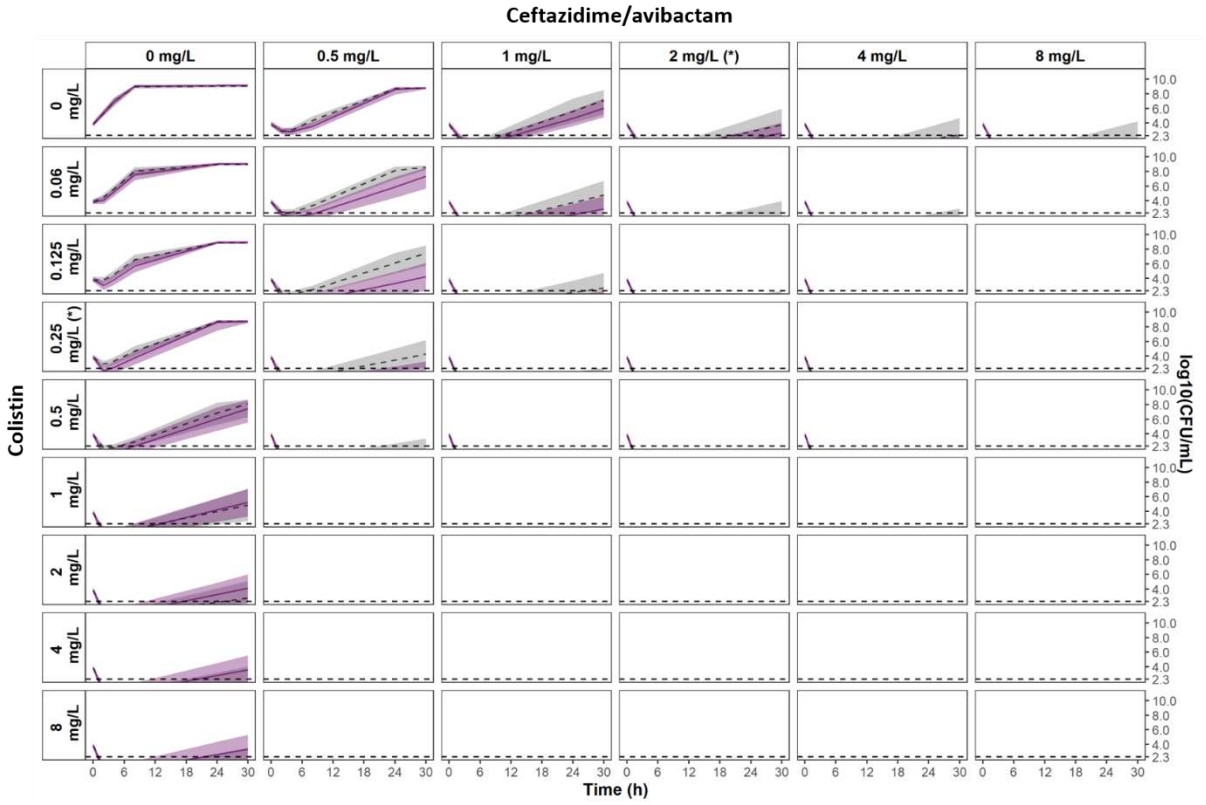


Figure 5. Comparison of the 95%CIs of the observed effect with IE (purple) versus the expected effect without IE (grey) at 10^4 CFU/mL inoculum

The 95%CI of the expected effect w/o IE, obtained by SIR, is represented by grey areas and the corresponding median percentile is represented by the dashed line. The 95%CI of the observed effect with IE is represented by light purple areas and the median percentile is represented by the solid line. The limit of quantification is represented by the horizontal dashed line at 2.3 log10CFU/mL. MICs of CZA and CST are indicated by (*).

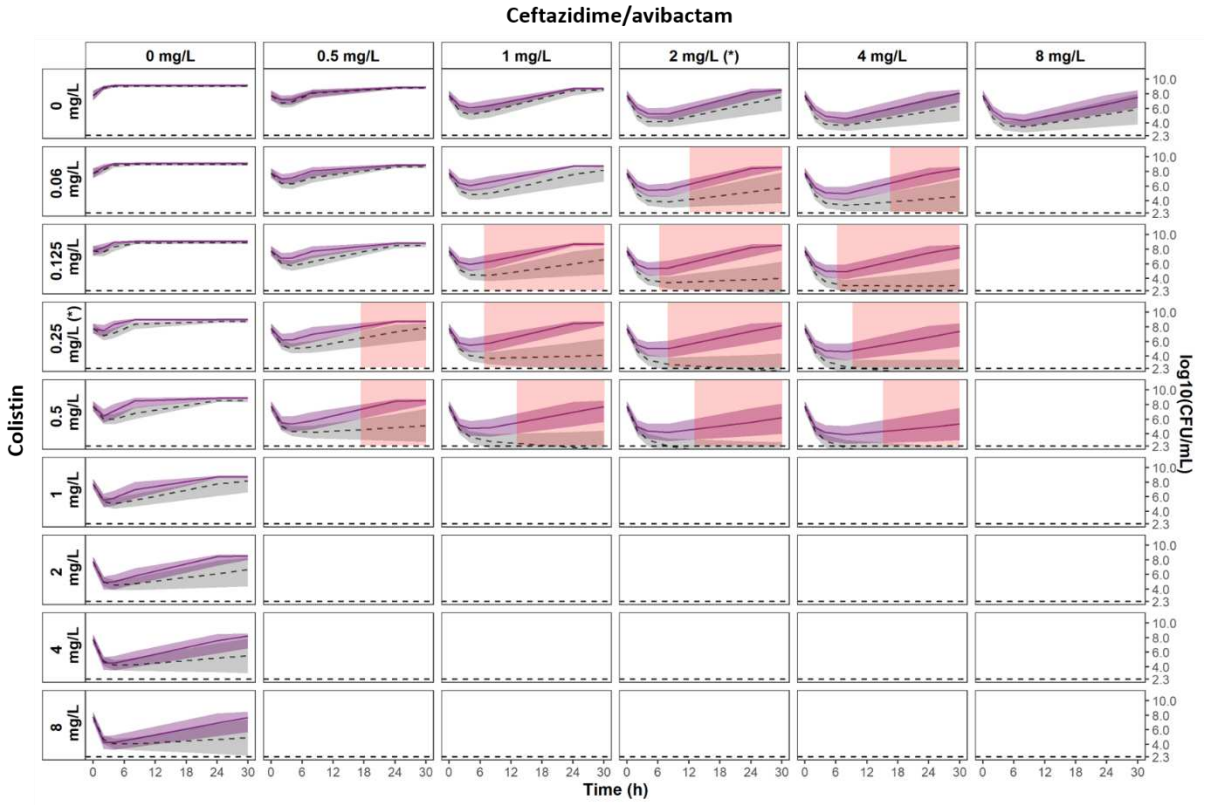


Figure 6. Comparison of the 95%CIs of the observed effect with IE (purple) versus the expected effect without IE (grey) at 10^8 CFU/mL inoculum

The 95%CI of the expected effect w/o IE, obtained by SIR, is represented by grey areas and the corresponding median percentile is represented by the dashed line. The 95%CI of the observed effect with IE is represented by light purple areas and the median percentile is represented by the solid line. Statistically significant areas of decreased drug effect (non-overlapping 95%CI) are highlighted in red. The limit of quantification is represented by the horizontal dashed line at 2.3 log10CFU/mL. MICs of CZA and CST are indicated by (*).

Discussion

These results demonstrated that *in vitro* IE can occur for combinations of antibiotics. Indeed, significant differences between the 95%CI of the observed effect with IE and the 95%CI of the expected effect without IE were observed under combination treatment, particularly at the high 10^8 CFU/mL inoculum. Our results are consistent with the previous IE studies on CZA and CST since the magnitude of the CST IE was stronger than the CZA IE. However, none of the interactions on IE investigated using the GPDI model was significant, meaning that inoculum effects independently affected CZA and CST effects.

In the literature, two PKPD modelling approaches have been used to describe the IE. The first one assumes a static IE over time using an additional mathematical function to modify the antimicrobial effect solely based on the starting inoculum. For instance in the study of Bhagunde *et al.* (15), the effective drug concentration, which determined the kill rate of the antimicrobial agent, was assumed to be inversely dependent on the initial bacterial burden, using a sigmoidal model. Similarly, Akrong *et al.* (19) characterized the IE of *Acinetobacter baumanii* on polymyxin B as an increase of the EC_{50} at higher inoculum, using a power function. In contrast, the second approach assumes a dynamic process where the IE changes according to the time course of the bacterial density using mechanism-based model. Bulitta *et al.* (12, 24) suggested that all viable bacteria synthesized and released freely diffusible signal molecules that slowed down the bacterial replication and could cause phenotypic change of bacterial cells. Nielsen *et al.* (13) characterized the IE of *Escherichia coli* strains on

ciprofloxacin using two different bacterial subpopulations, S (drug susceptible, growing bacteria) and R (non-susceptible, resting bacteria). In their model, the transfer from S to R was assumed to be proportional to the bacterial density over time and thus impacted the drug effect. Since our experimental data did not supported any particular mechanism, we characterized the IE using a static PKPD model similar to Akrong *et al.* (19).

The IE of CZA was best described as a decrease of the Emax parameter. This means that even if the drug concentration was increased, the maximum effect observed at lower inoculum was not reached. In the case of CZA, as beta-lactams act in the cell division phase (25), the decrease of Emax could be due to a lesser proliferation of bacteria when inocula are strong . On the other hand, CST interacts with the lipopolysaccharides of the outer membrane of the bacteria (26). Therefore, at high inoculum, the total number of targets is increased and a higher CST concentration is required to achieve the same effect. Accordingly, the IE was best fitted by an increase of CST EC_{50}. These hypotheses are in agreement with the mathematical models describing our observations but should be verified experimentally.

Traditionally, the IE is assessed by comparing the MIC values obtained at two different starting inoculum. The effects are therefore compared at a given time. The study of IEs with TKCs enables the evaluation of their impact over time, particularly with regard to the emergence of resistance. To evaluate the significance of the IEs we chose to compare the experimental results obtained at different inocula to the predictions made from experiments performed with a

standard inoculum (5.10^5 CFU/mL). The comparison of the 95%CIs allowed to statistically evaluate at which times and for which concentrations the IE were the most pronounced. We showed that for the CZA+CST combination and the 10^8 CFU/mL inoculum, the IE was more pronounced at late times, resulting in bacterial regrowth at concentrations close to the MICs.

To conclude, this PKPD modelling approach of *in vitro* TKCs allowed characterizing the inoculum effect of a multidrug resistant *K. pneumoniae* on antibiotic combination. Significant inoculum effects were found for CZA and CST but these inoculum effects independently affected both drug activities. Moreover, bacterial eradication without regrowth was achieved by the CZA+CST combination, except at the highest inoculum, suggesting that this phenomenon should not be neglected in *in vitro* antibiotic combination studies.

Acknowledgments

We thank Agnès Audurier (Université de Poitiers) and Théo Sauzet (Inserm U1070) for the technical support.

This collaborative project called Co-Protect was financed by a grant from the National Agency of Research (ANR), France, grant agreement number ANR-19-AMRB-0003-01.

Author contributions

JB, NG and SM designed the study; RA and LP performed experiments; PN and JWD provided the bacterial isolate; RA, AC and NG analysed the data; RA and NG wrote the manuscript; all authors reviewed the manuscript.

References

1. Lenhard JR, Bulman ZP. 2019. Inoculum effect of β-lactam antibiotics. J Antimicrob Chemother 74:2825–2843.

2. Brook I. 1989. Inoculum effect. Rev Infect Dis 11:361–368.

3. Tyers M, Wright GD. 2019. Drug combinations: a strategy to extend the life of antibiotics in the 21st century. Nat Rev Microbiol 17:141–155.

4. Smith KP, Kirby JE. 2018. The Inoculum Effect in the Era of Multidrug Resistance: Minor Differences in Inoculum Have Dramatic Effect on MIC Determination. Antimicrob Agents Chemother 62:e00433-18.

5. Bae M, Kim T, Park JH, Bae S, Sung H, Kim M-N, Jung J, Kim MJ, Kim S-H, Lee S-O, Choi S-H, Kim YS, Chong YP. 2021. In Vitro Activities of Ceftazidime-Avibactam and Aztreonam-Avibactam at Different Inoculum Sizes of Extended-Spectrum β-Lactam-Resistant Enterobacterales Blood Isolates. Antibiot Basel Switz 10:1492.

6. Mizrahi A, Chat L, Danjean M, Mory C, Nguyen Van JC, de Ponfilly GP, Caméléna F, Le Monnier A, Bercot B, Birgy A, Jacquier H, Pilmis B. 2022. Inoculum effect of Enterobacterales co-expressing OXA-48 and CTX-M on the susceptibility to ceftazidime/avibactam and meropenem. Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol 41:853–858.

7. Bergen PJ, Tsuji BT, Bulitta JB, Forrest A, Jacob J, Sidjabat HE, Paterson DL, Nation RL, Li J. 2011. Synergistic killing of multidrug-resistant Pseudomonas aeruginosa at multiple inocula by colistin combined with doripenem in an in vitro pharmacokinetic/pharmacodynamic model. Antimicrob Agents Chemother 55:5685–5695.

8. Deris ZZ, Yu HH, Davis K, Soon RL, Jacob J, Ku CK, Poudyal A, Bergen PJ, Tsuji BT, Bulitta JB, Forrest A, Paterson DL, Velkov T, Li J, Nation RL. 2012. The combination of colistin and doripenem is synergistic against Klebsiella pneumoniae at multiple inocula and suppresses colistin resistance in an in vitro pharmacokinetic/pharmacodynamic model. Antimicrob Agents Chemother 56:5103–5112.

9. Fantin B, Poujade J, Grégoire N, Chau F, Roujansky A, Kieffer N, Berleur M, Couet W, Nordmann P. 2019. The inoculum effect of Escherichia coli expressing mcr-1 or not on colistin activity in a murine model of peritonitis. Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis 25:1563.e5-1563.e8.

10. Udekwu KI, Parrish N, Ankomah P, Baquero F, Levin BR. 2009. Functional relationship between bacterial cell density and the efficacy of antibiotics. J Antimicrob Chemother 63:745–757.

11. López-Cerero L, Picón E, Morillo C, Hernández JR, Docobo F, Pachón J, Rodríguez-Baño J, Pascual A. 2010. Comparative assessment of inoculum effects on the antimicrobial activity of amoxycillin-clavulanate and piperacillin-tazobactam with extended-spectrum beta-lactamase-producing and extended-spectrum beta-lactamase-non-producing Escherichia coli isolates. Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis 16:132–136.

12. Bulitta JB, Yang JC, Yohonn L, Ly NS, Brown SV, D'Hondt RE, Jusko WJ, Forrest A, Tsuji BT. 2010. Attenuation of Colistin Bactericidal Activity by High Inoculum of Pseudomonas aeruginosa Characterized by a New Mechanism-Based Population Pharmacodynamic Model. Antimicrob Agents Chemother 54:2051–2062.

13. Nielsen EI, Khan DD, Cao S, Lustig U, Hughes D, Andersson DI, Friberg LE. 2017. Can a pharmacokinetic/pharmacodynamic (PKPD) model be predictive across bacterial densities and strains? External evaluation of a PKPD model describing longitudinal in vitro data. J Antimicrob Chemother 72:3108–3116.

14. Stevens DL, Yan S, Bryant AE. 1993. Penicillin-binding protein expression at different growth stages determines penicillin efficacy in vitro and in vivo: an explanation for the inoculum effect. J Infect Dis 167:1401–1405.

15. Bhagunde P, Chang K-T, Singh R, Singh V, Garey KW, Nikolaou M, Tam VH. 2010. Mathematical modeling to characterize the inoculum effect. Antimicrob Agents Chemother 54:4739–4743.

16. EUCAST reading guide for broth microdilution v4.0. 2022. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing.

17. M07: Dilution AST for Aerobically Grown Bacteria - CLSI. Clin Lab Stand Inst. https://clsi.org/standards/products/microbiology/documents/m07/. Retrieved 28 February 2023.

18. Thomson KS, Moland ES. 2001. Cefepime, piperacillin-tazobactam, and the inoculum effect in tests with extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae. Antimicrob Agents Chemother 45:3548–3554.

19. Akrong G, Chauzy A, Aranzana-Climent V, Lacroix M, Deroche L, Prouvensier L, Buyck JM, Couet W, Marchand S. 2022. A New Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Model To Characterize the Inoculum Effect of Acinetobacter baumannii on Polymyxin B In Vitro. Antimicrob Agents Chemother 66:e0178921.

20. Beal SL. 2001. Ways to fit a PK model with some data below the quantification limit. J Pharmacokinet Pharmacodyn 28:481–504.

21. Dosne A-G, Bergstrand M, Harling K, Karlsson MO. 2016. Improving the estimation of parameter uncertainty distributions in nonlinear mixed effects models using sampling importance resampling. J Pharmacokinet Pharmacodyn 43:583–596.

22. Wicha SG, Chen C, Clewe O, Simonsson USH. 2017. A general pharmacodynamic interaction model identifies perpetrators and victims in drug interactions. Nat Commun 8.

23. SIR user guide. PsN 5.3.0. Revised 2019-05-08. https://uupharmacometrics.github.io/PsN/docs.html.

24. Bulitta JB, Ly NS, Yang JC, Forrest A, Jusko WJ, Tsuji BT. 2009. Development and qualification of a pharmacodynamic model for the pronounced inoculum effect of ceftazidime against Pseudomonas aeruginosa. Antimicrob Agents Chemother 53:46–56.

25. Weiss DS, Pogliano K, Carson M, Guzman LM, Fraipont C, Nguyen-Distèche M, Losick R, Beckwi25. Weiss DS, Pogliano K, Carson M, Guzman LM, Fraipont C, Nguyen-Distèche M, Losick R, Beckwith J. 1997. Localization of the Escherichia coli cell division protein Ftsl (PBP3) to the division site and cell pole. Mol Microbiol 25:671–681.

26. Sabnis A, Hagart KL, Klöckner A, Becce M, Evans LE, Furniss RCD, Mavridou DA, Murphy R, Stevens MM, Davies JC, Larrouy-Maumus GJ, Clarke TB, Edwards AM. 2021. Colistin kills bacteria by targeting lipopolysaccharide in the cytoplasmic membrane. eLife 10:e65836.th J. 1997. Localization of the Escherichia coli cell division protein Ftsl (PBP3) to the division site and cell pole. Mol Microbiol 25:671–681.

Supplemental materials

Table S1. Full parameter estimates of the observed inoculum effect model

CST: colistin; CZA: ceftazidime/avibactam (fixed to 4 mg/L). RSE%, Relative Standard Error (%) estimated using Sampling Importance Resampling procedure.

Parameter	Description	Estimate (RSE%)
INOC	Estimated inoculum size at time 0 (log_{10}CFU/mL)	3.86 (fixed)
		5.54 (fixed)
		6.65 (fixed)
		7.76 (fixed)
K_G	Apparent growth rate constant (h^{-1})	1.77 (6%)
Bmax	Maximal bacterial population supported by the system (log_{10}CFU/mL)	9.14 (1%)
$Emax_{_CZA}$	Maximum kill rate constant of CZA (h^{-1})	5.59 (3%)
EC_{50_CZA}	CZA concentration required to achieve 50% of $Emax_{_CZA}$ (mg/L)	0.40 (6%)
γ_{CZA}	Sigmoïdicity parameter for CZA effect	1.26 (8%)
K_{ON_CZA}	Rate constant for development of adaptive resistance to CZA (h^{-1})	0.31 (7%)
K_{OFF}	Rate constant for reversal of adaptive resistance (h^{-1})	0 (fixed)
$ARmax_{_CZA}$	Maximal reduction of $Emax_{_CZA}$ when bacteria are in the adapted state (%)	72.9 (2%)
γ_IE_{CZA}	Inoculum effect on $Emax_{_CZA}$	-0.21 (13%)
$Emax_{_CST}$	Maximum kill rate constant of CST (h^{-1})	13.79 (11%)
EC_{50_CST}	CST concentration required to achieve 50% of $Emax_{_CST}$ (mg/L)	0.26 (9%)
γ_{CST}	Sigmoïdicity parameter for CST effect	1.21 (4%)
K_{ON_CST}	Rate constant for development of adaptive resistance to CST (h^{-1})	1.28 (14%)
$ARmax_{_CST}$	Maximal reduction of $Emax_{_CST}$ when bacteria are in the adapted state (%)	89.1 (1%)
γ_IE_{CST}	Inoculum effect on EC_{50_CST}	1.53 (10%)
Perpetrator	Drug responsible for the PD interaction	CST
INT_Emax	Maximal fractional change of $Emax_{_CZA}$ due to CST (%)	-63.0 (11%)
$EC_{50_INT_Emax}$	Concentration of CST required to achieve 50% of INT_Emax (mg/L)	0.30 (fixed)
γ_{INT_Emax}	Sigmoïdicity parameter for the combination effect	1 (fixed)
IEV_INOC	Inter-experimental variability on inoculum size (%)	4.30 (fixed)
RES_ADD	Additive residual error (log_{10}CFU/mL)	1.73 (4%)

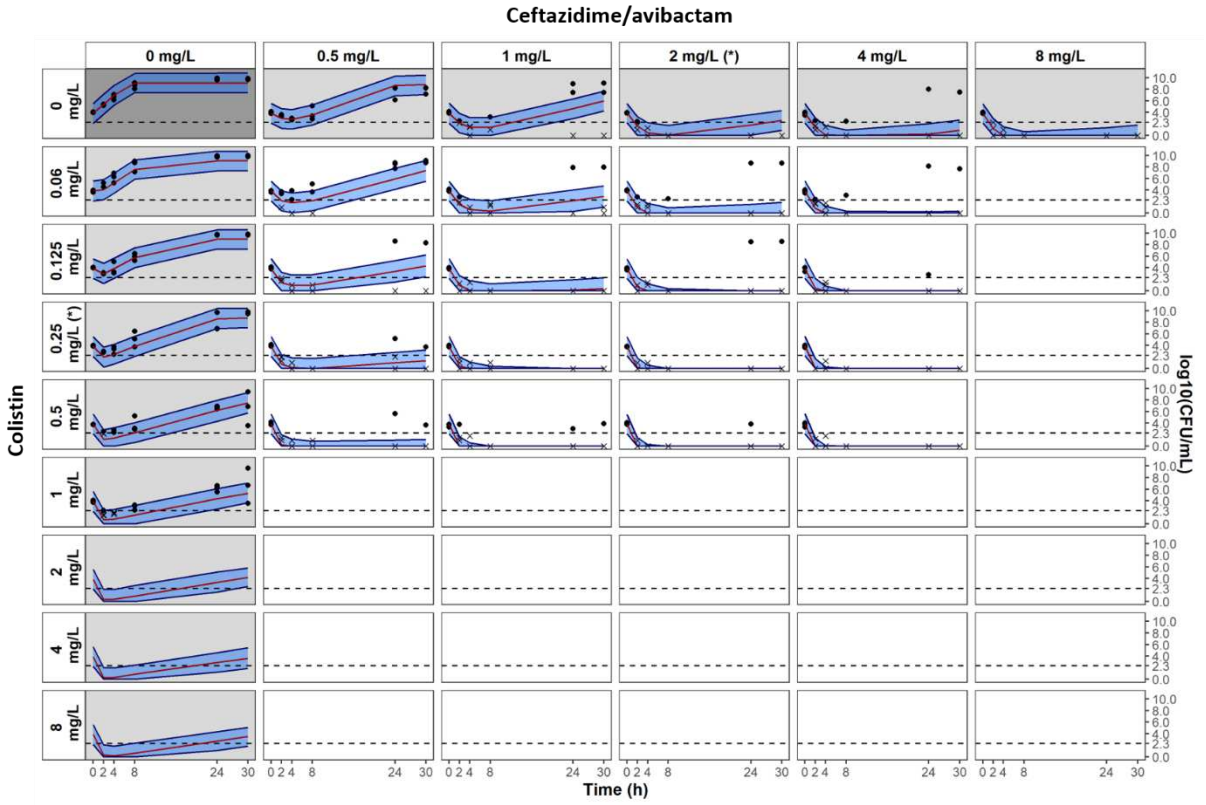


Figure S1. Visual Predictive Checks of the PKPD model at 1.10^4 CFU/mL inoculum

Grey and white panels are associated to single drug and combination experiments, respectively. Measured CFU are represented by dots. For graphical representation, data below limit of quantification are represented by cross at their measured values. Median percentile from simulations with the observed interaction model is represented by red line and the 80% prediction interval between 10th and 90th percentiles is represented by the blue shaded areas. Limit of quantification is represented by the dashed line at 2.3 log10CFU/mL. MICs of CZA and CST are indicated by (*). Avibactam concentration was fixed at 4 mg/L.

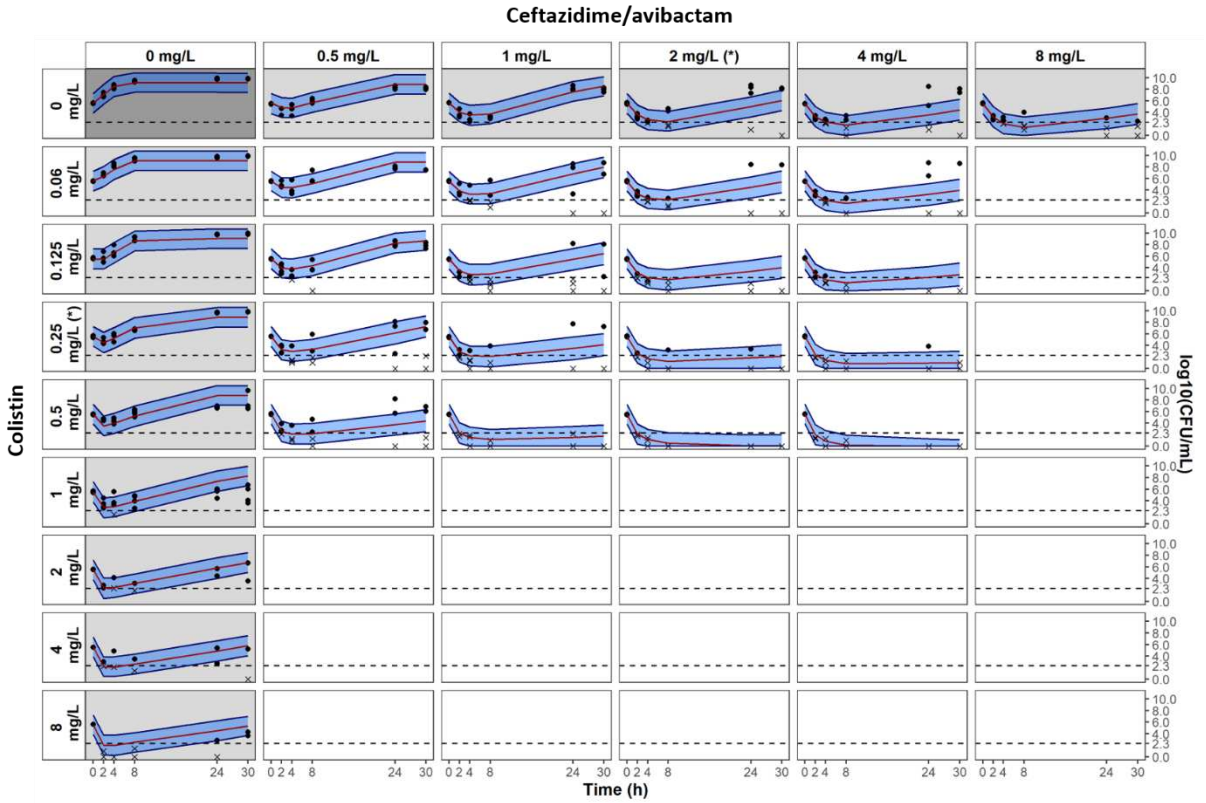


Figure S2. Visual Predictive Checks of the PKPD model at 5.10^5 CFU/mL inoculum

Grey and white panels are associated to single drug and combination experiments, respectively. Measured CFU are represented by dots. For graphical representation, data below limit of quantification are represented by cross at their measured values. Median percentile from simulations with the observed interaction model is represented by red line and the 80% prediction interval between 10^{th} and 90^{th} percentiles is represented by the blue shaded areas. Limit of quantification is represented by the dashed line at 2.3 $\log_{10}$CFU/mL. MICs of CZA and CST are indicated by (*). Avibactam concentration was fixed at 4 mg/L.

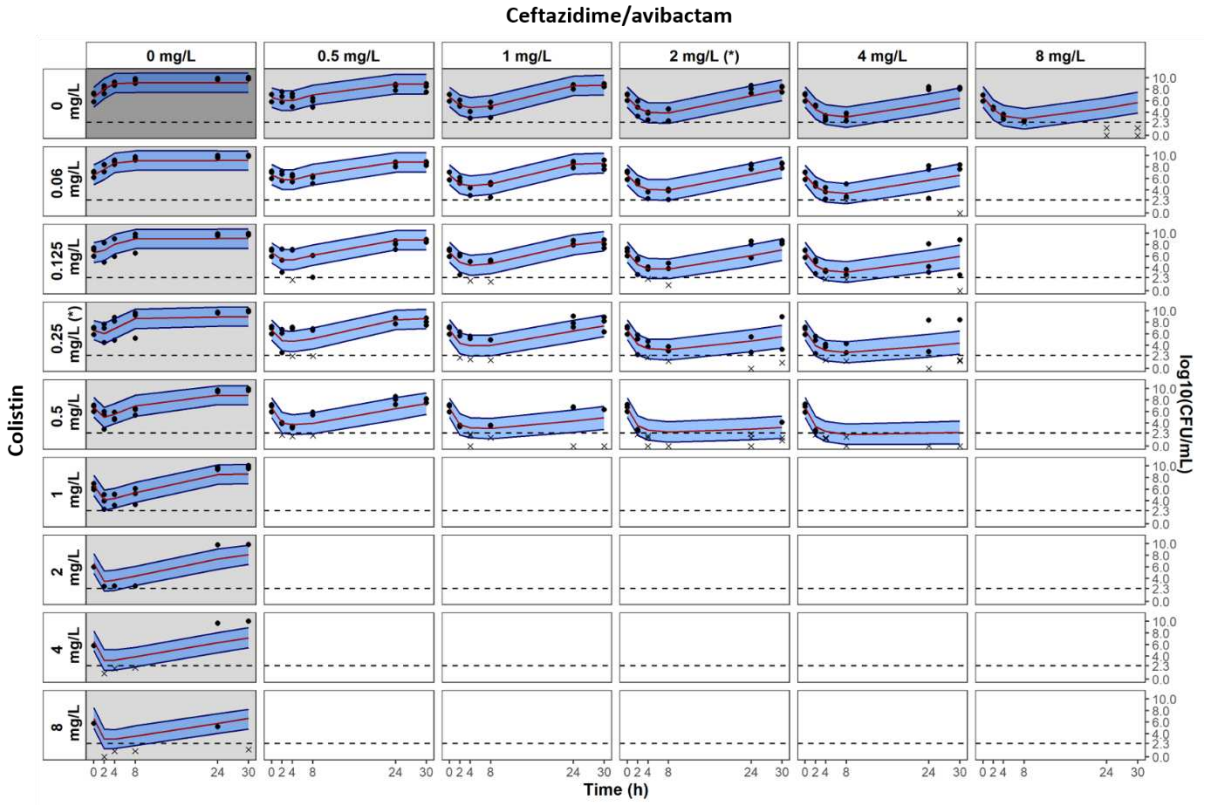


Figure S3. Visual Predictive Checks of the PKPD model at 1.10^7 CFU/mL inoculum

Grey and white panels are associated to single drug and combination experiments, respectively. Measured CFU are represented by dots. For graphical representation, data below limit of quantification are represented by cross at their measured values. Median percentile from simulations with the observed interaction model is represented by red line and the 80% prediction interval between 10^{th} and 90^{th} percentiles is represented by the blue shaded areas. Limit of quantification is represented by the dashed line at 2.3 $\log_{10}$CFU/mL. MICs of CZA and CST are indicated by (*). Avibactam concentration was fixed at 4 mg/L.

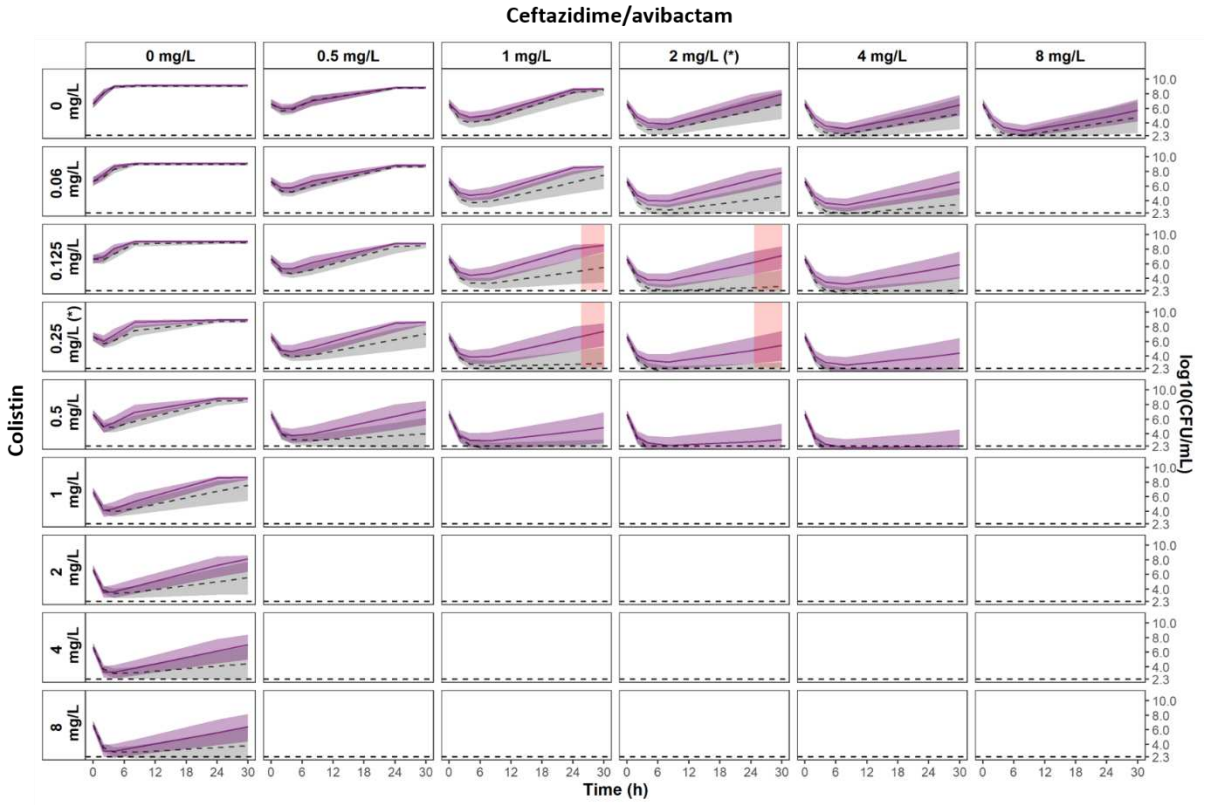


Figure S4. Comparison of the 95%CIs of the observed effect with IE (purple) versus the expected effect without IE (grey) at 1.10^7 CFU/mL inoculum

The 95%CI of the expected effect w/o IE, obtained by SIR, is represented by grey areas and the corresponding median percentile is represented by the dashed line. The 95%CI of the observed effect with IE is represented by light purple areas and the median percentile is represented by the solid line. Statistically significant areas of decreased drug effect (non-overlapping 95%CI) are highlighted in red. The limit of quantification is represented by the horizontal dashed line at 2.3 log10CFU/mL. MICs of CZA and CST are indicated by (*).

13. Discussion et perspectives

L'utilisation des antibiotiques en combinaison apporte un degré de complexité supplémentaire. Les études cliniques étant relativement longues et couteuses, le développement et l'optimisation de ces traitements repose essentiellement sur des études *in vitro* et *in vivo*. Pendant de nombreuses années, ces études ont été réalisées à partir de méthodologies relativement simples et pratiques mais apportant une information limitée sur l'efficacité des antibiotiques en combinaison, en particulier la méthode traditionnelle des checkerboards qui s'est principalement focalisée sur l'identification d'interactions synergiques. Or, cette notion n'est pas nécessairement représentative de l'efficacité des antibiotiques aux concentrations d'intérêt, ni de la capacité des antibiotiques à prévenir l'émergence de résistance. Avec l'essor de la modélisation PKPD, de nombreux outils ont vu le jour, permettant d'étudier les combinaisons d'antibiotiques de manière plus précise. Mais, cette approche nécessite de recueillir des données plus riches ce qui engendre inévitablement une augmentation des coûts expérimentaux.

Dans le premier article présenté dans cette thèse, l'optimisation de design a été utilisée dans un cadre de screening afin de favoriser l'identification des combinaisons les plus efficaces *in vitro*. En effet, le design optimal de checkerboard proposé ici visait à réduire le nombre de conditions expérimentales, tout en apportant autant (voire plus) d'information que d'autres designs non optimisés. Cette stratégie peut donc permettre d'associer davantage d'antibiotiques entre eux[9] ou d'étudier l'efficacité d'une combinaison sur un plus grand nombre de souches de bactéries.

[9] A titre d'exemple, nous avons réalisé d'autres expériences dans le cadre du projet Co-Protect, dans lesquelles le ceftolozane/tazobactam ou le méropénème/vaborbactam était associé avec la colistine ou l'amikacine.

Les résultats expérimentaux issus du screening préliminaire ont montré que l'effet de la combinaison de la ceftazidime/avibactam avec la colistine n'était pas identique entre les deux espèces bactériennes étudiées : l'interaction était systématiquement antagoniste chez *E. coli* tandis qu'elle tendait vers la synergie chez *K. pneumoniae* (cf. paragraphe 10). Bien que la méthodologie utilisée dans cette étude reste insuffisante pour caractériser précisément l'effet de cette combinaison, les résultats soulignent la nécessité d'adapter et d'optimiser les traitements à chaque situation afin de lutter durablement contre l'antibiorésistance. Pour obtenir une vision globale de l'efficacité d'un traitement, il est nécessaire de générer davantage de données, recueillies sur un plus grand nombre de souches. L'optimisation de design apparaît alors comme indispensable pour ce genre de projets de grande envergure. De plus, cette stratégie implique d'utiliser les bons outils pour caractériser précisément l'efficacité des antibiotiques.

A l'heure actuelle, les modèles PKPD *in vitro* ont une portée essentiellement descriptive (*i.e.* ils sont développés pour décrire les données observées expérimentalement), permettant de mieux comprendre les relations PKPD entre un antibiotique (seul ou combinaison) et une bactérie (123). Bien que ces modèles soient aussi utilisés pour simuler d'autres scénarios, la principale difficulté réside dans l'extrapolation des résultats observés *in vitro* vers un contexte *in vivo* ou clinique. En effet, ces modèles *in vitro* reposent sur des hypothèses fortes qui, souvent, ne sont plus valables lorsqu'on change de cadre. De fait, leurs capacités prédictives peuvent être limitées.

Dans le second article présenté dans cette thèse, l'efficacité de la ceftazidime/avibactam utilisée en association avec la colistine contre quatre souches de *K. pneumoniae* a été étudiée par l'intermédiaire d'expériences de time-kill. Un modèle générique permettant de décrire l'effet de la combinaison contre chacune des souches a été développé à partir de ces données. Ce modèle a ensuite été relié aux modèles PK de la ceftazidime/avibactam et de la colistine afin d'extrapoler l'effet de cette combinaison dans le cas où les concentrations de chaque molécule coïncideraient avec les concentrations typiquement observées chez un patient. Ces simulations supposent que le modèle PD *in vitro*

correspondrait exactement au modèle PD chez l'Homme. Cette hypothèse étant relativement forte puisqu'elle néglige de nombreuses composantes biologiques (caractéristiques de l'infection, développement de biofilms, influence du système immunitaire etc.), ces résultats de simulation doivent être interprétés avec prudence. De plus, ce modèle ne tient pas compte de la variabilité interindividuelle qui peut impacter le profil PK des molécules et donc leur efficacité. Néanmoins, les modèles PKPD se veulent de plus en plus réalistes et il est probable que leurs capacités prédictives s'améliorent dans les années à venir.

Pour continuer d'améliorer l'étude PKPD des antibiotiques *in vitro*, des expériences dans des conditions dynamiques peuvent être réalisées à l'aide du système « hollow fibre » (124). L'intérêt de ce système réside dans la possibilité d'administrer les antibiotiques de façon à simuler les profils PK observés chez l'Homme. Ce type d'expérience beaucoup plus couteuses, peut être utilisé pour affiner les modèles *in vitro* développés à partir des time-kill curve. La PD des antibiotiques étant étudiée avec des concentrations variables au cours du temps, certaines hypothèses sous-jacentes au modèle de time-kill peuvent être levées en vue d'extrapoler les résultats *in vitro* vers un autre contexte. Par ailleurs, une autre manière de modéliser la pharmacocinétique des antibiotiques tend à se développer. Il s'agit de la modélisation basée sur la physiologie (PBPK pour Physiology Based PharmacoKinetics). Cette approche présente une philosophie différente de la modélisation compartimentale usuelle puisqu'elle cherche à décrire la pharmacocinétique d'une molécule dans un organisme (ou dans un organe) en intégrant un maximum d'informations sur l'anatomie et la physiologie de l'organisme ainsi que sur les propriétés physico-chimiques des molécules. A titre d'exemple, Sadiq *et al*. (125) ont pu prédire l'évolution de l'activité antibactérienne de la ciprofloxacine au niveau du site infectieux en couplant un modèle PBPK (décrivant les concentrations libres extracellulaires au cours du temps) avec un modèle PKPD développé *in vitro*. L'amélioration des modèles n'est cependant pas suffisante, et il est nécessaire de trouver de nouveaux marqueurs permettant de caractériser précisément la PKPD des antibiotiques et l'émergence de résistance.

A la fin du XX^{ème} et au début du XIX^{ème} siècle, les méthodes « omics » ont considérablement progressé et la modélisation PKPD cherche désormais à intégrer ces informations mécanistiques, notamment pour expliquer les mécanismes à l'origine des phénomènes de résistance. La génomique et plus particulièrement le séquençage sur génome entier (126) s'est fortement développé avec l'amélioration des techniques de séquençage à haut débit, des outils d'assemblage et de bases de données, permettant d'identifier rapidement le résistome des bactéries (*i.e.* l'ensemble des gènes de résistance). Cette méthode est aussi utilisée pour détecter des mutations de gènes apparues suite à l'exposition aux antibiotiques et ayant entraînées des phénomènes de résistance. Dans notre seconde étude, le génome des quatre *K. pneumoniae* a été entièrement séquencé avant et après traitement mais nous n'avons pas pu mettre en évidence une relation entre le génotype et le phénotype des bactéries capables de repousser en présence de l'un et/ou l'autre des antibiotiques. Là encore, l'étude du génome et de ses mutations doit être menée sur un plus grand nombre de souches afin de mettre en évidence des tendances généralisables à l'ensemble de la population bactérienne. De plus, les approches quantitatives telle que la RT-qPCR (PCR quantitative en temps réel) permettent de suivre le niveau d'expression des gènes au cours du temps et apportent des informations complémentaires car la mutation d'un gène n'implique pas systématiquement une résistance bactérienne.

Depuis les années 2000, une autre approche, la métabolomique, a connu un net progrès. Cette discipline s'intéresse aux métabolites produits par des cellules pour comprendre leur métabolisme et leurs réactions face à un stress. La métabolomique se concentre sur l'étude de molécules dont la taille n'excède pas 10 Kda et qui ne peuvent pas être étudiées par les autres techniques « omics ». Cette approche commence à être utilisée pour étudier les réactions métaboliques d'une population de bactéries en réponse à l'exposition aux antibiotiques et devrait permettre de générer de nouveaux marqueurs caractéristiques de l'efficacité et/ou de la résistance. Rahim *et al.* (127) ont par exemple étudié la combinaison entre la polymyxine B et le chloramphénicol contre une souche de *K. pneumoniae* productrice de New Dehlhi Metallo-β-lactamases à l'aide de cette approche.

Dans cette étude les auteurs ont montré que l'altération du métabolisme des bactéries était essentiellement imputable au chloramphénicol. Maifiah *et al.* (128) ont aussi montré que l'association entre la colistine et le doripénème permettait de tuer une souche ATCC d'*A. baumannii* par une inhibition temps-dépendante de plusieurs voies métaboliques essentielles à la survie de la bactérie (biosynthèse de l'enveloppe cellulaire, métabolisme des nucléotides et métabolisme énergétique). Ces nouvelles approches apportent des informations essentielles à la compréhension des mécanismes sous-jacents au développement de résistance et à la pharmacodynamie des antibiotiques.

La cytométrie en flux constitue une autre technique d'avenir pour étudier les populations bactériennes de manière qualitative et quantitative. Cette approche permet de caractériser individuellement chaque bactérie contenue dans un échantillon et d'en identifier les éventuelles sous-populations (à condition d'en connaître les marqueurs spécifiques). La cytométrie en flux a par exemple été utilisée dans plusieurs études (129, 130) pour caractériser des bactéries persistantes. Ce phénomène décrit la capacité des bactéries à changer de phénotype pour devenir tolérantes à l'antibiotique[10], mais en contrepartie elles ne sont plus capables de se répliquer en présence du traitement. Ces données mécanistiques peuvent guider le développement du modèle PD de manière à adapter sa structure afin de prendre en compte la persistance, comme décrit dans la revue de Nielsen *et al.* (54). Une autre application de la cytométrie en flux a permis d'étudier la compétition entre quatre souches *E. coli*, dont une sauvage (WT) et trois mutantes (MT), exposées à la ciprofloxacine (131). Le ratio WT:MT a été décrit à l'aide d'un modèle PKPD afin de prédire les schémas posologiques qui favorisent à la sélection de résistances (*i.e.* lorsque la population MT devenait majoritaire).

L'ensemble des approches présentées ci-dessus permettent de générer des données très précises sur les mécanismes en jeu mais ces données sont excessivement lourdes. Par

[10] A la différence de la résistance qui est associée à une augmentation de la CMI, la persistance n'entraîne pas un changement de sensibilité à l'antibiotique. De plus, les bactéries résistantes maintiennent leur capacité de croissance.

conséquent, de nouvelles méthodes doivent être mises en œuvre pour analyser ces résultats. Dans ce contexte, les techniques d'intelligence artificielle sont en plein essor puisqu'elles sont très adaptées au traitement des données de grande dimension. Le challenge pour les modélisateurs consiste désormais intégrer ces données afin d'améliorer les performances prédictives des modèles.

Il existe des phénomènes observés *in vitro* dont la pertinence en situation clinique reste débattue. C'est notamment le cas de l'effet inoculum (132). Dans notre troisième étude, les résultats ont montré que la taille de l'inoculum pouvait impacter significativement l'effet des antibiotiques utilisés en combinaison. Néanmoins, la question d'intégrer ou non un effet inoculum dans un modèle PKPD développé *in vitro* en vue d'extrapoler vers un contexte *in vivo* ou clinique peut se poser. A ce jour, les études cliniques ayant évalué l'effet inoculum sont manquantes et il n'y a donc pas de preuve suffisante de ce phénomène. Il ne faut pas perdre de vue l'idée que le développement des modèles PKPD *in vitro* doit avant tout être guidé par des considérations cliniques pertinentes, la finalité de ces outils étant effectivement de permettre une meilleure utilisation des antibiotiques chez le patient.

14. Conclusion

La modélisation PKPD est de plus en plus utilisée pour étudier les combinaisons d'antibiotiques et les agences réglementaires recommandent cette méthodologie afin d'apporter des éléments rationnels au développement et à l'optimisation des traitements. Ses applications, déjà nombreuses, se sont diversifiées, proposant de nouveaux outils toujours plus adaptés à l'optimisation des protocoles expérimentaux, à l'estimation des paramètres et de leurs incertitudes, au développement de modèles complexes intégrant des informations mécanistiques et aux simulations de scénarios alternatifs permettant l'extrapolation des résultats vers un contexte clinique. Cette science à l'interface de nombreuses disciplines continue de se développer à mesure que les données qu'elle cherche à traiter évoluent.

15. Références

1. World Health Organization. 2021. Global antimicrobial resistance and use surveillance system (GLASS) report: 2021. World Health Organization, Geneva. https://apps.who.int/iris/handle/10665/341666. Retrieved 18 August 2022.

2. The Review on Antimicrobial Resistance, chaired by Jim O'Neill. Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations. https://amr-review.org/sites/default/files/160518_Final%20paper_with%20cover.pdf. Retrived 18 August 2022.

3. Tommasi R, Brown DG, Walkup GK, Manchester JI, Miller AA. 2015. ESKAPEing the labyrinth of antibacterial discovery. Nat Rev Drug Discov 14:529–542.

4. European Medicines Agency. European Medicines Agency. Filtered query of new antibiotics since 01/01/2000. Eur Med Agency. Retrieved 18 August 2022.

5. WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed. https://www.who.int/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed. Retrieved 18 August 2022.

6. Bush K, Bradford PA. 2020. Epidemiology of β-Lactamase-Producing Pathogens. Clin Microbiol Rev 33:e00047-19.

7. Tyers M, Wright GD. 2019. Drug combinations: a strategy to extend the life of antibiotics in the 21st century. Nat Rev Microbiol 17:141–155.

8. Rational beta-lactam/beta-lactamase-inhibitor-based combination therapies of last-resort antibiotics to maximise efficacy and protect against emergence of resistance. Agence Natl Rech. https://anr.fr/Project-ANR-19-AMRB-0003. Retrieved 24 August 2022.

9. PubChem. Ceftazidime. https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5481173. Retrieved 24 August 2022.

10. Richards DM, Brogden RN. 1985. Ceftazidime. A review of its antibacterial activity, pharmacokinetic properties and therapeutic use. Drugs 29:105–161.

11. FORTAZ® (ceftazidime for injection) Prescribing information. https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2014/050578s055,050634s023lbledt.pdf.

12. Jacoby GA. 2009. AmpC β-Lactamases. Clin Microbiol Rev 22:161–182.

13. Cabot G, Ocampo-Sosa AA, Tubau F, Macia MD, Rodríguez C, Moya B, Zamorano L, Suárez C, Peña C, Martínez-Martínez L, Oliver A, Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REIPI). 2011. Overexpression of AmpC and efflux pumps in Pseudomonas aeruginosa isolates from bloodstream infections: prevalence and impact on resistance in a Spanish multicenter study. Antimicrob Agents Chemother 55:1906–1911.

14. Ambler RP. 1980. The structure of beta-lactamases. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 289:321–331.

15. Hall BG, Barlow M. 2005. Revised Ambler classification of {beta}-lactamases. J Antimicrob Chemother 55:1050–1051.

16. Zavicefta EPAR Public assessment report. EMA/CHMP/377887/2016.

17. PubChem. Avibactam. https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/9835049. Retrieved 24 August 2022.

18. Ehmann DE, Jahić H, Ross PL, Gu R-F, Hu J, Kern G, Walkup GK, Fisher SL. 2012. Avibactam is a covalent, reversible, non-β-lactam β-lactamase inhibitor. Proc Natl Acad Sci U S A 109:11663–11668.

19. Berkhout J, Melchers MJ, van Mil AC, Nichols WW, Mouton JW. 2015. In vitro activity of ceftazidime-avibactam combination in in vitro checkerboard assays. Antimicrob Agents Chemother 59:1138–1144.

20. Chauzy A, Gaelzer Silva Torres B, Buyck J, de Jonge B, Adier C, Marchand S, Couet W, Grégoire N. 2019. Semimechanistic Pharmacodynamic Modeling of Aztreonam-Avibactam Combination to Understand Its Antimicrobial Activity Against Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacteria. CPT Pharmacomet Syst Pharmacol 8:815–824.

21. Lagacé-Wiens PRS, Tailor F, Simner P, DeCorby M, Karlowsky JA, Walkty A, Hoban DJ, Zhanel GG. 2011. Activity of NXL104 in combination with beta-lactams against genetically characterized Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae isolates producing class A extended-spectrum beta-lactamases and class C beta-lactamases. Antimicrob Agents Chemother 55:2434–2437.

22. Sutaria DS, Moya B, Green KB, Kim TH, Tao X, Jiao Y, Louie A, Drusano GL, Bulitta JB. 2018. First Penicillin-Binding Protein Occupancy Patterns of β-Lactams and β-Lactamase Inhibitors in Klebsiella pneumoniae. Antimicrob Agents Chemother 62:e00282-18.

23. Asli A, Brouillette E, Krause KM, Nichols WW, Malouin F. 2016. Distinctive Binding of Avibactam to Penicillin-Binding Proteins of Gram-Negative and Gram-Positive Bacteria. Antimicrob Agents Chemother 60:752–756.

24. European Centre for Disease Prevention and Control. 2013. Antimicrobial resistance surveillance in Europe :annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS Net) 2012. Publications Office, LU. https://data.europa.eu/doi/10.2900/93403. Retrieved 30 August 2022.

25. Shirley M. 2018. Ceftazidime-Avibactam: A Review in the Treatment of Serious Gram-Negative Bacterial Infections. Drugs 78:675–692.

26. Humphries RM, Yang S, Hemarajata P, Ward KW, Hindler JA, Miller SA, Gregson A. First Report of Ceftazidime-Avibactam Resistance in a KPC-3-Expressing Klebsiella pneumoniae Isolate. Antimicrob Agents Chemother 59:6605–6607.

27. Shields RK, Chen L, Cheng S, Chavda KD, Press EG, Snyder A, Pandey R, Doi Y, Kreiswirth BN, Nguyen MH, Clancy CJ. Emergence of Ceftazidime-Avibactam Resistance Due to Plasmid-Borne blaKPC-3 Mutations during Treatment of Carbapenem-Resistant Klebsiella pneumoniae Infections. Antimicrob Agents Chemother 61:e02097-16.

28. Giddins MJ, Macesic N, Annavajhala MK, Stump S, Khan S, McConville TH, Mehta M, Gomez-Simmonds A, Uhlemann A-C. 2018. Successive Emergence of Ceftazidime-Avibactam Resistance through Distinct Genomic Adaptations in blaKPC-2-Harboring Klebsiella pneumoniae Sequence Type 307 Isolates. Antimicrob Agents Chemother 62:e02101-17.

29. Zhang P, Shi Q, Hu H, Hong B, Wu X, Du X, Akova M, Yu Y. 2020. Emergence of ceftazidime/avibactam resistance in carbapenem-resistant Klebsiella pneumoniae in China. Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis 26:124.e1-124.e4.

30. Gaibani P, Lewis RE, Volpe SL, Giannella M, Campoli C, Landini MP, Viale P, Re MC, Ambretti S. 2017. In vitro interaction of ceftazidime-avibactam in combination with different antimicrobials against KPC-producing Klebsiella pneumoniae clinical isolates. Int J Infect Dis IJID Off Publ Int Soc Infect Dis 65:1–3.

31. Wang Y, Wang J, Wang R, Cai Y. 2020. Resistance to ceftazidime-avibactam and underlying mechanisms. J Glob Antimicrob Resist 22:18–27.

32. Rapid Risk Assessment - Emergence of resistance to ceftazidime-avibactam in carbapenem-resistant Enterobacteriaceae, 2018, European Center for Disease Prevention and Control.

33. Nelson K, Hemarajata P, Sun D, Rubio-Aparicio D, Tsivkovski R, Yang S, Sebra R, Kasarskis A, Nguyen H, Hanson BM, Leopold S, Weinstock G, Lomovskaya O, Humphries RM. 2017. Resistance to Ceftazidime-Avibactam Is Due to Transposition of KPC in a Porin-Deficient Strain of Klebsiella pneumoniae with Increased Efflux Activity. Antimicrob Agents Chemother 61:e00989-17.

34. Pagès J-M, Peslier S, Keating TA, Lavigne J-P, Nichols WW. 2015. Role of the Outer Membrane and Porins in Susceptibility of β-Lactamase-Producing Enterobacteriaceae to Ceftazidime-Avibactam. Antimicrob Agents Chemother 60:1349–1359.

35. Tumbarello M, Raffaelli F, Giannella M, Mantengoli E, Mularoni A, Venditti M, De Rosa FG, Sarmati L, Bassetti M, Brindicci G, Rossi M, Luzzati R, Grossi PA, Corona A, Capone A, Falcone M, Mussini C, Trecarichi EM, Cascio A, Guffanti E, Russo A, De Pascale G, Tascini C, Gentile I, Losito AR, Bussini L, Corti G, Ceccarelli G, Corcione S, Compagno M, Giacobbe DR, Saracino A, Fantoni M, Antinori S, Peghin M, Bonfanti P, Oliva A, De Gasperi A, Tiseo G, Rovelli C, Meschiari M, Shbaklo N, Spanu T, Cauda R, Viale P. 2021. Ceftazidime-Avibactam Use for Klebsiella pneumoniae Carbapenemase-Producing K. pneumoniae Infections: A Retrospective Observational Multicenter Study. Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am 73:1664–1676.

36. Mikhail S, Singh NB, Kebriaei R, Rice SA, Stamper KC, Castanheira M, Rybak MJ. 2019. Evaluation of the Synergy of Ceftazidime-Avibactam in Combination with Meropenem, Amikacin, Aztreonam, Colistin, or Fosfomycin against Well-Characterized Multidrug-Resistant Klebsiella pneumoniae and Pseudomonas aeruginosa. Antimicrob Agents Chemother 63:e00779-19.

37. Di Bella S, Giacobbe DR, Maraolo AE, Viaggi V, Luzzati R, Bassetti M, Luzzaro F, Principe L. 2021. Resistance to ceftazidime/avibactam in infections and colonisations by KPC-producing Enterobacterales: a systematic review of observational clinical studies. J Glob Antimicrob Resist 25:268–281.

38. Li J, Nation RL. 2006. Old polymyxins are back: is resistance close? Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am 43:663–664.

39. Li J, Nation RL, Turnidge JD, Milne RW, Coulthard K, Rayner CR, Paterson DL. 2006. Colistin: the re-emerging antibiotic for multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections. Lancet Infect Dis 6:589–601.

40. Lim LM, Ly N, Anderson D, Yang JC, Macander L, Jarkowski A, Forrest A, Bulitta JB, Tsuji BT. 2010. Resurgence of colistin: a review of resistance, toxicity, pharmacodynamics, and dosing. Pharmacotherapy 30:1279–1291.

41. Nation RL, Li J, Cars O, Couet W, Dudley MN, Kaye KS, Mouton JW, Paterson DL, Tam VH, Theuretzbacher U, Tsuji BT, Turnidge JD. 2015. Framework for optimisation of the clinical use of colistin and polymyxin B: the Prato polymyxin consensus. Lancet Infect Dis 15:225–234.

42. Grégoire N, Aranzana-Climent V, Magréault S, Marchand S, Couet W. 2017. Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Colistin. Clin Pharmacokinet 56:1441–1460.

43. PubChem. Colistin. https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5311054. Retrieved 2 January 2023.

44. Andrade FF, Silva D, Rodrigues A, Pina-Vaz C. 2020. Colistin Update on Its Mechanism of Action and Resistance, Present and Future Challenges. Microorganisms 8:1716.

45. Sabnis A, Hagart KL, Klöckner A, Becce M, Evans LE, Furniss RCD, Mavridou DA, Murphy R, Stevens MM, Davies JC, Larrouy-Maumus GJ, Clarke TB, Edwards AM. 2021. Colistin kills bacteria by targeting lipopolysaccharide in the cytoplasmic membrane. eLife 10:e65836.

46. Falagas ME, Kasiakou SK. 2005. Colistin: the revival of polymyxins for the management of multidrug-resistant gram-negative bacterial infections. Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am 40:1333–1341.

47. Biswas S, Brunel J-M, Dubus J-C, Reynaud-Gaubert M, Rolain J-M. 2012. Colistin: an update on the antibiotic of the 21st century. Expert Rev Anti Infect Ther 10:917–934.

48. Moellering RC. 1983. Rationale for use of antimicrobial combinations. Am J Med 75:4–8.

49. Rao GG, Li J, Garonzik SM, Nation RL, Forrest A. 2018. Assessment and modelling of antibacterial combination regimens. Clin Microbiol Infect 24:689–696.

50. Coates ARM, Hu Y, Holt J, Yeh P. 2020. Antibiotic combination therapy against resistant bacterial infections: synergy, rejuvenation and resistance reduction. Expert Rev Anti Infect Ther 18:5–15.

51. Tamma PD, Cosgrove SE, Maragakis LL. 2012. Combination Therapy for Treatment of Infections with Gram-Negative Bacteria. Clin Microbiol Rev 25:450–470.

52. Derendorf H, Meibohm B. 1999. Modeling of pharmacokinetic/pharmacodynamic (PK/PD) relationships: concepts and perspectives. Pharm Res 16:176–185.

53. Onufrak NJ, Forrest A, Gonzalez D. 2016. Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Principles of Anti-infective Dosing. Clin Ther 38:1930–1947.

54. Nielsen EI, Friberg LE. 2013. Pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling of antibacterial drugs. Pharmacol Rev 65:1053–1090.

55. Campion JJ, Chung P, McNamara PJ, Titlow WB, Evans ME. 2005. Pharmacodynamic modeling of the evolution of levofloxacin resistance in Staphylococcus aureus. Antimicrob Agents Chemother 49:2189–2199.

56. Mouton JW, Vinks AA, Punt NC. 1997. Pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling of activity of ceftazidime during continuous and intermittent infusion. Antimicrob Agents Chemother 41:733–738.

57. Mohamed AF, Nielsen EI, Cars O, Friberg LE. 2012. Pharmacokinetic-pharmacodynamic model for gentamicin and its adaptive resistance with predictions of dosing schedules in newborn infants. Antimicrob Agents Chemother 56:179–188.

58. Brook I. 1989. Inoculum effect. Rev Infect Dis 11:361–368.

59. Thomson KS, Moland ES. 2001. Cefepime, piperacillin-tazobactam, and the inoculum effect in tests with extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae. Antimicrob Agents Chemother 45:3548–3554.

60. López-Cerero L, Picón E, Morillo C, Hernández JR, Docobo F, Pachón J, Rodríguez-Baño J, Pascual A. 2010. Comparative assessment of inoculum effects on the antimicrobial activity of amoxycillin-clavulanate and piperacillin-tazobactam with extended-spectrum beta-lactamase-producing and extended-spectrum beta-lactamase-non-producing Escherichia coli isolates. Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis 16:132–136.

61. Adler A, Ben-Dalak M, Chmelnitsky I, Carmeli Y. 2015. Effect of Resistance Mechanisms on the Inoculum Effect of Carbapenem in Klebsiella pneumoniae Isolates with Borderline Carbapenem Resistance. Antimicrob Agents Chemother 59:5014–5017.

62. Bhagunde P, Chang K-T, Singh R, Singh V, Garey KW, Nikolaou M, Tam VH. 2010. Mathematical Modeling To Characterize the Inoculum Effect. Antimicrob Agents Chemother 54:4739–4743.

63. Akrong G, Chauzy A, Aranzana-Climent V, Lacroix M, Deroche L, Prouvensier L, Buyck JM, Couet W, Marchand S. 2022. A New Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Model To Characterize the Inoculum Effect of Acinetobacter baumannii on Polymyxin B In Vitro. Antimicrob Agents Chemother 66:e0178921.

64. Bulitta JB, Ly NS, Yang JC, Forrest A, Jusko WJ, Tsuji BT. 2009. Development and qualification of a pharmacodynamic model for the pronounced inoculum effect of ceftazidime against Pseudomonas aeruginosa. Antimicrob Agents Chemother 53:46–56.

65. Bulitta JB, Yang JC, Yohonn L, Ly NS, Brown SV, D'Hondt RE, Jusko WJ, Forrest A, Tsuji BT. 2010. Attenuation of Colistin Bactericidal Activity by High Inoculum of Pseudomonas aeruginosa Characterized by a New Mechanism-Based Population Pharmacodynamic Model. Antimicrob Agents Chemother 54:2051–2062.

66. Nielsen EI, Khan DD, Cao S, Lustig U, Hughes D, Andersson DI, Friberg LE. 2017. Can a pharmacokinetic/pharmacodynamic (PKPD) model be predictive across bacterial densities and strains? External evaluation of a PKPD model describing longitudinal in vitro data. J Antimicrob Chemother 72:3108–3116.

67. Bliss CI. 1939. The Toxicity of Poisons Applied Jointly. Ann Appl Biol 26:585–615.

68. Loewe S. 1928. Die quantitativen Probleme der Pharmakologie. Ergeb Physiol 27:47–187.

69. Demidenko E, Miller T. 2019. Statistical determination of synergy based on Bliss definition of drugs independence. PLOS ONE 14:e0224137.

70. Tallarida RJ. 2011. Quantitative Methods for Assessing Drug Synergism. Genes Cancer 2:1003–1008.

71. Lederer S, Dijkstra TMH, Heskes T. 2018. Additive Dose Response Models: Explicit Formulation and the Loewe Additivity Consistency Condition. Front Pharmacol 9.

72. Wicha SG, Chen C, Clewe O, Simonsson USH. 2017. A general pharmacodynamic interaction model identifies perpetrators and victims in drug interactions. Nat Commun 8.

73. 2016. Synergism Testing: Broth Microdilution Checkerboard and Broth Macrodilution Methods, p. 5.16.1-5.16.23. *In* Clinical Microbiology Procedures Handbook. John Wiley & Sons, Ltd.

74. Hsieh MH, Yu CM, Yu VL, Chow JW. 1993. Synergy assessed by checkerboard. A critical analysis. Diagn Microbiol Infect Dis 16:343–349.

75. Odds FC. 2003. Synergy, antagonism, and what the chequerboard puts between them. J Antimicrob Chemother 52:1.

76. Couet W. 2018. Pharmacokinetics/pharmacodynamics characterization of combined antimicrobial agents: a real challenge and an urgent need. Clin Microbiol Infect 24:687–688.

77. Rand KH, Houck HJ, Brown P, Bennett D. 1993. Reproducibility of the microdilution checkerboard method for antibiotic synergy. Antimicrob Agents Chemother 37:613–615.

78. Drugeon HB, Caillon J, Juvin ME, Pirault JL. 1987. Dynamics of ceftazidime-pefloxacin interaction shown by a new killing curve-chequerboard method. J Antimicrob Chemother 19:197–203.

79. Jacqueline C, Caillon J, Grossi O, Le Mabecque V, Miegeville A-F, Bugnon D, Batard E, Potel G. 2006. In vitro and in vivo assessment of linezolid combined with ertapenem: a highly synergistic combination against methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Antimicrob Agents Chemother 50:2547–2549.

80. Wicha SG, Kees MG, Kuss J, Kloft C. 2015. Pharmacodynamic and response surface analysis of linezolid or vancomycin combined with meropenem against Staphylococcus aureus. Pharm Res 32:2410–2418.

81. M26-A: Methods for Determining Bactericidal Activity of Antimicrobial Agents; Approved Guideline 14.

82. R Core Team. 2019. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. https://www.r-project.org/. Retrieved 26 October 2022.

83. Chen C, Wicha SG, Nordgren R, Simonsson USH. 2018. Comparisons of Analysis Methods for Assessment of Pharmacodynamic Interactions Including Design Recommendations. AAPS J 20:77.

84. Tallarida RJ. 2000. Drug Synergism and Dose-Effect Data Analysis. CRC Press.

85. Straetemans R, O'Brien T, Wouters L, Van Dun J, Janicot M, Bijnens L, Burzykowski T, Aerts M. 2005. Design and analysis of drug combination experiments. Biom J Biom Z 47:299–308.

86. Tallarida RJ, Raffa RB. 1996. Testing for synergism over a range of fixed ratio drug combinations: replacing the isobologram. Life Sci 58:PL 23-28.

87. de Aguiar PF, Bourguignon B, Khots MS, Massart DL, Phan-Than-Luu R. 1995. D-optimal designs. Chemom Intell Lab Syst 30:199–210.

88. Box JF. 1980. R.A. Fisher and the Design of Experiments, 1922–1926. Am Stat 34:1–7.

89. The Design of Experiments. R.A.Fisher. 1935. http://tankona.free.fr/fisher1935.pdf.

90. Nyberg J, Ueckert S, Strömberg EA, Hennig S, Karlsson MO, Hooker AC. 2012. PopED: an extended, parallelized, nonlinear mixed effects models optimal design tool. Comput Methods Programs Biomed 108:789–805.

91. Rady EH, Abd El-Monsef MME, Seyam M. 2022. Relationships among Several Optimality Criteria.

92. Atkinson AC, Donev AN. 1992. Optimum Experimental Designs. Clarendon Press.

93. Cramér H. 1999. Mathematical Methods of Statistics. Princeton University Press.

94. Rao CR. 1992. Information and the Accuracy Attainable in the Estimation of Statistical Parameters, p. 235–247. *In* Kotz, S, Johnson, NL (eds.), Breakthroughs in Statistics: Foundations and Basic Theory. Springer, New York, NY.

95. Retout S, Mentré F. 2003. Further developments of the Fisher information matrix in nonlinear mixed effects models with evaluation in population pharmacokinetics. J Biopharm Stat 13:209–227.

96. Simon N. Analyse pharmacocinétique et pharmacodynamique par approche de population. Estimation, évaluation, simulation. https://www.decitre.fr/livres/analyse-pharmacocinetique-et-pharmacodynamique-par-approche-de-population-9782353270972.html. Retrieved 3 March 2023.

97. Bazzoli C, Retout S, Mentré F. 2009. Fisher information matrix for nonlinear mixed effects multiple response models: evaluation of the appropriateness of the first order linearization using a pharmacokinetic/pharmacodynamic model. Stat Med 28:1940–1956.

98. Kiefer J, Wolfowitz J. 1959. Optimum Designs in Regression Problems. Ann Math Stat 30:271–294.

99. Casey M, Gennings C, Carter Jr. WH, Moser VC, Simmons JE. 2005. Ds-optimal designs for studying combinations of chemicals using multiple fixed-ratio ray experiments. Environmetrics 16:129–147.

100. Kristoffersson A. 2015. Study Design and Dose Regimen Evaluation of Antibiotics based on Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Modelling.

101. Vanlier J, Tiemann CA, Hilbers PAJ, van Riel NAW. 2013. Parameter uncertainty in biochemical models described by ordinary differential equations. Math Biosci 246:305–314.

102. 2022. Feature of the week #145: Estimating the Standard errors using Stochastic Approximation.

103. Broeker A, Wicha SG. 2020. Assessing parameter uncertainty in small-n pharmacometric analyses: value of the log-likelihood profiling-based sampling importance resampling (LLP-SIR) technique. J Pharmacokinet Pharmacodyn 47:219–228.

104. Aoki Y, Nordgren R, Hooker AC. 2016. Preconditioning of Nonlinear Mixed Effects Models for Stabilisation of Variance-Covariance Matrix Computations. AAPS J 18:505–518.

105. Dosne A-G, Niebecker R, Karlsson MO. 2016. dOFV distributions: a new diagnostic for the adequacy of parameter uncertainty in nonlinear mixed-effects models applied to the bootstrap. J Pharmacokinet Pharmacodyn 43:597–608.

106. Dartois C, Lemenuel-Diot A, Laveille C, Tranchand B, Tod M, Girard P. 2007. Evaluation of uncertainty parameters estimated by different population PK software and methods. J Pharmacokinet Pharmacodyn 34:289–311.

107. Thai H-T, Mentré F, Holford NHG, Veyrat-Follet C, Comets E. 2013. A comparison of bootstrap approaches for estimating uncertainty of parameters in linear mixed-effects models. Pharm Stat 12:129–140.

108. Wehrens R, Putter H, Buydens LMC. 2000. The bootstrap: a tutorial. Chemom Intell Lab Syst 54:35–52.

109. Bonate PL. 2011. Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Modeling and Simulation. Springer Science & Business Media.

110. Kümmel A, Bonate PL, Dingemanse J, Krause A. 2018. Confidence and Prediction Intervals for Pharmacometric Models. CPT Pharmacomet Syst Pharmacol 7:360–373.

111. Efron B. 2011. The bootstrap and Markov-chain Monte Carlo. J Biopharm Stat 21:1052–1062.

112. Dosne A-G, Bergstrand M, Harling K, Karlsson MO. 2016. Improving the estimation of parameter uncertainty distributions in nonlinear mixed effects models using sampling importance resampling. J Pharmacokinet Pharmacodyn 43:583–596.

113. Wilks SS. 1938. The Large-Sample Distribution of the Likelihood Ratio for Testing Composite Hypotheses. Ann Math Stat 9:60–62.

114. SIR user guide. PsN 5.3.0. Revised 2019-05-08. https://uupharmacometrics.github.io/PsN/docs.html.

115. Dosne A-G, Bergstrand M, Karlsson MO. 2017. An automated sampling importance resampling procedure for estimating parameter uncertainty. J Pharmacokinet Pharmacodyn 44:509–520.

116. Robert C, Casella G. 2005. Monte Carlo Statistical Methods2nd ed. 2004. Corr. 2nd printing 2005 édition. Springer-Verlag New York Inc., New York.

117. Gilks WR, Richardson S, Spiegelhalter D. 1995. Markov Chain Monte Carlo in Practice. CRC Press.

118. van Ravenzwaaij D, Cassey P, Brown SD. 2018. A simple introduction to Markov Chain Monte–Carlo sampling. Psychon Bull Rev 25:143–154.

119. Spade DA. 2020. Chapter 1 - Markov chain Monte Carlo methods: Theory and practice, p. 1–66. *In* Srinivasa Rao, ASR, Rao, CR (eds.), Handbook of Statistics. Elsevier.

120. Metropolis N, Rosenbluth AW, Rosenbluth MN, Teller AH, Teller E. 1953. Equation of State Calculations by Fast Computing Machines. J Chem Phys 21:1087–1092.

121. Colin P, Eleveld DJ, Jonckheere S, Van Bocxlaer J, De Waele J, Vermeulen A. 2016. What about confidence intervals? A word of caution when interpreting PTA simulations. J Antimicrob Chemother 71:2502–2508.

122. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters, version 12.0, 2022. https://www.eucast.org/clinical_breakpoints/. Retrieved 13 July 2022.

123. Sy SKB, Zhuang L, Derendorf H. 2016. Pharmacokinetics and pharmacodynamics in antibiotic dose optimization. Expert Opin Drug Metab Toxicol 12:93–114.

124. Cadwell J. 2018. The hollow fiber infection model: Principles and practice. Clin Microbiol Open Access 07.

125. Sadiq MW, Nielsen EI, Khachman D, Conil J-M, Georges B, Houin G, Laffont CM, Karlsson MO, Friberg LE. 2017. A whole-body physiologically based pharmacokinetic (WB-PBPK) model of ciprofloxacin: a step towards predicting bacterial killing at sites of infection. J Pharmacokinet Pharmacodyn 44:69–79.

126. Ekblom R, Wolf JBW. 2014. A field guide to whole-genome sequencing, assembly and annotation. Evol Appl 7:1026–1042.

127. Abdul Rahim N, Zhu Y, Cheah S-E, Johnson MD, Yu HH, Sidjabat HE, Butler MS, Cooper MA, Fu J, Paterson DL, Nation RL, Boyce JD, Creek DJ, Bergen PJ, Velkov T, Li J. 2021. Synergy of the Polymyxin-Chloramphenicol Combination against New Delhi Metallo-β-Lactamase-Producing Klebsiella pneumoniae Is Predominately Driven by Chloramphenicol. ACS Infect Dis 7:1584–1595.

128. Maifiah MHM, Creek DJ, Nation RL, Forrest A, Tsuji BT, Velkov T, Li J. 2017. Untargeted metabolomics analysis reveals key pathways responsible for the synergistic killing of colistin and doripenem combination against Acinetobacter baumannii. Sci Rep 7:45527.

129. Mohiuddin SG, Kavousi P, Orman MA. 2020. Flow-cytometry analysis reveals persister resuscitation characteristics. BMC Microbiol 20:202.

130. Grandy S, Raudonis R, Cheng Z. 2022. The identification of Pseudomonas aeruginosa persisters using flow cytometry. Microbiol Read Engl 168.

131. Khan DD, Lagerbäck P, Malmberg C, Kristoffersson AN, Wistrand-Yuen E, Sha C, Cars O, Andersson DI, Hughes D, Nielsen EI, Friberg LE. 2018. Predicting mutant selection in competition experiments with ciprofloxacin-exposed Escherichia coli. Int J Antimicrob Agents 51:399–406.

132. Soriano F, Ponte C. 1990. Implications of the inoculum effect. Rev Infect Dis 12:369.

Apport de la modélisation pharmacocinétique/pharmacodynamique pour l'étude des combinaisons d'antibiotiques afin de lutter contre l'antibiorésistance

Résumé

L'antibiorésistance, phénomène qui caractérise la capacité des bactéries à résister aux antibiotiques, constitue l'une des plus graves menaces de santé publique selon l'Organisation Mondiale de la Santé. En effet, les infections dues aux bactéries multi-résistantes pourrait devenir la principale cause de mortalité à l'horizon 2050. Afin de maintenir l'efficacité des traitements actuels et pour lutter contre l'émergence de nouvelles résistances, les antibiotiques sont de plus en plus utilisés en combinaison. Dans ce contexte, la modélisation pharmacocinétique/pharmacodynamique permet d'étudier, de développer et d'optimiser les traitements antibiotiques. Ce travail de thèse vise à démontrer l'intérêt de cet outil dans l'étude des combinaisons d'antibiotiques, au travers de deux études :

1. Une étude de développement d'un design optimisé de checkerboard, permettant de caractériser les combinaisons d'antibiotiques. Dans cette étude, il a été montré que le design rhombique permettait caractériser efficacement les interactions pharmacodynamiques entre antibiotiques utilisés en combinaison, tout en réduisant considérablement la charge de travail expérimental. Le design proposé était particulièrement adapté aux études de screening des combinaisons d'antibiotiques.

2. Une étude de l'interaction pharmacodynamique entre la ceftazidime/avibactam et la colistine contre quatre souches cliniques de *Klebsiella pneumoniae* multi-résistantes. Dans cette étude, des expériences de time-kill *in vitro* ont été réalisées avec les antibiotiques utilisés seuls et en combinaison. L'interaction entre ces molécules a été caractérisée au cours du temps à l'aide d'une approche de modélisation PKPD.

Mot-clés

Antibiorésistance, *Klebsiella pneumoniae*, ceftazidime/avibactam, colistine, combinaison d'antibiotique, modélisation PKPD

Contribution of pharmacokinetic/pharmacodynamic modelling for studying antibiotic combinations and fight against resistance emergence

Abstract

Antimicrobial resistance, the phenomenon characterizing the ability of the bacteria to resist antibiotics, is one of the most serious threats to public health according to the World Health Organization. Indeed, infections due to multi-resistant bacteria could become the main cause of death by 2050. In order to maintain the effectiveness of current treatments and to fight against the emergence of new resistances, antibiotics are increasingly used in combination. In this context, pharmacokinetic/pharmacodynamic modelling allows to study, develop and optimize antibiotic treatments. This thesis aims to demonstrate the interest of this tool for studying antibiotic combinations, through two studies:

1. An optimal design study to develop an optimized checkerboard design, allowing the characterization of antibiotic combinations. In this study, it was shown that the rhombic design efficiently characterized the pharmacodynamic interactions between antibiotics used in combination, while significantly reducing the experimental workload. The proposed design was particularly suitable for antibiotic combination screening.

2. A study of the pharmacodynamic interaction between ceftazidime/avibactam and colistin against four multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates. In this study, *in vitro* time-kill experiments were performed with drugs alone and in combination. The interaction between both drugs was characterized over time using a PKPD modelling approach.

Keywords

Antimicrobial resistance, *Klebsiella pneumoniae*, ceftazidime/avibactam, colistine, antibiotic combination, PKPD modelling