



HAL
open science

Rôle de *whiB6* et *kdpDE* dans le clone MDR hypertransmissible B0/W148 de *Mycobacterium tuberculosis*

Isabelle Bonnet

► **To cite this version:**

Isabelle Bonnet. Rôle de *whiB6* et *kdpDE* dans le clone MDR hypertransmissible B0/W148 de *Mycobacterium tuberculosis*. Médecine humaine et pathologie. Sorbonne Université, 2023. Français. NNT : 2023SORUS478 . tel-04621631

HAL Id: tel-04621631

<https://theses.hal.science/tel-04621631>

Submitted on 24 Jun 2024

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

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



SORBONNE UNIVERSITE

ECOLE DOCTORALE COMPLEXITE DU VIVANT – ED 515

Centre d'Immunologie et des Maladies Infectieuses

Equipe : Emergence et propagation des multi-résistances aux antibiotiques

Rôle de *whiB6* et *kdpDE* dans le clone MDR hypertransmissible
B0/W148 de *Mycobacterium tuberculosis*

Par Isabelle Bonnet

Thèse de doctorat de Microbiologie

Soutenue le vendredi 22 décembre 2023

Devant un jury composé de :

Mr le Pr Jean-Emmanuel HUGONNET	Président du jury
Mme le Dr Priscille BRODIN	Rapportrice
Mme le Pr Nadine LEMAITRE	Rapportrice
Mr le Pr Roland BROSCH	Examineur
Mme le Dr Nathalie DE CASTRO	Examinatrice
Mr le Dr Régis TOURNEBIZE	Directeur de thèse

Remerciements

Je remercie le Professeur Jean-Emmanuel Hugonnet pour être le président du jury de cette thèse.

Je remercie le Docteur Priscille Brodin et le Professeur Nadine Lemaitre pour avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse.

Je remercie le Professeur Roland Brosch et le Docteur Nathalie De Castro d'avoir accepté d'être examinateurs de cette thèse. En particulier, je remercie le Professeur Roland Brosch pour ses encouragements et les conseils techniques apportés par lui et ses collaborateurs.

Je remercie les Professeurs Alexandra Aubry, Jérôme Robert et Nicolas Veziris pour m'avoir accueillie dans leur laboratoire et m'avoir permis de faire ce travail.

Je remercie Wladimir Sougakoff pour sa confiance et le travail passionnant qu'il m'a confié. J'aurais tellement aimé qu'il soit là.

J'ai une pensée pour Florence Brossier qui aurait dû encadrer ce travail au départ. J'ai eu en tête depuis son décès et tout au long de cette thèse l'objectif d'aller au bout pour que ses travaux puissent être publiés.

Je remercie Régis Tournebize pour m'avoir permis de mener à terme cette thèse malgré les difficultés et pour tout ce qu'il m'a appris.

Je remercie les collègues, ingénieurs et techniciens de l'hôpital et de la faculté, merci à Aurélie et Estelle. En particulier, je remercie infiniment l'équipe technique des secteurs BK et BM à l'hôpital pour leur soutien, leur bonne humeur et leur enthousiasme quotidien. Je n'aurais pas réussi sans vous.

Je remercie mes amis, ma famille, en particulier la famille Mazurel. Emilie, merci.

A ma petite maman chérie, tu aurais été si fière.

Table des matières

Liste des figures.....	3
Liste des tableaux	6
Liste des abréviations	7
INTRODUCTION	9
1. Généralités	10
1.1. Histoire de la tuberculose	10
1.2. Epidémiologie	12
1.3. Manifestations cliniques.....	16
1.3.1. Tuberculose pulmonaire	16
1.3.2. Tuberculose extra-pulmonaire.....	17
1.4. Tuberculose maladie et infection tuberculeuse latente.....	19
1.5. Diagnostic de l'infection tuberculeuse latente et de la tuberculose maladie	21
1.5.1. Diagnostic de l'infection tuberculeuse latente (ITL).....	22
1.5.2. Diagnostic de la tuberculose maladie	23
1.6. Traitement prophylactique et curatif	26
1.6.1. Traitement de l'infection tuberculeuse latente	26
1.6.2. Traitement curatif	27
1.7. Résistance aux antituberculeux	28
1.8. Caractéristiques microbiologiques de <i>M. tuberculosis</i>	30
1.8.1. Taxonomie.....	30
1.8.2. Génome	30
1.8.3. Enveloppe cellulaire	31
1.9. Virulence	34
1.9.1. Les systèmes de sécrétion de type VII et autres protéines de la paroi cellulaire	35
1.9.2. Les lipides de surface	40
1.9.3. Les protéines impliquées dans la réponse au stress nitro-oxydatif, l'arrêt de la maturation du phagosome et la résistance au pH acide	42
1.9.4. Les régulateurs d'expression génique, incluant les systèmes à deux composants et les facteurs sigma	46
1.9.5. Les protéines PE/PPE.....	51
2. Le complexe clonal 100-32	55
2.1. Méthodes de génotypage chez <i>M. tuberculosis</i> et évolution de la bactérie.....	55
2.2. Evolution du complexe <i>M. tuberculosis</i>	58

2.3. La diffusion du complexe clonal 100-32.....	62
3. KdpDE.....	68
3.1. Importance du potassium chez les bactéries et son transport	68
3.2. Le système Kdp chez les bactéries en général.....	70
3.3. Le système Kdp chez <i>M. tuberculosis</i>	76
3.3.1. Organisation des deux opérons <i>kdpDE</i> et <i>kdpFABC</i>	76
3.3.2. Régulation transcriptionnelle de KdpFABC.....	77
3.3.3. Fonctions du système Kdp.....	80
4. WhiB6.....	81
4.1. Les protéines contenant un cluster Fe-S.....	81
4.2. Les protéines WhiB-like.....	83
4.3. WhiB6 au sein du système de sécrétion de type VII ESX-1 chez <i>M. tuberculosis</i>	86
CONTEXTE ET OBJECTIFS	91
RESULTATS	95
Publication n°1.....	96
Publication n°2.....	111
DISCUSSION.....	133
PERSPECTIVES.....	142
AUTRES PUBLICATIONS	146
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	188

Liste des figures

Figure 1. Incidence estimée de la TB en 2021, pour les pays avec au moins 100 000 cas.....	13
Figure 2. Lien entre le revenu moyen, la sous-alimentation et l'incidence de la TB pour 100 000 habitants en 2021.....	14
Figure 3. Incidence estimée de la TB résistante à la rifampicine ou multirésistante en 2021, pour les pays avec au moins 1000 nouveaux cas.....	15
Figure 4. Pourcentage de cas résistants à la rifampicine ou multirésistants parmi les nouveaux cas notifiés en 2021.....	16
Figure 5. Tuberculose maladie et infection tuberculeuse latente	20
Figure 6. Evolution entre les formes primo-infection, infection tuberculeuse latente et tuberculose maladie	20
Figure 7. Date de début d'utilisation en clinique des antituberculeux et estimation de la date d'émergence de la résistance	30
Figure 8. Schéma de l'enveloppe cellulaire chez <i>M. tuberculosis</i>	32
Figure 9. Synthèse des acides mycoliques	34
Figure 10. Les systèmes de sécrétion de type I à VI chez les bactéries à Gram négatif.....	35
Figure 11. Organisation génétique des 5 systèmes ESX chez <i>M. tuberculosis</i> H37Rv.....	36
Figure 12. Cryo-EM structure du système ESX-5 chez <i>M. tuberculosis</i>	37
Figure 13. Organisation des opérons <i>mce</i>	40
Figure 14. Lipides immunoréactifs de l'enveloppe cellulaire de <i>M. tuberculosis</i>	41
Figure 15. <i>M. tuberculosis</i> au sein du macrophage.....	44
Figure 16. Schéma d'un système à deux composants.....	47
Figure 17. Réseau d'interactions des facteurs σ chez <i>M. tuberculosis</i>	50
Figure 18. Structure du complexe EspG5-PPE41-PE25	52

Figure 19. Représentation schématique de la pathogénicité de <i>M. tuberculosis</i> au niveau cellulaire impliquant les protéines PE_PGRS.....	53
Figure 20. Code binaire et octal de la souche <i>M. tuberculosis</i> H37Rv	56
Figure 21. Schéma illustrant les deux méthodes de génotypage spoligotyping et MIRU-VNTR.....	57
Figure 22. Nombre de différences en comparaison par paires entre des souches de MTBC	58
Figure 23. Schéma de l'évolution supposée du bacille tuberculeux.	59
Figure 24. Phylogénie basée sur le génome de 261 souches appartenant au complexe <i>M. tuberculosis</i>	62
Figure 25. Distribution des souches de <i>M. tuberculosis</i> Beijing et Beijing B0/W148.....	65
Figure 26. Minimum spanning tree des souches Beijing B0/W148	66
Figure 27. Schémas des systèmes de transport du potassium chez les bactéries	70
Figure 28. Schéma du signal KdpD/KdpE.....	70
Figure 29. Schéma des deux mécanismes possibles proposés par <i>Pedersen et al.</i> pour le fonctionnement de KdpFABC	72
Figure 30. Schéma des effets de la régulation de KdpD/KdpE.....	75
Figure 31. Organisation au sein du génome des gènes <i>kdp</i> chez <i>M. tuberculosis</i> et les autres mycobactéries	77
Figure 32. Modélisation de la structure 3-D de KdpD et KdpE chez <i>M. tuberculosis</i>	77
Figure 33. Schéma de la transcription de l'opéron <i>kdpFABC</i> chez <i>M. smegmatis</i>	79
Figure 34. LprF et LprJ transmet le signal à la partie senseur N-terminal de KdpD, qui entraîne l'activité histidine kinase C-terminal, qui elle-même module l'expression de l'opéron <i>kdpFABC</i> via le régulateur KdpE.....	80
Figure 35. Schéma du mécanisme d'action de FNR et SoxR chez <i>E. coli</i> et WhiB3 chez <i>M. tuberculosis</i>	83

Figure 36. Alignement des séquences protéiques de protéines WhiB-like : <i>Streptomyces venezuelae</i> ATCC10712 (vnz), <i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2) (SCO), <i>M. tuberculosis</i> H37Rv (Mtb) et <i>Corynebacterium glutamicum</i> ATCC13032 (Cg)	84
Figure 37. Niveaux de transcription relatifs des gènes codant pour les protéines WhiB-like chez <i>M. tuberculosis</i>	85
Figure 38. Représentation schématique de ESX-1 chez <i>M. tuberculosis</i>	86
Figure 39. Séquence inversée probablement responsable de la formation d'une boucle gênant la fixation de PhoP	87
Figure 40. Modèle proposé par Sanchez <i>et al.</i> de la régulation de l'expression de <i>whiB6</i> par EspM ..	88
Figure 41. Schéma proposé de la régulation du système ESX-1 chez <i>M. marinum</i>	89
Figure 42. Schéma proposé par Chen <i>et al.</i> pour la régulation par WhiB6 de la dissémination du bacille et le maintien du granulome chez <i>M. marinum</i>	90
Figure 43. Gel coloré au bleu de Coomassie montrant la purification de WhiB6	141

Liste des tableaux

Tableau 1. Liste des principales cibles impliquées dans la résistance aux antituberculeux chez <i>M. tuberculosis</i>	29
Tableau 2. Systèmes à deux composants chez <i>M. tuberculosis</i> et autres espèces du genre <i>Mycobacterium</i>	48
Tableau 3. Principaux facteurs de virulence chez <i>M. tuberculosis</i>	54
Tableau 4. Correspondance des souches du complexe <i>M. tuberculosis</i> selon les différentes méthodes de génotypage.....	60
Tableau 5. Eléments en faveur du rôle de KdpD/KdpE dans la virulence et la survie dans des modèles <i>in vivo</i>	73
Tableau 6. Eléments en faveur du rôle de KdpD/KdpE dans la résistance aux stress.....	74

Liste des abréviations

AcPIM₁ : 1-phospho-2-mannose *myo*-inositol

ADN : acide désoxyribonucléique

AhpC : alkylhydroperoxide réductase sous-unité C

AhpD : thiorédoxine oxydoréductase

BAAR : bacilles acido-alcool-résistants

CC : complexe clonal

cGAS : cytosolic DNA sensor nucleotidyltransferase cyclic GMP-AMP synthase

CNR MyRMA : Centre National de Référence des Mycobactéries et de la Résistance des Mycobactéries aux Antituberculeux

DlaT : dihydrolipoamide acyltransférase

DNIC : DiNitrosyl-Iron dithiol Complex)

DR : direct repeat

Ecc : ESX-1 core component

ECF : extracellular function

FAS-I : fatty acid synthase I

GlcNAc : N-acetylglucosamine

IGRAs : interferon γ release assays

IFN : interferon

IL : interleukine

ITL : infection tuberculeuse latente

LAM : lipoarabinomannanes

LM : lipomannanes

LOS : lipooligosaccharides

Lpd : lipoamide déhydrogénase

ManLAM : lipoarabinomannanes encapsulés de mannose

MDR : multidrug resistant

MIRU-VNTR : Variable Number Tandem Repeats of genetic elements named Mycobacterial Interspersed Repetitive Units

MR : C-type lectins Mannose Receptor

MsrA : méthionine sulfoxide réductase

MTBC : complexe *M. tuberculosis*
iNOS : nitric oxyde synthase inductible
NOX2/gp91^{phox} : phagocyte oxydase
OMS: organisation mondiale de la santé
PBP : penicillin-binding protein
PCR : polymerase chain reaction
PDIM : phthiocerol dimycocerosate
PIM: phosphatidylinositol mannosides
PE : Pro-Glu
PPE : Pro-Pro-Glu
PPE-MPTR : major polymorphic tandem repeat
PPE-SVP : Ser-Val-Pro
RD : région de difference
RFLP : Restriction Fragment Length Polymorphism
RNI : dérivés réactifs de l'azote
ROI : dérivés réactifs de l'oxygène
RRDR : rifampicin resistance-determining region
SCID : severe combined immunodeficiency
SNP : single nucleotide polymorphism
TB : tuberculose
TDM : tréhaloses dimycolates
THP-1
TMM : tréhaloses monomycolate
TNF : tumour necrosis factor
XDR : extremely drug resistant
WGS : whole genome sequencing

INTRODUCTION

1. Généralités

1.1. Histoire de la tuberculose

En dehors de la forme pulmonaire classique, la tuberculose (TB) se manifeste par différentes atteintes, dont l'atteinte osseuse, appelée mal de Pott, qui entraîne des déformations. Les os, ayant la capacité d'être conservés pendant des milliers d'années, ont ainsi permis d'identifier des individus avec une probable tuberculose osseuse il y a plus de 4000 ans [1]. Des os déformés ont en effet été découverts à l'époque de l'Égypte ancienne mais aussi dans des sites de la période néolithique. Des analyses de biologie moléculaire, par exemple l'amplification de la séquence d'insertion IS6110 permettant la détection du complexe *Mycobacterium tuberculosis*, à partir de momies ont ensuite permis de valider l'hypothèse de la présence de TB à cette époque [2]. L'âge du plus récent ancêtre commun du complexe *M. tuberculosis* reste cependant débattu, certains pensent qu'il daterait des premières migrations de *Homo sapiens* hors d'Afrique, à savoir il y a 70 000 ans [3]. Au V^{ème} siècle avant J-C, Hippocrate décrivait des patients avec une altération de l'état général associée à des douleurs thoraciques et une toux fréquemment accompagnée de crachats hémoptoïques [1]. L'Europe a été l'épicentre de plusieurs épidémies de tuberculose au 16^{ème} et 17^{ème} siècle, puis la maladie a atteint un pic de fréquence dans la première moitié du 19^{ème} siècle. Dans la deuxième moitié du 19^{ème} siècle, la mortalité liée à la tuberculose baisse, en grande partie grâce aux progrès dans les domaines de l'hygiène et du logement, dont l'exemple le plus connu est le renouveau urbain de Paris dans les années 1850 par le baron Georges Haussmann. Les immigrants européens ont ensuite apporté la maladie en Amérique. Au cours du 20^{ème} siècle, l'incidence et la mortalité diminuent en lien avec les politiques de santé publique, l'utilisation généralisée du vaccin et le développement des antituberculeux à partir des années 1950. Une nouvelle augmentation du nombre de cas est cependant constatée dans le milieu des années 1980 en rapport avec la pauvreté croissante et la pandémie liée au VIH.

A travers les siècles, les médecins et scientifiques ont décrit la maladie et tenter de comprendre son origine. Hippocrate pensait que la maladie était héréditaire, tandis que Aristote émettait l'hypothèse d'une nature contagieuse (IV^{ème} siècle avant J-C). En 1865, Jean-Antoine Villemin, un médecin militaire français, rapporte qu'il a pu infecter des lapins de laboratoire en leur inoculant du tissu malade de cadavre. Le rapport a été très critiqué par le corps médical français, notamment Herman Pidoux, qui soutenait que le problème de la tuberculose pouvait être réglé par des solutions extérieures, comme la malnutrition, l'hygiène et les conditions de travail. La découverte du bacille *M. tuberculosis* par Robert Koch en 1882 discrédite les propos de Pidoux. Pourtant, les croyances dans le fait que des causes sociétales seraient en lien avec la maladie ont perduré dans la première moitié du 20^{ème} siècle avec le mouvement syndicaliste en France qui dénonçait les conditions de travail et la malnutrition comme responsables de la maladie dans le but d'obtenir une journée de travail de 8 heures. A la fin du 19^{ème} et au début du 20^{ème} siècle, le travail d'Edward Trudeau a permis de lier les deux étiologies. Il montre que des lapins infectés par une culture de *M. tuberculosis* sont malades mais que les conditions environnementales peuvent modifier l'évolution de la maladie. Quatre parmi 5 lapins gardés dans une petite cage avec peu de nourriture décèdent dans les 3 mois, le dernier est sévèrement malade. Parmi 5 autres infectés de la même manière mais qui étaient autorisés à sortir de la cage à l'extérieur et disposaient de beaucoup de nourriture, un seul décède et les 4 autres étaient toujours vivants à 6 mois sans symptôme. Cette expérience simple avec néanmoins des défauts sur le plan de la rigueur scientifique a permis de valider le traitement de la tuberculose à l'époque (air frais et nourriture abondante) et a été la base de la mise en place des sanatoriums en Europe à partir des années 1850, où des pneumothorax étaient également pratiqués dans le but de mettre le poumon au repos [4].

L'ère des antituberculeux a démarré en 1944 avec la découverte de la streptomycine par Schatz et Waksman, suivie par l'introduction de plusieurs antituberculeux dont l'isoniazide et le

pyrazinamide en 1952 et la rifampicine en 1957 qui n'ont malheureusement pas permis d'éradiquer la maladie, tout comme l'utilisation du vaccin BCG, une souche vaccinale atténuée, obtenue par Calmette et Guérin à Paris dans les années 1920 suite à des repiquages successifs de la souche virulente *M. bovis*.

1.2. Épidémiologie

La tuberculose est une maladie largement répandue dans le monde et une des causes majeures de décès [5]. Jusqu'à la pandémie COVID, elle était la première cause de décès lié à un agent infectieux. On estime qu'environ un quart de la population mondiale est infectée par *M. tuberculosis*, la plupart des personnes cependant ne développeront pas la maladie et certaines élimineront spontanément l'infection. Sans traitement, le taux de mortalité est élevé (environ 50%). Avec les traitements actuellement recommandés (4 à 6 mois de traitement antituberculeux), environ 85% des personnes atteintes de tuberculose multisensible peuvent être guéries. En raison de la pandémie COVID, les progrès faits avant 2019 ont ralenti et les objectifs fixés préalablement par l'OMS dans la lutte contre la tuberculose, comme la réduction de 35% du nombre de décès et de 20% de l'incidence de la tuberculose en 2020 par rapport à 2015, n'ont pas pu être atteints. Parmi les conséquences les plus évidentes, on note une diminution importante du nombre de personnes nouvellement atteintes de la tuberculose. L'incidence rapportée est passée de 7,1 millions en 2019 à 5,8 millions en 2020 (-18%), correspondant au chiffre de 2012. En 2021, on observe une récupération partielle avec 6,4 millions de personnes diagnostiquées de la tuberculose. Cette diminution de l'incidence suggère que le nombre de personnes non diagnostiquées et non traitées a augmenté, entraînant dans un premier temps une augmentation des décès liés à la maladie et de la transmission communautaire, puis dans un second temps, une augmentation des cas de tuberculose. Le nombre estimé de décès lié à la tuberculose a ainsi augmenté entre 2019 et 2021, inversant la tendance à la baisse depuis 2005.

En 2021, le nombre de décès est estimé à 1,6 million, en augmentation par rapport aux années précédentes (1,5 million en 2020 et 1,4 million en 2019) et au même niveau que 2017. L'incidence estimée de tuberculose était de 10,6 millions en 2021, soit une augmentation de 4,5% par rapport à 2020 (10,1 millions). La plupart des personnes qui développent la tuberculose se trouvent en Asie du Sud-Est (45%), en Afrique (23%) et dans la région Pacifique Ouest (18%) (Figure 1). Il existe un lien fort entre les taux d'incidence de la tuberculose et des indicateurs de développement comme le revenu moyen ou la sous-alimentation (Figure 2).

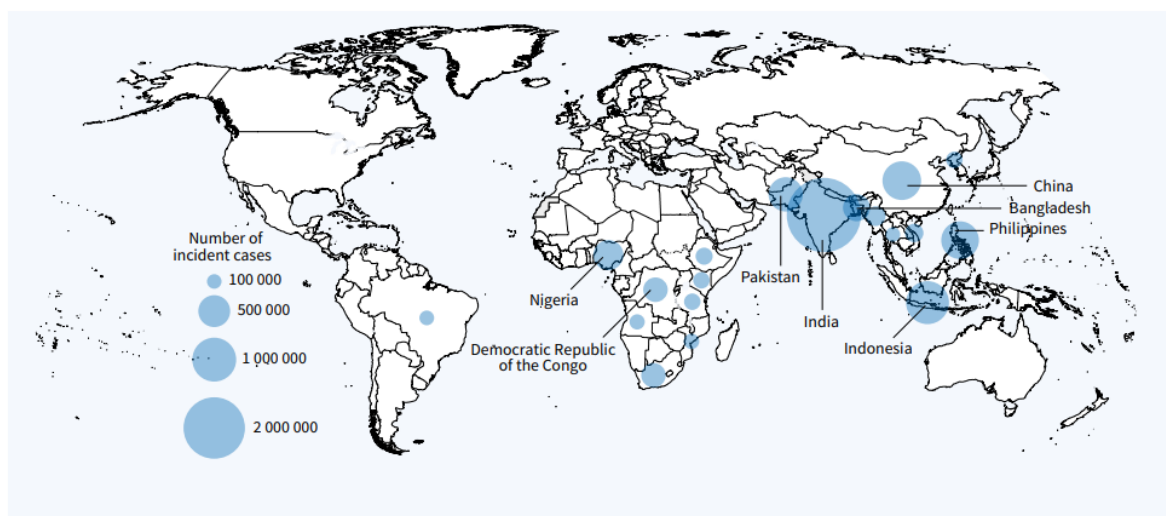


Figure 1. Incidence estimée de la TB en 2021, pour les pays avec au moins 100 000 cas [ref : 5]

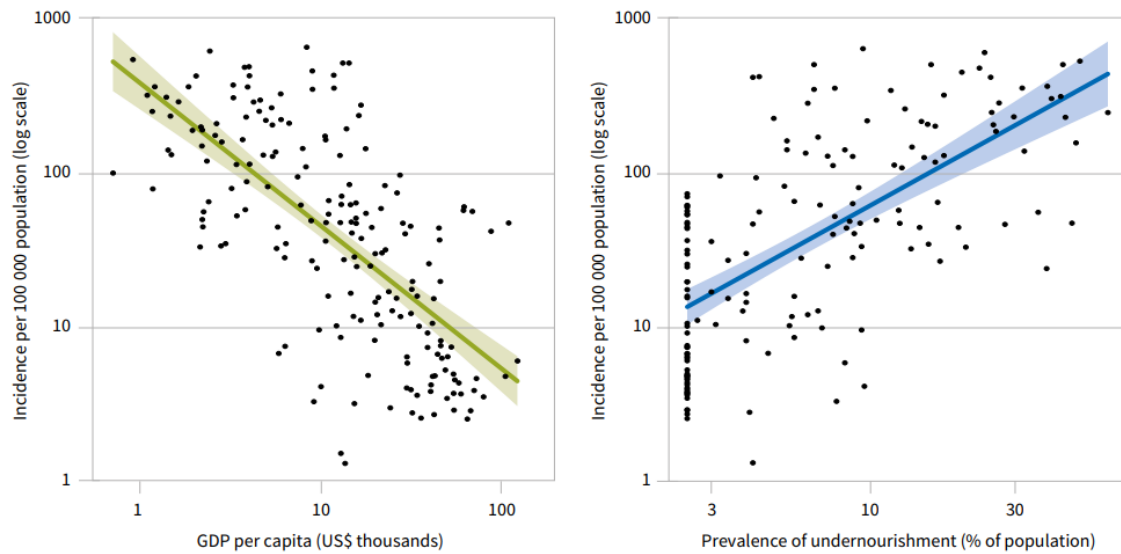


Figure 2. Lien entre le revenu moyen, la sous-alimentation et l'incidence de la TB pour 100 000 habitants en 2021 [ref : 5]

Le nombre de cas de tuberculose multirésistante (résistante aux deux principaux antituberculeux, à savoir la rifampicine et l'isoniazide) a lui aussi augmenté entre 2020 et 2021 avec 450 000 nouveaux cas estimés de tuberculose résistantes à la rifampicine ou multirésistantes en 2021 (437 000 cas en 2020), soit 3,6% parmi les nouveaux cas ou 18% parmi les cas avec un antécédent de traitement. Trois pays concentrent 42% de ces cas en 2021 : Inde (26%), Russie (8,5%) et Pakistan (7,9%) (Figure 3). De façon positive, le taux de succès thérapeutique pour la TB multirésistante s'améliore (60% en 2019 versus 50% en 2012).

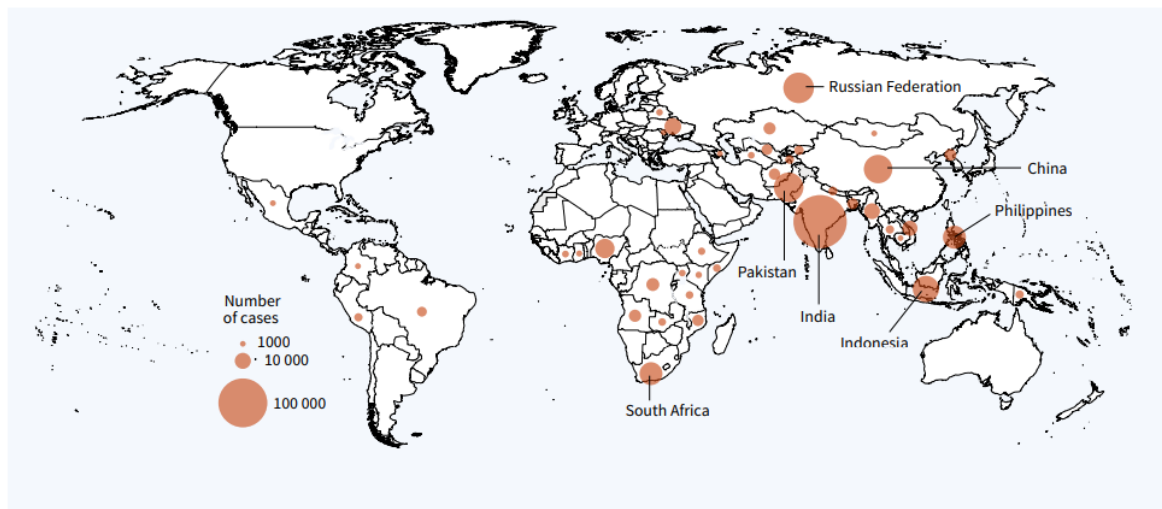


Figure 3. Incidence estimée de la TB résistante à la rifampicine ou multirésistante en 2021, pour les pays avec au moins 1000 nouveaux cas [ref : 5]

En Europe, bien que la région ne représente que 2,2% des nouveaux cas estimés (230 000) dans le monde en 2021, la tuberculose reste un problème de santé publique majeure [6]. La plupart des pays européens ont, cependant, une faible incidence de la tuberculose (taux de notification en dessous de 10 pour 100 000 habitants) avec une maladie qui touche principalement les migrants, les personnes incarcérées et celles coinfectedées par le VIH. Le COVID a aussi eu un impact négatif sur la TB avec une augmentation de 1,2% de l'incidence estimée en 2021 par rapport à l'année précédente. Les cinq pays correspondant aux chiffres absolus les plus élevés sont la Russie (69 000), l'Ukraine (31 000), l'Ouzbékistan (21 000), la Turquie (15 000) et le Kazakhstan (14 000). Le taux d'incidence le plus élevé est rapporté au Kirghizistan (130 pour 100 000 habitants), suivi par le Tadjikistan (88), la Moldavie (85), le Kazakhstan (73) et l'Ukraine (71). Le pourcentage de cas résistants à la rifampicine est de 22,6%, avec 11 pays présentant un chiffre au-delà de 20% (Figure 4).

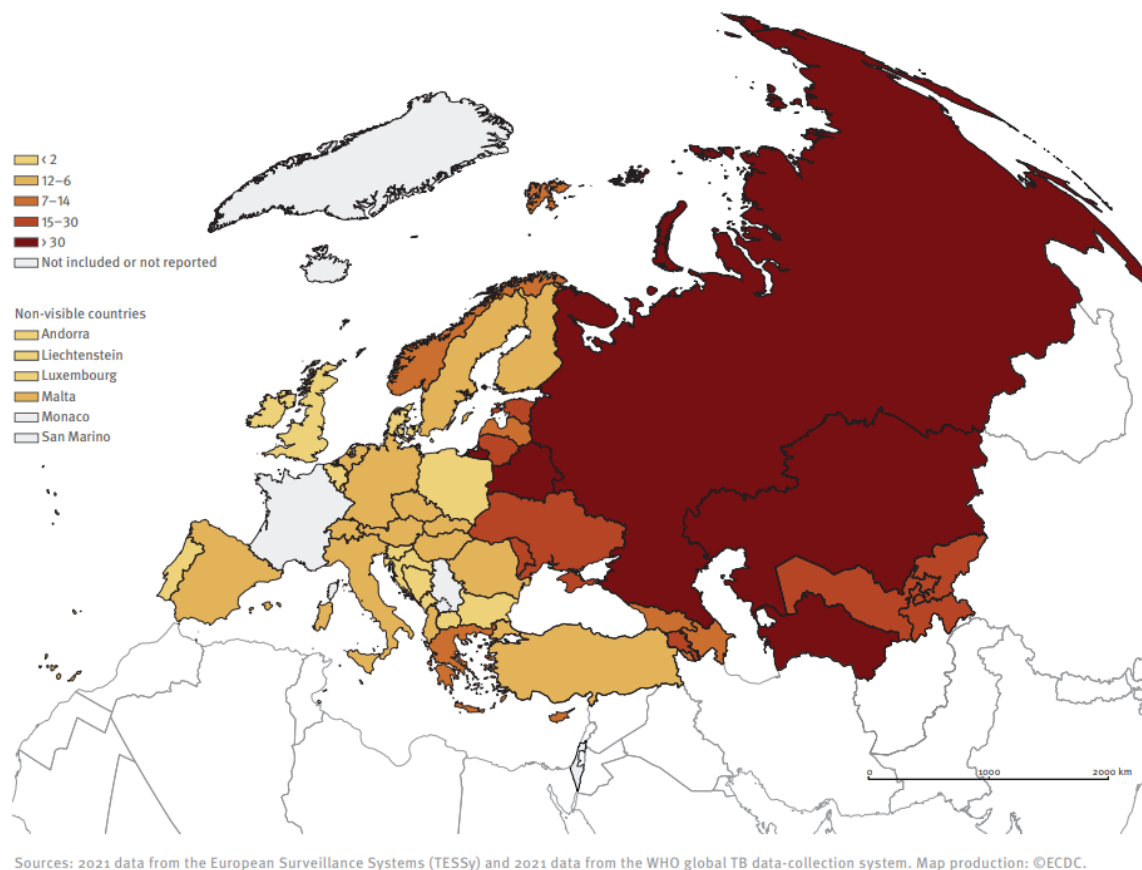


Figure 4. Pourcentage de cas résistants à la rifampicine ou multirésistants parmi les nouveaux cas notifiés en 2021 [ref : 6]

1.3. Manifestations cliniques

1.3.1. Tuberculose pulmonaire

Bien que la tuberculose puisse toucher n'importe quel organe, la forme pulmonaire prédomine puisque la tuberculose se transmet d'une personne à l'autre par gouttelettes [7]. La contagiosité d'un malade dépend de la présence d'une toux, de lésions cavitaires, d'une atteinte du larynx associée et des procédures générant des aérosols avec un traitement inadéquat. La tuberculose pulmonaire est définie par une infection active du parenchyme pulmonaire ; la tuberculose extra-pulmonaire correspond à l'atteinte de n'importe quel autre organe, notamment les méninges, le cerveau, la plèvre, le péricarde, les articulations, les os, les reins, le foie, le système digestif et la rate. Les facteurs de risque pour la tuberculose peuvent être classés en facteurs liés

à l'hôte et en facteurs environnementaux. Les facteurs liés à l'hôte prédisposant à la tuberculose sont ceux notamment qui réduisent l'immunité comme l'infection VIH, la malnutrition, la consommation excessive d'alcool, celle de drogues et l'exposition à la fumée de cigarette ou d'autres fumées. D'autres facteurs entraînent un risque de développer une tuberculose comme le cancer, l'insuffisance rénale terminale, un antécédent de bypass gastrique, une maladie cœliaque et un diabète [8]. Des facteurs génétiques peuvent prédisposer à une tuberculose, notamment certains polymorphismes situés dans les voies IL-12, IFN- γ et TNF qui sont impliqués dans la formation et la fonction du granulome, mais aussi des traitements immunomodulateurs comme les anti-TNF ou une corticothérapie [9].

La tuberculose maladie, définie par une multiplication incontrôlée du bacille, des lésions tissulaires et des symptômes, survient lorsque le système immunitaire n'est plus efficace. L'atteinte pulmonaire se manifeste par une toux qui peut être productive, de la fièvre avec des sueurs nocturnes, une hémoptysie et une altération de l'état général.

1.3.2. Tuberculose extra-pulmonaire

En Europe, la proportion de cas de tuberculose extra-pulmonaire varie selon les pays et peut aller jusqu'à 45% (Norvège) [6]. La tuberculose extra-pulmonaire peut concerner les séreuses [7]. Lorsque la plèvre est infectée, l'examen microscopique du liquide pleural est rarement positif mais la culture l'est dans 20% des cas ; les chances d'obtenir une documentation microbiologique sont plus grandes lorsqu'une biopsie pleurale est réalisée, d'autant plus si elle est dirigée. Plus rarement, l'atteinte péricardique peut également survenir par extension locale de la maladie pulmonaire.

La tuberculose ganglionnaire concerne classiquement la localisation cervicale avec une fistulisation à la peau fréquente. La tuberculose peut aussi être transmise par voie digestive, par

exemple après ingestion de lait non pasteurisé d'animaux infectés par *M. bovis* ; la présentation classique est la forme ganglionnaire.

La dissémination hémotogène du bacille peut entraîner diverses atteintes. Parmi elles, l'atteinte rachidienne ou mal de Pott est classique. La présentation clinique est une douleur rachidienne, associée ou non à des douleurs radiculaires. L'infection commence par une atteinte du corps vertébral puis une atteinte du disque intervertébral puis s'étend aux vertèbres adjacentes. L'atteinte rachidienne peut entraîner une déformation de la colonne vertébrale. Les sites thoraciques et lombaires sont le plus souvent impliqués et l'atteinte multi-étagée et la présence d'abcès paravertébraux, par exemple dans le psoas, sont classiques. Plus fréquente chez les patients immunodéprimés, l'atteinte du système nerveux central est rare (1% des cas de TB) mais particulièrement grave conduisant parfois au décès et correspond à une méningite et/ou des tuberculomes qui peuvent se situer n'importe où dans le système nerveux central. Les signes cliniques d'une méningite tuberculeuse rapportés dans ce cadre sont des signes généraux, à savoir une asthénie, une anorexie et des sueurs nocturnes, et des céphalées ; ces signes surviennent en général avant des signes plus spécifiques d'une atteinte méningée comme une raideur de nuque, une photophobie et des vomissements. En l'absence de traitement, le tableau clinique peut évoluer vers une confusion, un coma et des déficits neurologiques focaux. Les signes cliniques d'un tuberculome cérébral dépendent de sa localisation (signes neurologiques focaux et crises convulsives) avec des signes généraux associés ; les tuberculomes cérébraux peuvent également être asymptomatiques. D'autres atteintes sont décrites après dissémination hémotogène comme la tuberculose urogénitale ou la tuberculose digestive. Dans ce dernier cas, l'atteinte peut aussi être consécutive à une ingestion de bacilles (lait ou déglutition de crachats infectés).

1.4. Tuberculose maladie et infection tuberculeuse latente

Suite à la transmission à un nouvel hôte via des aérosols, *M. tuberculosis* est phagocyté par les macrophages alvéolaires et les cellules dendritiques dans le poumon (Figure 5) [10]. *M. tuberculosis* peut à ce stade être éliminé de l'organisme. Il existe ensuite une période de réplication intracellulaire durant laquelle les cellules infectées migrent jusqu'aux ganglions lymphatiques correspondant au territoire de drainage local. En rejoignant la circulation sanguine, *M. tuberculosis* infecte d'autres cellules hôtes et atteint d'autres régions pulmonaires. La réponse pro-inflammatoire locale entraîne le recrutement de nouveaux monocytes et de lymphocytes, qui vont entourer les macrophages infectés et permettre de contenir *M. tuberculosis* en formant une structure appelée granulome. *M. tuberculosis* est capable de persister de façon prolongée dans le granulome dans un état de réplication ralentie ou arrêtée (infection tuberculeuse latente). A l'intérieur des macrophages, *M. tuberculosis* réside initialement dans les phagosomes, où il va faire face à un certain nombre de défenses cellulaires et immunitaires, telles que l'acidification, le stress nitro-oxydatif et les peptides antimicrobiens. *M. tuberculosis* possède également la faculté de s'échapper du phagosome et de rejoindre le cytosol. *M. tuberculosis* peut persister dans le granulome pendant des périodes très prolongées jusqu'à plusieurs dizaines d'années. Parfois, l'infection tuberculeuse latente évolue vers la tuberculose maladie lorsque l'intégrité du granulome se rompt, soit dès l'infection dans 5% des cas, soit à distance après une période de latence dans 5% des cas également (Figure 6) ; celui-ci évolue vers une nécrose cellulaire centrale et la formation d'un caseum qui expose les bacilles à un environnement extracellulaire hypoxique et riche en lipides. Une conséquence supplémentaire de la perte de l'intégrité du granulome entraîne l'accès aux nutriments des vaisseaux et à de l'oxygène puis, éventuellement, à une communication du granulome avec les voies respiratoires, libérant alors des milliers de bacilles viables. Enfin, la toux déclenchée par

l'inflammation pulmonaire entraîne l'aérosolisation des expectorations contenant des bacilles et permet la transmission par gouttelettes à un nouvel hôte.

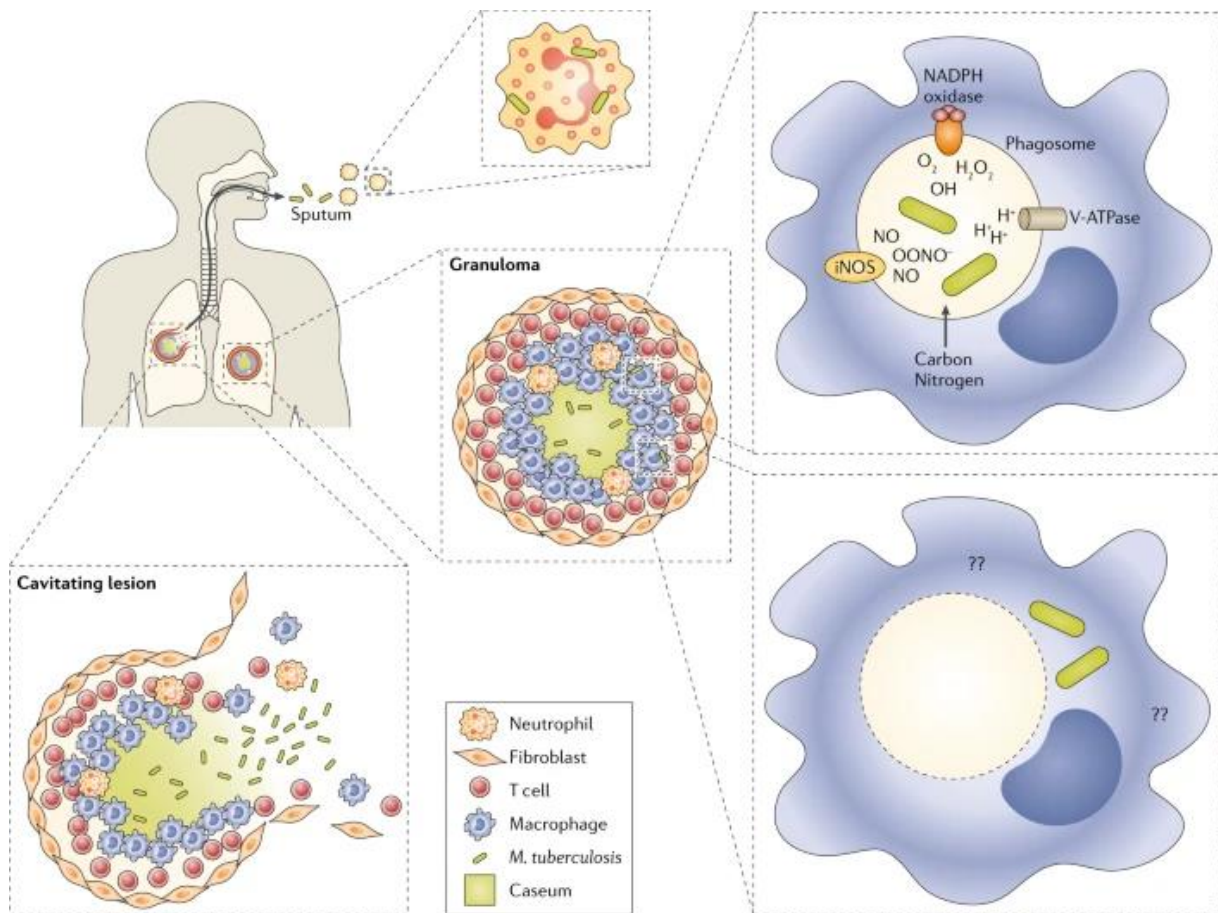


Figure 5. Tuberculose maladie et infection tuberculeuse latente [ref : 10]

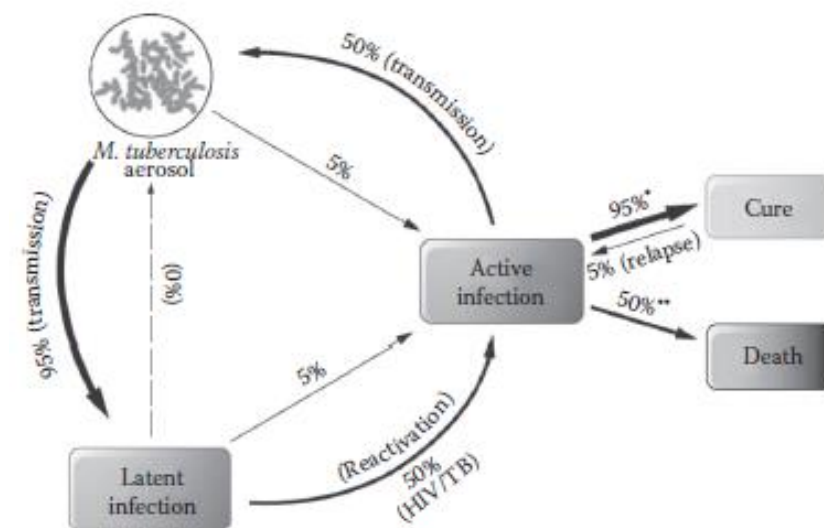


Figure 6. Evolution entre les formes primo-infection, infection tuberculeuse latente et tuberculose maladie [ref : 11]

1.5. Diagnostic de l'infection tuberculeuse latente et de la tuberculose maladie

M. tuberculosis est un agent pathogène de classe 3 et nécessite pour cela d'être manipulé dans un laboratoire de niveau de confinement 3 pour ce qui concerne les cultures et la détermination de la sensibilité phénotypique aux antituberculeux [11]. La manipulation des échantillons comme les crachats pour l'examen microscopique ou la mise en culture qui contiennent peu de bactéries, donc à moindre risque d'aérosolisation, peut ainsi se faire en laboratoire de niveau de sécurité 2.

La plupart des personnes infectées par *M. tuberculosis* ne développe pas une tuberculose maladie. Cet état est appelé infection tuberculeuse latente. Il est caractérisé par la persistance et la multiplication lente de bacilles viables dans les macrophages et l'existence d'une réponse immunitaire contre la bactérie mais sans les signes cliniques, radiologiques et microbiologiques d'une pathologie active. Le granulome formé en réponse à *M. tuberculosis* est composé de macrophages, qui peuvent se différencier en macrophages épithélioïdes ou cellules géantes multinucléées, de lymphocytes T CD4 et CD8 et de lymphocytes B. Les lymphocytes T produisent l'interféron γ qui active les macrophages. Les lymphocytes T CD8 peuvent lyser les macrophages infectés ou tuer les bactéries intracellulaires. Le facteur TNF (tumor necrosis factor) est produit par les macrophages et les lymphocytes T. Des cellules dendritiques sont également présentes et un granulome mature est entouré de fibroblastes.

Il existe deux groupes de tests pour le diagnostic de l'infection tuberculeuse latente : le test cutané à la tuberculine et les tests de libération de l'interféron γ (interferon γ release assays, IGRAs).

1.5.1. Diagnostic de l'infection tuberculeuse latente (ITL)

1.5.1.1. Tests cutanés à la tuberculine

Le test cutané à la tuberculine est une injection intradermique de tuberculine (ou purified protein derivative, PPD) [11]. La tuberculine est un mélange d'antigènes issus de *M. tuberculosis*, *M. bovis* et d'autres mycobactéries non tuberculeuses. Le test mesure une réaction d'hypersensibilité retardée basée sur la reconnaissance immunologique d'antigènes de mycobactéries chez des individus exposés. Les antigènes sont injectés sous l'épiderme, entraînant l'infiltration de lymphocytes spécifiques des antigènes et la production de cytokines inflammatoires. Cette réaction inflammatoire apparaît sous la formation d'une zone indurée au site d'injection.

Les limites du test sont :

- une proportion élevée de faux positifs et faux négatifs
- des difficultés à différencier une vraie infection des effets d'une vaccination BCG ou d'une infection à mycobactérie atypique
- des problèmes techniques de réalisation
- une réponse immunitaire boostée après des test cutanés à la tuberculine répétés
- une interprétation du test subjective
- la nécessité d'une seconde visite pour la lecture du test

1.5.1.2. IGRAs

Le QuantiFERON-TB et le T-SPOT sont deux tests *in vitro ex vivo* mesurant la réponse immune à médiation cellulaire à des peptides antigéniques qui simulent des protéines de mycobactéries [11]. Les antigènes, ESAT-6, CFP-10 et TB7.7 (uniquement pour le QuantiFERON-TB), sont absents des souches de *M. bovis* BCG et de la plupart des espèces non tuberculeuses à

l'exception de *M. kansasii*, *M. szulgai* et *M. marinum*. Les personnes infectées par une espèce du complexe *M. tuberculosis* ont des cellules mononucléées circulantes qui vont reconnaître ces antigènes. Cette reconnaissance entraîne la sécrétion d'interféron γ *in vitro* par les lymphocytes T sensibilisés. Les deux tests reposent sur la détection et la quantification de l'interféron γ . Les avantages des tests IGRAs par rapport au test cutané à la tuberculine sont une meilleure sensibilité, une meilleure spécificité (les résultats sont moins influencés par une vaccination BCG préalable ou par une infection avec une mycobactérie atypique), une réalisation technique plus aisée et une interprétation des résultats moins subjective avec la nécessité d'une seule visite.

1.5.2. Diagnostic de la tuberculose maladie

1.5.2.1. Examen microscopique

Le diagnostic initial de la tuberculose maladie repose sur l'examen microscopique de frottis colorés [11]. Cette technique repose sur le fait que l'enveloppe cellulaire du genre *Mycobacterium* est riche en lipides. Une fois les bacilles colorés par la carbol-fuchsine ou des fluorochromes, ils sont difficilement décolorés, y compris par des solutions composées d'alcool et d'acide. Les bacilles du genre *Mycobacterium* sont ainsi appelés des BAAR (bacilles acido-alcool-résistants). Il existe deux types de coloration pour mettre en évidence les BAAR : la coloration avec une solution de carbol-fuchsine (coloration de Ziehl-Neelsen ou en l'absence de chauffage, coloration de Kinyoun, moins efficace que la coloration de Ziehl-Neelsen) et la coloration avec un fluorochrome (auramine ou auramine-rhodamine). La coloration avec un fluorochrome permet de visualiser des bacilles fluorescents sur un fond sombre ; la sensibilité est améliorée et moins de temps est nécessaire pour parcourir la lame. L'examen microscopique présente une faible sensibilité (25-75% par rapport à la culture) ; le nombre de bacilles

nécessaire à un examen microscopique positif est de l'ordre de 5×10^3 - 10^4 par mL. Enfin, un examen microscopique positif n'atteste pas de la viabilité des bacilles.

1.5.2.2. Culture

La culture est la méthode de référence pour le diagnostic de la tuberculose. Elle est plus sensible que l'examen microscopique (seulement 10 bacilles/mL de crachats sont nécessaires à la positivité de l'examen comparé à au moins 5000 bacilles/mL pour l'examen microscopique). La culture est aussi utile pour détecter les échecs de traitement. Enfin, elle permet de tester la sensibilité phénotypique aux antituberculeux.

1.5.2.3. Détection moléculaire du complexe *M. tuberculosis* et de la résistance aux antituberculeux

Depuis une dizaine d'années, la biologie moléculaire a gagné une place centrale dans le diagnostic de la tuberculose. Des tests rapides reposent sur l'amplification de gènes cibles qui permettent la détection du complexe *M. tuberculosis* et de la résistance plus rapide que les méthodes conventionnelles basées sur la culture [12].

Parmi ces tests rapides, on trouve des tests de PCR hybridation dont le principe repose sur une PCR multiplexe suivie d'une hybridation des produits de PCR à des sondes spécifiques complémentaires présentes sur une bandelette [13,14]. Ils permettent la détection des mutations les plus fréquemment rapportées, bien caractérisées, dans des gènes cibles qui concernent les molécules de première ligne, notamment la région RRDR (rifampicin resistance-determining region) du gène *rpoB* pour la résistance à la rifampicine, et quelques molécules de seconde ligne. Ils peuvent être utilisés à partir d'une culture mais aussi à partir d'un prélèvement si la charge bacillaire est suffisante.

Il existe plusieurs tests automatisés de PCR en temps réel pour la détection du complexe *M. tuberculosis* et de la résistance, que l'OMS recommande pour améliorer le diagnostic de la TB. Le plus connu d'entre eux est le test Xpert MTB/RIF ou sa version plus récente Xpert MTB/RIF Ultra, qui permet la détection du complexe *M. tuberculosis* et l'étude de la région RRDR du gène *rpoB* pour la résistance à la rifampicine [15]. Le test est particulièrement intéressant dans les régions du monde où les capacités des laboratoires sont limitées puisque la cassette contient tous les réactifs nécessaires à la lyse bactérienne, l'extraction, l'amplification et la détection de l'amplification ; l'interprétation des résultats est également très simple. D'autres tests de PCR en temps réel moins automatisés existent et présentent l'avantage de pouvoir notamment i) travailler en série et ii) récupérer l'extrait d'ADN à la fin de la réaction [16].

1.5.2.4. Séquençage haut débit (Whole Genome Sequencing : WGS)

Grâce au séquençage haut débit, l'analyse du génome complet permet de mettre en évidence des polymorphismes et des insertions/délétions au sein de régions associées à la résistance aux antituberculeux. Elle permet également d'améliorer la connaissance des mécanismes de résistance en identifiant de nouvelles mutations. Il existe maintenant de nombreuses plateformes permettant de réaliser ce type d'analyse rapidement avec un coût limité. Cependant, plusieurs façons de traiter les données brutes peuvent être appliquées, ce qui limite la standardisation. Parmi elles, des outils en ligne faciles d'accès et gratuits ont été développés comme PhyResSE ou TB-Profiler [17,18]. Pour l'interprétation des mutations, des bases de données robustes rassemblant un grand nombre de souches pour une même mutation ont été publiées dans la littérature, comme par exemple le catalogue OMS en 2021 [19].

Un des inconvénients du WGS est la nécessité de disposer d'un ADN de qualité, donc d'une culture, ce qui retarde l'obtention du résultat. Pour contourner cette difficulté, le séquençage à

haut débit ciblé a été mis au point et permet d'obtenir des résultats fiables dès réception du prélèvement.

1.5.2.5. Détermination de la sensibilité phénotypique aux antituberculeux

L'antibiogramme phénotypique, dont le principe est de mettre en culture le bacille en présence d'antibiotique, est la méthode de référence pour déterminer la sensibilité aux antituberculeux. En effet, dans la plupart des situations, seuls des tests rapides de biologie moléculaire sont pratiqués, or ceux-ci ne détectent que les mutations les plus fréquentes. De plus, le WGS met parfois en évidence des polymorphismes qui ne sont pas inclus dans les bases de données publiées à ce jour, l'antibiogramme phénotypique permet ainsi d'aider à l'interprétation de ces polymorphismes. Les méthodes pour réaliser l'antibiogramme phénotypique ainsi que les concentrations critiques à tester sont décrites dans des documents OMS [20–22].

1.6. Traitement prophylactique et curatif

1.6.1. Traitement de l'infection tuberculeuse latente

Le dépistage et le traitement de l'infection tuberculeuse latente (ITL) concernent les personnes qui ont un risque accru d'évolution vers la tuberculose maladie telles que les personnes vivant avec le VIH ou celles qui s'appêtent à recevoir un traitement immunosuppresseur, en particulier des anti-TNF α . Les recommandations de traitement varient selon les pays avec plusieurs options thérapeutiques efficaces. En France, le traitement de première intention de l'ITL, lorsque la souche est présumée sensible, repose chez l'adulte et chez l'enfant sur l'association de la rifampicine et de l'isoniazide pendant trois mois [23]. L'administration d'un traitement préventif chez un sujet contact d'une tuberculose multirésistante relève d'un avis

d'experts et peut être discuté en France en réunion de concertation multidisciplinaire animée par le CNR MyRMA [24].

1.6.2. Traitement curatif

Le traitement standard de la tuberculose multisensible comporte quatre molécules de première ligne (rifampicine, isoniazide, éthambutol et pyrazinamide) pendant deux mois suivi d'une bithérapie (rifampicine et isoniazide) pendant quatre mois. La rifampicine et l'isoniazide ont un rôle majeur dans la réduction initiale de la charge bacillaire. Récemment, dans un essai de phase 3 randomisé et contrôlé, un traitement composé de rifapentine à la place de rifampicine et de moxifloxacine à la place d'éthambutol pendant quatre mois a montré une non infériorité en termes d'efficacité par rapport au traitement standard de six mois [25]. Raccourcir la durée de traitement permettrait ainsi d'améliorer l'observance, réduire les effets indésirables et le coût du traitement. La rifapentine, dont la longue demi-vie permet d'augmenter l'exposition des lésions à cette rifamycine, pourrait aider à atteindre cet objectif ; malheureusement, cette molécule pose des problèmes de disponibilité en Europe [26].

La tuberculose résistante à la rifampicine, multirésistante, pré-XDR (multirésistante avec une résistance associée à une fluoroquinolone) ou XDR (multirésistante avec une résistance associée à une fluoroquinolone et à la bédaquiline et/ou au linézolide), dont les définitions ont récemment été mises à jour, nécessitent l'utilisation de molécules de seconde ligne [27]. La tuberculose multirésistante fait régulièrement l'objet de nouvelles recommandations de traitement grâce notamment à la mise sur le marché de nouvelles molécules efficaces. A partir des essais TB-PRACTECAL et ZeNix, l'OMS préconise en 2022 le traitement BPaLM composé de bédaquiline, prêtomanide, linézolide (600 mg) et moxifloxacine pendant 6 mois chez les patients âgés de plus de 15 ans qui n'ont pas été exposés préalablement (plus d'un mois) à la bédaquiline, au prêtomanide et au linézolide ; la moxifloxacine n'est pas administrée

(BPaL) en cas de souche pré-XDR [28]. Cependant, les recommandations présentent l'inconvénient de n'inclure que les tuberculoses pulmonaires puisque la majorité des essais cliniques concernent cette atteinte.

1.7. Résistance aux antituberculeux

La résistance aux antituberculeux est très majoritairement conférée par des mutations dans le génome, en général des SNP ou des petites délétions ou insertions, plus rarement des larges délétions ou inversions [29]. En l'absence de transfert horizontal de gènes, ces mutations apparaissent spontanément dans le chromosome indépendamment de l'exposition aux antituberculeux [30]. Le taux d'émergence spontanée de mutations de résistance à l'isoniazide et à la rifampicine chez *M. tuberculosis* est estimé à 10^{-8} et 10^{-9} mutations par bactérie et par division cellulaire, respectivement, ce qui implique l'apparition inévitable de bactéries résistantes lors d'une monothérapie, si l'on considère un nombre moyen d'environ 10^8 bactéries présentes dans chaque lésion liée à la TB. En conséquence, la TB doit être traitée par la combinaison d'au moins quatre molécules. On distingue la résistance primaire, lorsque la souche qui infecte le malade est d'emblée résistante, de la résistance secondaire, c'est-à-dire acquise sous traitement.

Trois principaux mécanismes permettant aux bactéries d'acquérir la résistance aux antituberculeux sont décrits : une mutation de la cible, une mutation de l'activateur de l'antituberculeux et une modification des pompes d'efflux [29]. Lorsque la cible de l'antituberculeux est modifiée, cela empêche en général la liaison de l'antituberculeux à la cible et entraîne une résistance de la souche à l'antituberculeux. Plusieurs antituberculeux correspondent à des prodrogues qui nécessitent d'être activées *in vivo*, par exemple l'isoniazide est activé par l'enzyme KatG. Si l'activateur n'est plus actif en raison d'une mutation, la souche devient résistante à l'antituberculeux en question. Enfin, il existe des pompes d'efflux capables

de chasser l'antituberculeux de la cellule et pour lesquelles des répresseurs peuvent être inactivés par des mutations. Les principaux mécanismes de résistance aux antituberculeux de première et seconde ligne avec les cibles correspondantes sont listés dans le Tableau 1 [31].

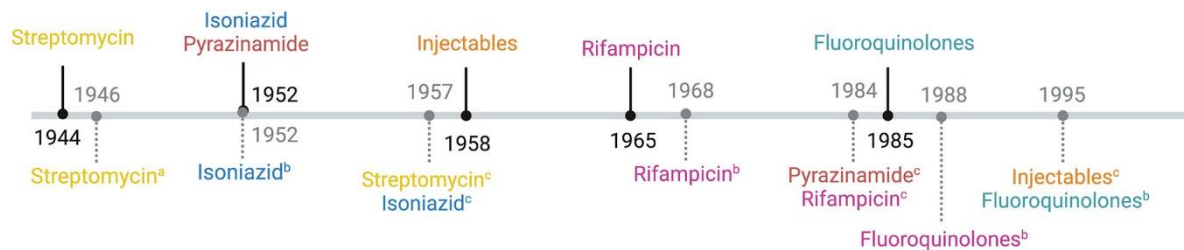
Tableau 1. Liste des principales cibles impliquées dans la résistance aux antituberculeux chez *M. tuberculosis* [31]

Antibiotic	Target gene	Resistance mechanism
Rifampicin	<i>rpoB</i>	Drug target alteration
Isoniazid	<i>katG</i>	Abrogated prodrug activation
	<i>inhA</i>	Drug target alteration
	<i>inhA</i> promotor	Drug target overexpression
Ethambutol	<i>embB</i>	Drug target alteration
Pyrazinamide	<i>pncA</i>	Abrogated prodrug activation
Ethionamide	<i>inhA</i>	Drug target alteration
	<i>inhA</i> promotor	Drug target overexpression
	<i>ethA</i>	Abrogated prodrug activation
Fluoroquinolones	<i>gyrA/B</i>	Drug target alteration
Streptomycin	<i>rrs</i>	Drug target alteration
	<i>rpsL</i>	Drug target alteration
Amikacin	<i>rrs</i>	Drug target alteration
Kanamycin A	<i>rrs</i>	Drug target alteration
	<i>eis</i> promotor	Overexpression of drug inactivating enzyme
Capreomycin	<i>rrs</i>	Drug target alteration
	<i>tlyA</i>	Abrogation of drug target methylation
P-aminosalicylic acid	<i>thyA</i>	Drug target bypassing
	<i>folC</i>	Abrogation of prodrug activation
Cycloserine	<i>ald</i>	Overabundance of drug target substrate
	<i>alr</i>	Drug target alteration
	<i>alr</i> promotor	Drug target overexpression
Bedaquiline	<i>atpE</i>	Drug target alteration
	Promotor/ <i>mmpR</i>	Overexpression of efflux pump MmpL5
Linezolid	<i>rplC</i>	Drug target alteration
	<i>rrl</i>	Drug target alteration
Delamanid/preto manid	<i>ddn</i>	Abrogation of prodrug activation
	<i>fgd1</i>	Abrogation of prodrug activation
	<i>fbiA/B/C</i>	Abrogation of prodrug activation
Clofazimine	Promotor/ <i>mmpR</i>	Overexpression of efflux pump MmpL5

A ce jour, la résistance à l'ensemble des antituberculeux a été rapportée dans des souches cliniques. Depuis l'introduction du premier antituberculeux, la streptomycine, la résistance à la

plupart des antituberculeux a été observée dans les 5 à 10 premières années d'utilisation (Figure 7) [29].

Date of introduction to clinical use for antituberculous drugs and estimated date of resistance emergence



a Clinical case series report (Youmans et al. 1946)

b Global lineage 4 (Brynildsrud et al. 2018)

c Tugela Ferry XDR (Cohen et al. 2015)

Figure 7. Date de début d'utilisation en clinique des antituberculeux (trait plein) et estimation de la date d'émergence de la résistance (trait pointillé) [ref: 29]

1.8. Caractéristiques microbiologiques de *M. tuberculosis*

1.8.1. Taxonomie

M. tuberculosis fait partie de la famille *Mycobacteriaceae*, de l'ordre *Mycobacteriales*, de la classe *Actinomycetes* et du phylum *Actinomycetota* [32].

1.8.2. Génome

La séquence du génome de la souche de référence H37Rv a été publiée en 1998 [33]. Le génome comporte 4,4 mégabases [29]. Il est 33% plus petit que le génome de *M. smegmatis* et l'un des plus petits au sein du genre *Mycobacterium* en dehors de *M. leprae* (1,6 mégabases). Il contient 3906 gènes codant, dont un grand nombre est impliqué dans le métabolisme des acides gras en raison de la structure complexe de l'enveloppe cellulaire. Il est très riche en bases guanine et cytosine, et à la différence d'autres bactéries, par exemple les bactéries à Gram négatif, il n'y a pas de recombinaison ou de génome accessoire. Environ 10% du génome correspond aux

familles de gènes *pe* et *ppe*, détaillés dans un autre chapitre. Le taux de mutation est bas, d'environ 0,3 à 0,5 SNP par génome et par an.

1.8.3. Enveloppe cellulaire

En lien avec le caractère acido-alcool-résistant de la bactérie, l'enveloppe cellulaire de *M. tuberculosis* est composée d'une membrane cytoplasmique, d'une paroi, de lipides de surface et d'une capsule (Figure 8) [34]. La paroi cellulaire comporte quant à elle un peptidoglycane, une couche d'arabinogalactanes et une couche d'acides mycoliques, appelée aussi mycomembrane.

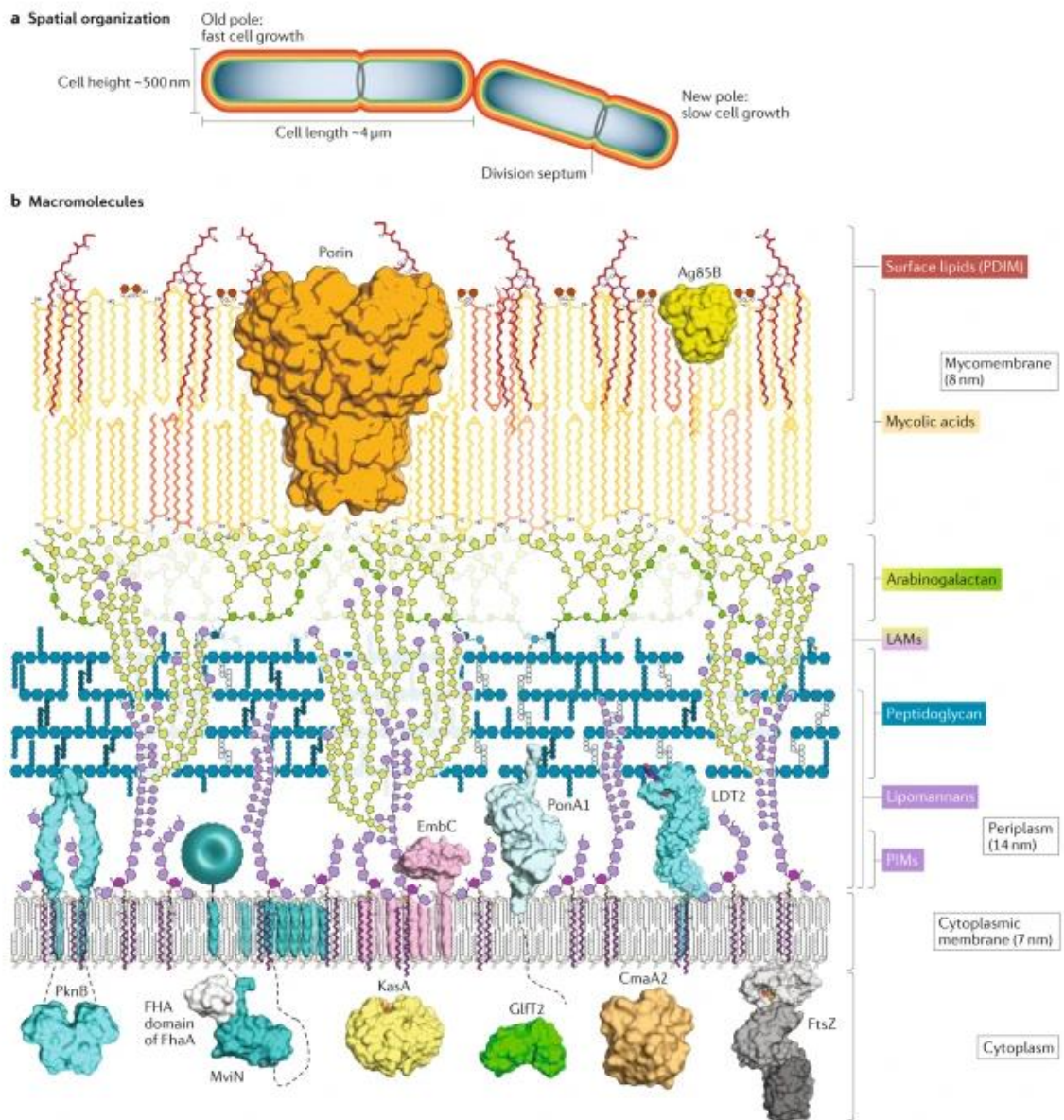


Figure 8. Schéma de l'enveloppe cellulaire chez *M. tuberculosis* [ref : 34]

La membrane cytoplasmique contient des lipides membranaires classiques comme des glycérophospholipides, mais aussi des phosphatidylinositol mannosides (PIM), des lipomannanes (LM) et des lipoarabinomannanes (LAM), les deux derniers étant des dérivés des PIM. Constitués de phospho-*myo*-inositols liés à un à six mannoses, les PIM contribuent à la faible perméabilité de l'enveloppe cellulaire et à la résistance naturelle aux antibiotiques. Les

PIM sont ancrés dans la membrane à l'aide d'une à quatre chaînes d'acides gras liés à divers groupes de la base 1-phospho-2-mannose *myo*-inositol (AcPIM₁).

Le peptidoglycane est composé de chaînes polysaccharidiques formées d'une alternance de N-acetylglucosamine (GlcNAc) et d'acide N-acetylmuramique qui sont reliées entre elles par des peptides grâce aux PBP (penicillin-binding protein) transpeptidases. Il assure le maintien de la forme cellulaire et protège la membrane cytoplasmique contre la pression osmotique du cytoplasme.

La couche de sucres arabinogalactanes est reliée au peptidoglycane par un disaccharide rhamnose-GlcNAc. Au sein de la couche arabinogalactane, des chaînes d'arabinose sont liées à certains résidus galactoses du galactane.

La mycomembrane comporte des lipides, des glycolipides et des protéines. La couche externe est composée principalement d'acides mycoliques, qui peuvent être libres ou bien attachés à des sucres tréhaloses ; ils forment alors des tréhaloses monomycolate (TMM) ou des tréhaloses dimycolates (TDM). La couche interne est faite d'acides mycoliques attachés de manière covalente à la couche sous-jacente d'arabinogalactane. La mycomembrane est responsable de l'imperméabilité de l'enveloppe cellulaire des mycobactéries, avec par exemple une perméabilité aux bêta-lactamines 100 à 1000 fois moins importante que l'enveloppe des bactéries à Gram négatif. Les acides mycoliques sont des acides gras à longue chaîne 2-alkyl, 3-hydroxyl, pour lesquels le lipide en position 2, appelé chaîne α , est saturé et comporte 22 à 26 atomes de carbone. Le lipide en position 3-hydroxyl, le meromycolate, est constitué de 42 à 62 carbones. La chaîne α , ainsi que les premiers carbones du meromycolate, sont synthétisés par les enzymes FAS-I (fatty acid synthase I) (Figure 9) [34]. Les enzymes FAS-II permettent, quant à elles, l'élongation des chaînes des meromycolates. Les acides mycoliques subissent des transformations diverses : désaturations, *cis* ou *trans* cyclopropanations, additions de groupements hydroxyl, keto ou methoxyl. Par exemple, PcaA est une cyclopropane synthase

qui ajoute les *cis*-cyclopropanes proximaux des *cis/cis*-meromycolates. Enfin, on trouve au sein de la mycomembrane le lipide de surface phthiocerol dimycocerosate (PDIM).

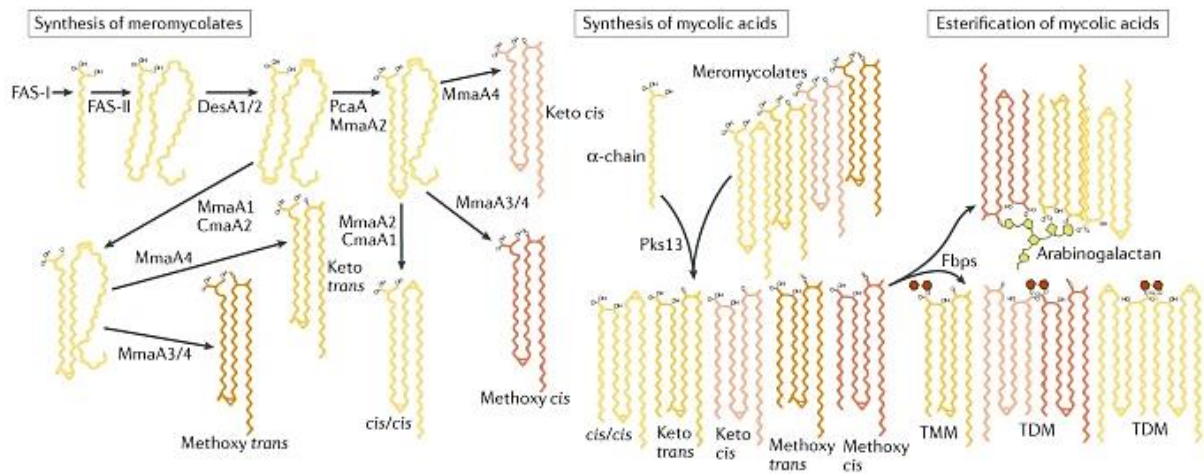


Figure 9. Synthèse des acides mycoliques [ref : 34]

1.9. Virulence

A la différence de pathogènes capables de produire des toxines spécifiques ou des facteurs de virulence uniques tels que *Clostridium difficile*, *M. tuberculosis* ne possède pas un facteur de virulence prédominant ; en effet, la maladie résulte plutôt d'une combinaison de marqueurs de virulence associés à des réponses immunitaires. Pour aider dans l'identification de ces marqueurs, des études essentielles, basées sur des bibliothèques de mutants par transposon, ont mis en évidence des gènes nécessaires à la croissance *in vivo* [35]. D'autres travaux ont aidé à mieux comprendre la pathogénicité de *M. tuberculosis* en comparant des souches virulentes à des souches atténuées [36,37]. L'ensemble de ces études ont permis d'identifier et caractériser les principaux facteurs de virulence de *M. tuberculosis* détaillés dans ce chapitre.

1.9.1. Les systèmes de sécrétion de type VII et autres protéines de la paroi cellulaire

1.9.1.1. Les systèmes de sécrétion de type VII

Il existe chez *M. tuberculosis* 5 systèmes de sécrétion de type VII qui diffèrent des systèmes de sécrétion de type I à VI rencontrés chez les bactéries à Gram négatif (Figure 10) [38].

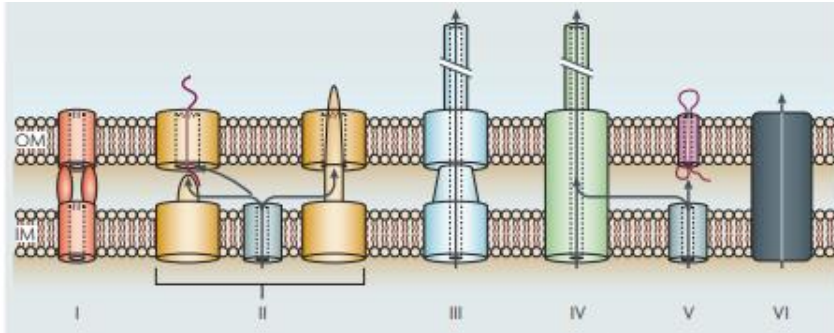


Figure 10. Les systèmes de sécrétion de type I à VI chez les bactéries à Gram négatif [ref : 38]. Ces systèmes de transport permettent le passage de substrats à travers la paroi cellulaire qui comporte une membrane interne et une membrane externe. Le système I couvre l'ensemble de la paroi cellulaire. Le système II permet le passage des protéines dans le périplasma puis à travers la membrane externe. Les systèmes III et IV permettent le transport de substrats directement dans les cellules hôtes. Le système V utilise un mécanisme à deux étapes pour le passage des substrats à travers la membrane interne et la membrane externe. Le système VI a moins été étudié ; il serait nécessaire pour la sécrétion de certains facteurs de virulence chez *Vibrio cholerae* et *Pseudomonas aeruginosa*.

Les systèmes de sécrétion de type VII sont aussi appelés les systèmes de sécrétion ESAT-6 (ESX), du nom de la première protéine découverte ESAT-6 (6 kDa early secretory antigenic target ou EsxA) chez *M. tuberculosis* [39]. Les systèmes ESX existent chez les mycobactéries mais aussi dans d'autres genres du phylum *Actinomycetota* comme *Streptomyces*, *Corynebacterium*, *Nocardia* ou *Gordonia*, ou bien au sein du phylum *Bacillota* (anciennement *Firmicutes*) comme *Bacillus anthracis*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* et *Listeria monocytogenes*. Quel que soit le phylum, les loci *esx* présentent deux caractéristiques communes : la présence de gènes codant pour des petites protéines sécrétées d'environ 100 acides aminés qui possèdent un motif conservé Trp-X-Gly (WXG) permettant la formation de structures hélice-coude-hélice au centre du polypeptide et la présence de gènes codant pour des

protéines transmembranaires de la famille FtsK-SpoIIIE-like ATPase. *M. tuberculosis* possède 5 systèmes ESX au sein de son génome : ESX-1, ESX-2, ESX-3, ESX-4 et ESX-5. Comme le locus *esx-4* possède le plus petit nombre de gènes et que des systèmes orthologues au système ESX-4 existent dans d'autres mycobactéries et d'autres espèces du phylum *Actinomycetota*, l'hypothèse est que les autres systèmes ESX proviendraient d'un système ancestral ESX dérivé d'un système ESX-4-like à partir de duplication génique, de diversification génique et de transferts horizontaux de gènes (Figure 11).

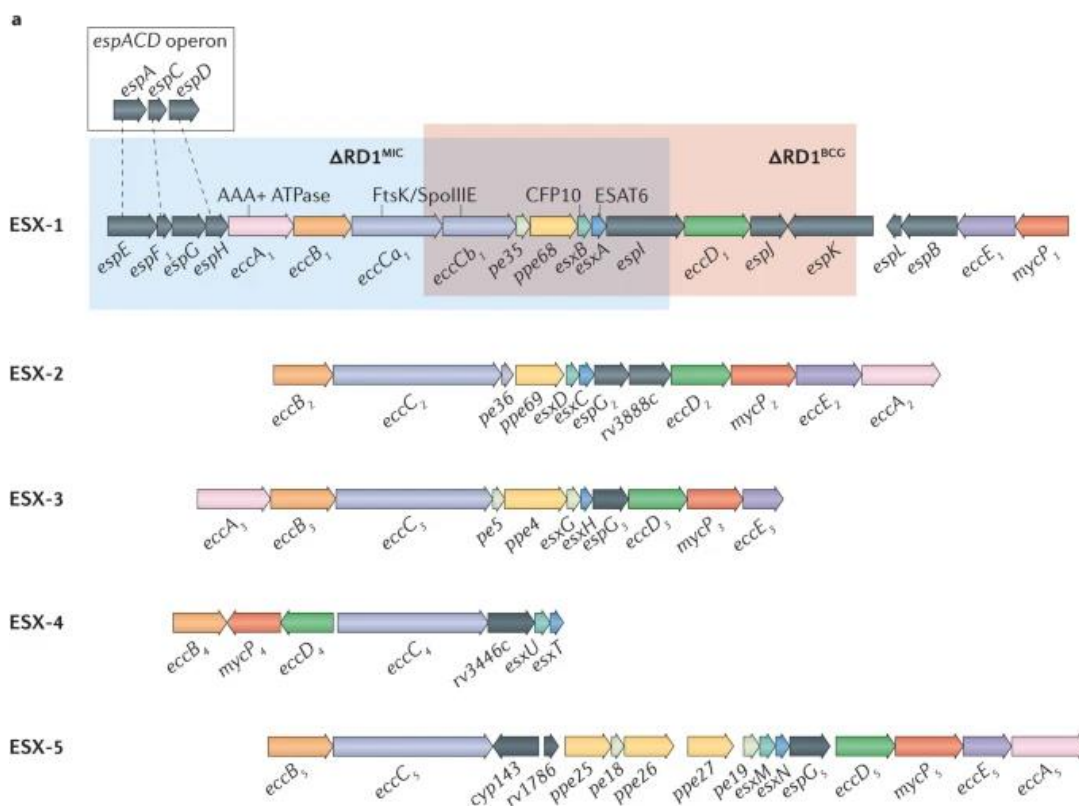


Figure 11. Organisation génétique des 5 systèmes ESX chez *M. tuberculosis* H37Rv [ref : 39]

Le système ESX-1 a été mis en évidence lors d'études comparatives, génomiques et fonctionnelles, impliquant *M. tuberculosis* et les souches vaccinales atténuées *M. bovis* bacille Calmette-Guérin (BCG) et *M. microti* [36,40,41]. Les souches vaccinales ne possèdent pas entre autres *esxA*, cela résultant de délétions spontanées de portions de différentes tailles du locus

esx-1 ; chaque portion délétée est appelée région de différence 1 (RD1) (Figure 4) [39]. Le système ESX-1 permet notamment la sécrétion de deux protéines, EsxA et EsxB (aussi appelés ESAT-6 et CFP-10 (10-kD Culture Filtrate Protein)), qui forment un hétérodimère EsxA-EsxB de quatre hélices α . Les derniers acides aminés 3 à 12 de la partie C-terminal de EsxA seraient nécessaires à la fonction et à la virulence, mais pas à la sécrétion. En revanche, les 7 derniers acides aminés de la partie C-terminal de EsxB semblent essentiels à la sécrétion de EsxB, permettant l'interaction avec EccCb. PE35 et PPE68 formeraient également un complexe à quatre hélices α . La sécrétion des substrats nécessite les protéines EccA, EccB, EccC, EccD et EccE (Ecc : ESX-1 core component) ainsi que la protéase MycP [42]. L'analyse en cryo-microscopie électronique du système ESX-5 de *M. tuberculosis* a ainsi montré un complexe de 2,32 MDa ancré dans la membrane cytoplasmique grâce à 165 domaines transmembranaires, composé de EccB₅, EccC₅, EccD₅, EccE₅ et MycP₅ avec une stoechiométrie de 6:6:12:6:3 (Figure 12) [43]. L'énergie nécessaire au transport des substrats à travers la membrane est fournie par l'hydrolyse de l'ATP, assurée par deux ATPases : EccA et EccC [42].

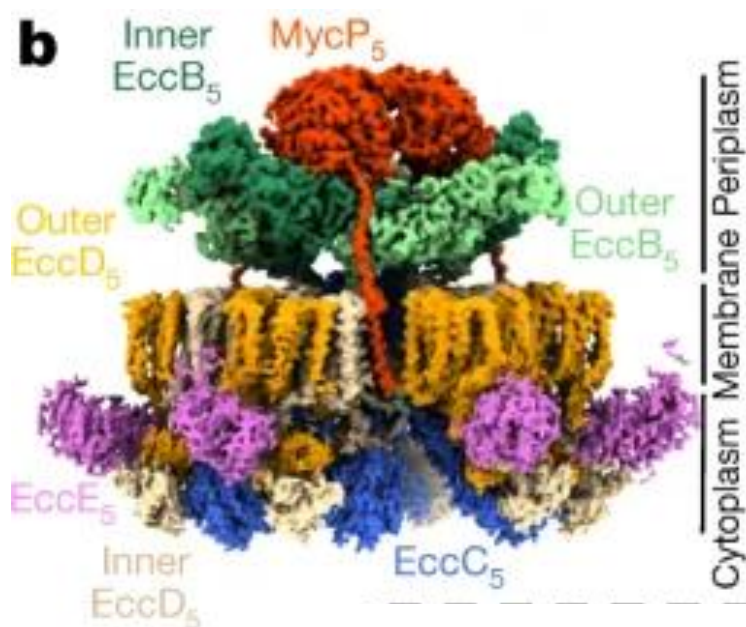


Figure 12. Cryo-EM structure du système ESX-5 chez *M. tuberculosis* [ref : 43]

Situé 260 kb en amont du locus *esx-1*, l'opéron *espACD* code pour d'autres substrats de ESX-1 ; la sécrétion de EspA et EspC nécessite EsxA et EsxB et inversement. ESX-1 est régulé par le système à deux composants PhoPR via WhiB6 mais aussi via EspR, notamment en régulant la transcription de *espACD* [44]. La transcription de l'opéron *espACD* serait également réprimée par le système à deux composants MprA-MprB.

Une fois phagocytées, les mycobactéries pathogènes interfèrent avec la maturation du phagosome et la formation du phagolysosome permettant la survie du bacille. ESX-1 permet notamment la rupture du phagosome et la translocation du bacille dans le cytoplasme [45]. Cependant, le fait que des espèces non virulentes comme *M. smegmatis*, possédant un système ESX-1 phylogénétiquement plus éloigné, ne sont pas capables de causer la rupture du phagosome semble indiquer que des facteurs additionnels au système ESX-1 sont nécessaires à ce phénomène [46]. Le contact du cytosol avec les composés bactériens entraîne l'activation du système de l'immunité innée puis la mort cellulaire, ce qui permet au bacille d'infecter de nouvelles cellules. Notamment, l'enzyme cGAS (cytosolic DNA sensor nucleotidyltransferase cyclic GMP-AMP synthase) détecterait l'ADN mycobactérien présent dans le cytoplasme ; la façon dont l'ADN bactérien est relargué dans le cytosol n'est cependant pas connue. Le signal détecté entraîne *in fine* l'expression d'interférons de type I (par exemple IFN β), qui semble être au détriment de l'hôte. En effet, l'absence d'IFN de type I serait responsable d'une baisse de la charge bactérienne chez des souris infectées par la souche clinique HN878 [47]. Le contact de la bactérie avec le cytosol permet également via un mécanisme dépendant d'ESX-1 la sécrétion d'IFN γ médiée par IL-18 par les cellules T CD8⁺ et les cellules NK. Enfin, la détection de l'ADN dans le cytosol active la sécrétion d'IL-1 β [46].

Les autres systèmes ESX sont moins étudiés. ESX-5, présent uniquement dans des mycobactéries à croissance lente, permettrait le transport d'un grand nombre de protéines PE

et PPE. ESX-3 jouerait un rôle dans le métabolisme du fer. ESX-2 et ESX-4 ne seraient pas impliqués dans la virulence [39].

1.9.1.2. Autres protéines de la paroi cellulaire impliquées dans la virulence

En dehors des systèmes de sécrétion de type VII, les trois membres du complexe antigène 85, appelés Ag85A, Ag85B et Ag85C, codés respectivement par *fbpA*, *fbpB* et *fbpC*, sont parmi les protéines les plus secrétées chez *M. tuberculosis* [48]. Ces enzymes interviennent dans la synthèse des TMM et TDM mais également dans la liaison covalente des acides mycoliques à la couche d'arabinogalactane.

Les protéines de la famille Mce sont impliquées dans l'invasion et la persistance de *M. tuberculosis* dans les cellules de l'hôte. Le génome de *M. tuberculosis* contient quatre opérons *mce* (*mce1-4*). Chaque opéron *mce* comporte 8 à 13 gènes avec un arrangement similaire (Figure 13) [49]. Il a été montré que la protéine purifiée Mce1 de *M. tuberculosis* permettait la capture par les cellules HeLa de microsphères composées de latex et polystyrène couplées à cette protéine [50]. Les autres fonctions rapportées des protéines Mce sont la régulation de l'expression de systèmes de transport, le transport de lipides et la perturbation de la réponse inflammatoire de l'hôte [49].

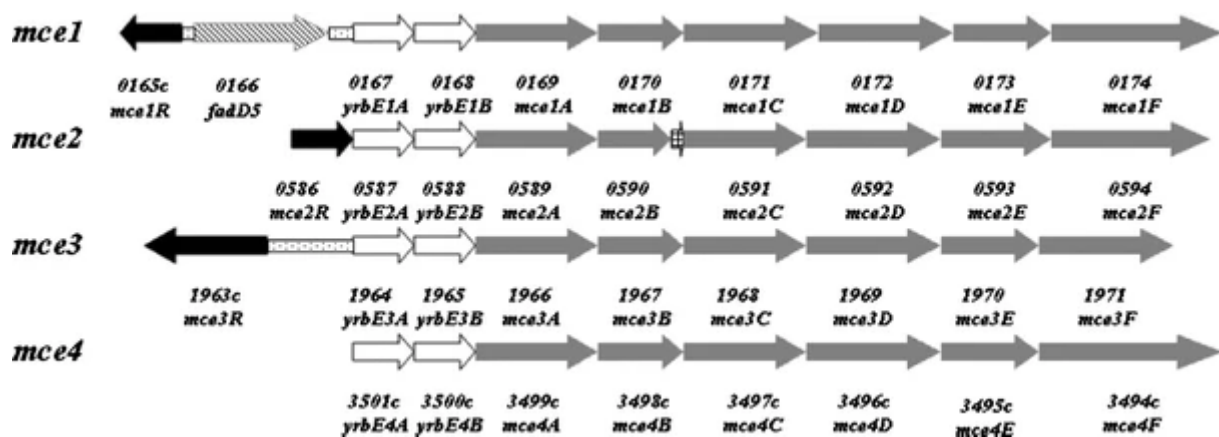


Figure 13. Organisation des opérons *mce* [ref : 49]

1.9.2. Les lipides de surface

D'autres composants de l'enveloppe cellulaire, comme les lipides de surface ou les enzymes intervenant dans leur synthèse, ont montré une implication dans la pathogénicité de *M. tuberculosis*. Parmi les enzymes de synthèse des lipides de surface, PcaA participe au blocage de la fusion phagosome-lysosome et stimule la sécrétion de la cytokine pro-inflammatoire TNF au cours de l'infection des macrophages [34]. KasB, l'une des deux protéines β -ketoacyl-acyl synthases dans la voie FAS-II, permet l'élongation des lipides meromycolates. Lorsque KasB est inhibé via une phosphorylation par PknF, *M. tuberculosis* présente des meromycolates plus courts et une paroi plus perméable ; en conséquence, la croissance et la virulence sont plus faibles dans le modèle murin [34].

Les PIM, LM et LAM ont la capacité d'activer le récepteur Toll-like 2, ce qui diminue la présentation des antigènes MHC de classe II et permet aux cellules présentatrices d'antigènes, comme les macrophages et les cellules dendritiques, d'éviter de se faire éliminer par les cellules T. Les PDIM, quant à eux, sont essentiels au processus d'infection. En effet, ils masquent les motifs de l'enveloppe cellulaire associés à la pathogénicité, permettant à *M. tuberculosis* de

recruter des macrophages naïfs plutôt que des macrophages microbicides [34]. Ils favorisent aussi la rupture du phagosome, en association avec ESX-1, et induisent la réponse interféron de type I (Figure 14) [10].

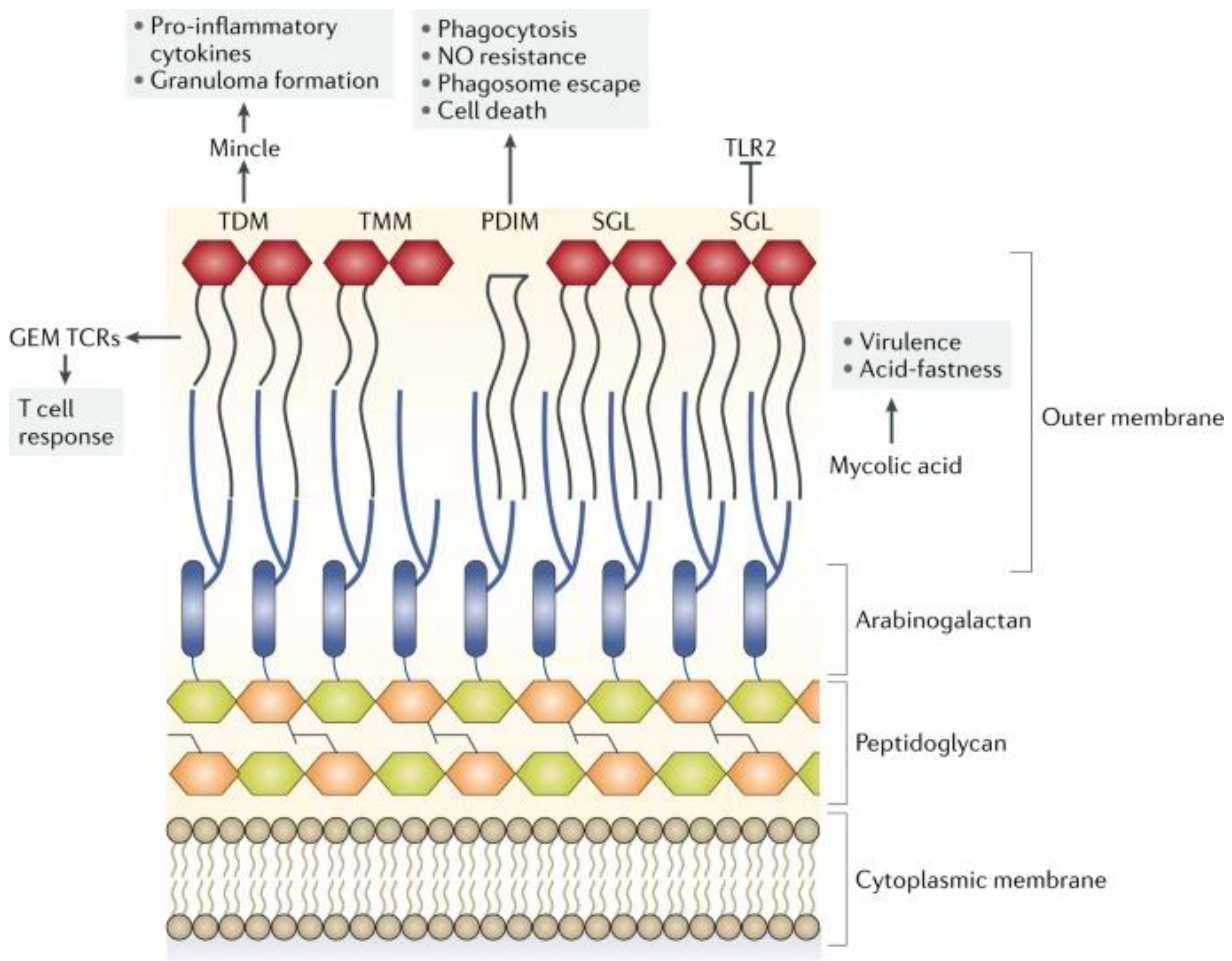


Figure 14. Lipides immunoréactifs de l'enveloppe cellulaire de *M. tuberculosis* [ref : 10]

Exposés à la surface de l'enveloppe cellulaire de *M. tuberculosis*, les lipoarabinomannanes encapsulés de mannose (ManLAM) jouent un rôle dans la manipulation des fonctions du phagocyte [51]. Notamment, ils inhibent la production de cytokines pro-inflammatoires, la maturation du phagosome, l'apoptose et l'autophagie. Ces propriétés d'inhibition sont principalement liées à la potentielle liaison de ces molécules aux récepteurs mannose (C-type

lectins Mannose Receptor) pour l'entrée dans les macrophages ou aux lectines DC-SIGN pour l'entrée dans les cellules dendritiques.

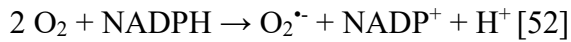
En comparant les génomes de *M. canettii* phénotype lisse avec des variants spontanés phénotype rugueux, Boritsch *et al.* ont observé des différences dans le locus *pks5*, à savoir la recombinaison de deux gènes *pks5* avec la délétion du gène *pap* central [37]. Cette particularité étant retrouvée dans les souches du complexe tuberculosis, les auteurs émettent l'hypothèse d'un événement moléculaire fixé dans le complexe tuberculosis suite à la séparation avec *M. canettii*. Ce réarrangement entraîne la perte de synthèse des lipooligosaccharides (LOS) de l'enveloppe cellulaire, dans laquelle Pks5, polyketide synthase de type I, participe, et une augmentation de la virulence lors de l'infection de macrophages THP-1 et de souris SCID.

1.9.3. Les protéines impliquées dans la réponse au stress nitro-oxydatif, l'arrêt de la maturation du phagosome et la résistance au pH acide

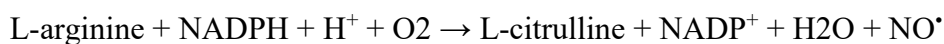
L'oxydation est définie par un gain d'oxygène, une perte d'électrons ou une perte d'hydrogène tandis que la réduction correspond à une perte d'oxygène, un gain d'électrons ou un gain d'hydrogène [52]. L'homéostasie redox renvoie au maintien de la balance entre la capacité oxydative et la capacité réductrice dans un système biologique tel qu'une cellule, un organe ou un organisme. Cet équilibre est crucial pour fournir un environnement redox adéquat nécessaire à l'utilisation de l'énergie liée au catabolisme des substrats pour former l'ADN, les lipides et les protéines. Des déséquilibres de la balance redox que ce soit dans le bacille ou dans l'hôte servent de stimuli pour *M. tuberculosis* qui vont aboutir à la persistance, la dormance ou la réactivation du bacille.

Les macrophages activés produisent deux enzymes, la phagocyte oxydase (NOX2/gp91^{phox}) et la nitric oxyde synthase inductible (iNOS), qui génèrent des dérivés réactifs de l'oxygène (ROI)

et de l'azote (RNI) (Figure 15) [53]. NOX2 transporte des électrons depuis le NADPH du cytoplasme des phagocytes à l'oxygène à travers la membrane du phagosome et génère des ions superoxide selon la formule :



NOX2 entraîne la formation de dérivés réactifs de l'oxygène, terme générique qui rassemble des radicaux de l'oxygène tels que $\text{O}_2^{\cdot-}$, HO_2^{\cdot} , HO^{\cdot} , RO_2^{\cdot} , RO^{\cdot} et CO_2^{\cdot} et des dérivés non radicaux tels que H_2O_2 , ONOO^- , ONOOH , ONOOCO_2^- , HOCl , HOBr et O_3 . Les dérivés réactifs de l'azote sont formés lorsque $\text{O}_2^{\cdot-}$ réagit avec NO. Lors de l'infection des macrophages par *M. tuberculosis*, l'enzyme iNOS est exprimée et conduit à la formation de NO à partir de L-arginine selon la formule :



NO réagit ensuite avec $\text{O}_2^{\cdot-}$ généré par NOX2 et entraîne la formation de radicaux libres tels que NO^{\cdot} , NO_2^{\cdot} et NO_3^{\cdot} et des dérivés non radicaux tels que HNO_2 , NO^+ , NO^- , N_2O_4 , N_2O_3 , NO_2^+ , ROONO et RO_2ONO . La production de ROI et RNI est la principale stratégie d'élimination des bactéries phagocytés par l'hôte ; ces composés peuvent cependant nuire aussi à l'hôte en endommageant l'ADN ou en oxydant les lipides et les protéines.

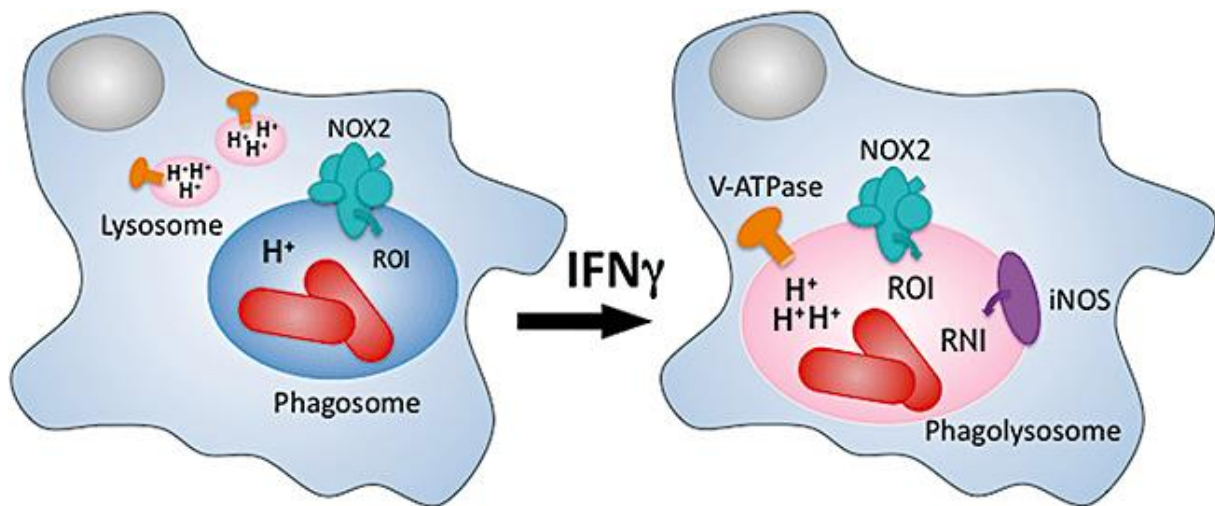


Figure 15. *M. tuberculosis* au sein du macrophage. *M. tuberculosis* est exposé à un environnement modérément acide et aux ROI produits par la phagocyte oxydase (NOX2). Après activation par l'IFN γ , le phagosome évolue et fusionne avec les lysosomes. *M. tuberculosis* est alors exposé aux protons produits par l'ATPase de la vacuole, les RNI de l'iNOS et les ROI de la NOX2. [ref : 53]

M. tuberculosis est capable de s'adapter aux différents environnements redox depuis les alvéoles des poumons, au sein des phagocytes jusqu'à l'environnement hypoxique du granulome grâce à différents mécanismes [52]. Le régulon DosR/S/T est un système à trois composants qui comporte deux senseurs histidine kinase avec un hème (DosS et DosT) et un régulateur (DosR). DosS et DosT sont capables de se lier à O₂, NO et CO, permettant à *M. tuberculosis* d'identifier l'environnement redox, et de transmettre le signal à DosR, qui va réguler l'expression de gènes au sein du régulon Dos permettant un changement du métabolisme vers l'état de persistance. Les protéines de la famille WhiB, qui comportent un cluster Fe-S, sont également capables de détecter l'environnement redox ; elles seront détaillées dans un autre chapitre. Enfin, certains facteurs anti- σ comme SigH ou SigE sont capables de détecter le stress disulfide, qui est la formation incontrôlée de ponts disulfides.

Pour la détoxification des ROI et RNI, *M. tuberculosis* utilise l'enzyme catalase-peroxydase KatG qui permet de transformer H₂O₂ en eau et oxygène [53]. *M. tuberculosis* possède également deux superoxide dismutases, SodA et SodC, qui convertissent les anions superoxide

en hydrogène peroxide. Pour maintenir un environnement réduit dans le cytosol, *M. tuberculosis* se sert de mycothiol comme antioxydant. Cependant, la délétion de *mshA*, qui code pour la première enzyme dans la synthèse du mycothiol, n'entraîne pas de défaut de croissance chez la souris et entraîne le décès des souris immunocompétentes et immunodéficientes avec la même cinétique que la souche WT, indiquant la présence probable de mécanismes alternatifs à l'absence de mycothiol. En revanche, la délétion de *cysH*, gène codant pour l'enzyme CysH 5'-adenosinephosphosulfate réductase qui intervient dans l'assimilation du soufre, en particulier la conversion de l'adénosine 5'-phosphosulfate en sulfite, permettant la synthèse des molécules contenant du soufre comme le mycothiol, atténue la virulence de *M. tuberculosis* chez des souris immunocompétentes. Les thiorédoxines, protéines de petit poids moléculaire qui possèdent un motif conservé WCXXC, interviennent également dans le maintien d'un environnement cytoplasmique réduit [52]. Pour détoxifier les RNI et ROI, *M. tuberculosis* produit également une NADH-dépendant peroxydase et une peroxy-nitrite réductase qui correspondent à quatre protéines : alkylhydroperoxide réductase sous-unité C (AhpC), thiorédoxine oxydoréductase (AhpD), dihydrolipoamide acyltransférase (DlaT) et lipoamide déhydrogénase (Lpd) [53]. L'exposition aux ROI et RNI peut conduire à la formation de méthionine sulfoxyde au sein des protéines contenant des méthionines, qui peut interférer avec la fonction protéique. Pour réparer cela, *M. tuberculosis* possède deux enzymes MsrA (méthionine sulfoxyde réductase), chacune étant spécifique d'un épimère de méthionine sulfoxyde, qui permettent de convertir la méthionine sulfoxyde en méthionine. Quant aux dommages causés à l'ADN par les ROI et RNI, *M. tuberculosis* utilise notamment les enzymes UvrB et DnaE2 ; *dnaE2* code pour une ADN polymérase qui à la fois répare les dommages causés à l'ADN et génère des mutations qui améliorent le fitness.

Une fois dans le phagosome, *M. tuberculosis* est capable de stopper la maturation de celui-ci et d'empêcher la fusion phagosome-lysosome (Figure 15). En conséquence, le pH dans le

phagosome est modérément acide (pH 6,2-6,4), dû à l'exclusion des pompes proton-ATPase. Cependant, après activation immunologique des macrophages, par exemple liée à l'IFN γ , la maturation du phagosome reprend, le pH atteint 4,5-5,4 et la bactérie doit s'adapter à ce nouvel environnement. La résistance au pH acide et l'homéostasie du pH intracellulaire sont assurés par divers mécanismes, dont l'exclusion des protons, la production d'ammoniac, la décarboxylation d'acides aminés, la modification de l'enveloppe cellulaire et la protection des macromolécules. Parmi les composants de l'enveloppe cellulaire, la protéine OmpATb formerait un pore dans la mycomembrane qui se fermerait en cas de pH acide, *M. tuberculosis* diminuerait ainsi la perméabilité de son enveloppe cellulaire pour survivre en condition acide. Deux gènes *rv3671c* et *rv2136c* interviendraient dans le maintien du pH neutre intrabactérien dans un environnement acide. Le gène *rv3671c* code pour une sérine protéase membranaire, *rv2136c* code pour une protéine homologue chez *E. coli* UppP, une undecaprenol pyrophosphate phosphatase impliquée dans la synthèse du peptidoglycane ; les mécanismes exacts par lesquels les deux gènes ont un rôle dans la protection contre le pH acide et dans la virulence ne sont pas encore connus.

1.9.4. Les régulateurs d'expression génique, incluant les systèmes à deux composants et les facteurs sigma

Les systèmes à deux composants permettent aux bactéries de s'adapter aux stimuli environnementaux. Ils comportent i) une histidine kinase membranaire capable de détecter un signal conduisant à une autophosphorylation sur un résidu histidine en utilisant un groupement phosphoryl d'une molécule d'ATP et ii) un régulateur cytoplasmique qui apporte une réponse au signal après avoir reçu le groupement phosphoryl de l'histidine kinase phosphorylée sur un résidu aspartate (Figure 16) [54,55]. Les réponses peuvent être une liaison à l'ADN avec régulation de la transcription, une liaison à l'ARN avec régulation de la traduction, des

interactions protéiques ou des activités enzymatiques [55]. Ubiquitaires chez les bactéries, on retrouve également les systèmes à deux composants chez quelques plantes, eucaryotes inférieurs et archées. *M. tuberculosis* possède 11 systèmes à deux composants (Tableau 2), cinq régulateurs orphelins et deux senseurs orphelins [55]. Des gènes homologues existent dans d'autres espèces de mycobactéries, notamment tous les systèmes à deux composants identifiés chez *M. tuberculosis* existent chez *M. bovis* subsp BCG et seulement quatre sont présents chez *M. leprae* (*kdpD-kdpE* absent) (Tableau 2).

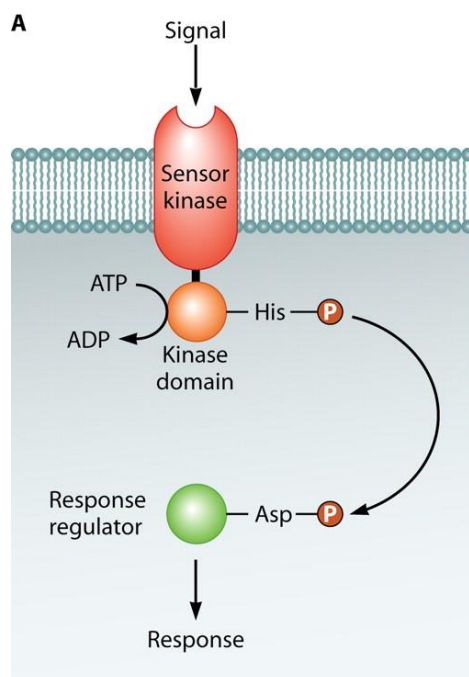


Figure 16. Schéma d'un système à deux composants [ref : 55]

Tableau 2. Systèmes à deux composants chez *M. tuberculosis* et autres espèces du genre *Mycobacterium* [55]

TCSS	Status in indicated <i>Mycobacterium</i> species and strain ^a										
	Mab	Mav	Mb	BCG	MI	Mmar	Mpar	Msm	Mtb	MRa	Mul
<i>regX3-senX3</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Rv0600c-Rv0601c-tcrA</i>	-	-	+	+	-	-	^	-	*	+	-
<i>phoP-phoR</i>	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
<i>narL-Rv0845</i>	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
<i>prpA-prpB</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>mprA-mprB</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>kdpD-kdpE</i>	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-
<i>trcR-trcS</i>	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-
<i>dosR-dosS (dosT)</i>	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-
<i>mtrA-mtrB</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>tcrX-tcrY</i>	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-
<i>pdtaR-pdtaS^b</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

^a Mab, *Mycobacterium abscessus* ATCC 19977; Mav, *Mycobacterium avium* 104; Mb, *Mycobacterium bovis* AF2122/97; BCG, *Mycobacterium bovis* BCG Pasteur 1173P2; MI, *Mycobacterium leprae*; Mmar, *Mycobacterium marinum* strain M; Mpar, *Mycobacterium paratuberculosis* K-10; Msm, *Mycobacterium smegmatis*; Mtb, *Mycobacterium tuberculosis* CDC1551; MRa, *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra; Mul, *Mycobacterium ulcerans* Agy99. +, genes encoding the sensor kinase and response regulator are present and are genetically linked; -, genes encoding both the sensor kinase and response regulator are absent; *, genes encoding the two sensor kinases have been fused and the gene encoding this fused sensor kinase is genetically linked to the response regulator; ^, one of the two sensor kinase genes is absent and the gene encoding the other kinase is genetically fused to the gene encoding the response regulator.

^b *pdtaR* and *pdtaS* are not genetically linked but are present in all genomes listed.

Parmi les systèmes à deux composants impliqués dans la virulence de *M. tuberculosis* figure le système PhoPR, composé du régulateur PhoP et de l'histidine kinase PhoR. Il a en effet été montré qu'un mutant PhoP de H37Rv entraîne une croissance atténuée dans les macrophages murins et humains et chez la souris [56]. PhoPR régule directement ou indirectement plus de 80 gènes, dont l'opéron *espACD* nécessaire à la sécrétion du facteur de virulence majeur EsxA, mais aussi des gènes codant pour des lipides de surface, comme les sulfoglycolipides ou les di et poly-acyltréhaloses [57]. Par ailleurs, l'atténuation de la virulence de la souche de référence H37Ra serait liée à une mutation ponctuelle S219L dans la région de liaison à l'ADN en C-terminal du régulateur PhoP [58]. De plus, des mutations présentes dans le senseur PhoR chez

M. canettii entraînent une moindre virulence de la souche dans les modèles macrophage et murin par rapport à H37Rv [57].

En dehors des systèmes à deux composants, *M. tuberculosis* s'adapte aux variations environnementales en modulant la transcription de gènes grâce à des régulateurs appelés les facteurs sigma [59]. Ce sont de petites sous-unités de l'ARN polymérase nécessaires à la reconnaissance spécifique du promoteur par celle-ci. Tous les génomes bactériens codent pour au moins un facteur sigma primaire, qui permet à l'ARN polymérase de reconnaître les promoteurs des gènes de ménage. En réponse à divers stimuli, d'autres facteurs sigma dits alternatifs activés entrent en compétition avec le facteur sigma primaire pour former un complexe avec l'ARN polymérase et réguler la transcription de gènes spécifiques. Deux familles de facteurs sigma existent chez les bactéries : σ^{70} et σ^{54} . On retrouve uniquement des facteurs sigma σ^{70} chez les mycobactéries. Ces facteurs sigma ont quatre régions conservées principales : la région 1 inhibe la liaison de l'ADN des facteurs sigma libres, les régions 2 et 3 sont impliquées dans la reconnaissance de la séquence consensus -10 et la région 4 dans la reconnaissance de la séquence consensus -35. Les facteurs sigma peuvent être classés en quatre groupes. Le groupe 1 correspond aux facteurs sigma primaires qui assurent la transcription des gènes de ménage. Le groupe 2 rassemble les facteurs sigma primaire-like, dont la structure est similaire aux membres du groupe 1 mais qui ne sont pas essentiels. Les facteurs sigma du groupe 3 ne comportent pas la région 1 et ceux du groupe 4, aussi appelés ECF (extracellular function), les régions 1 et 3. Les facteurs σ peuvent être régulés à différents niveaux : (i) régulation transcriptionnelle, (ii) régulation post-transcriptionnelle avec des petits ARN non codants, (iii) régulation de la traduction, (iv) régulation post-traduction, liée en général aux facteurs anti- σ qui se lient spécifiquement aux facteurs σ et empêchent l'interaction avec l'ARN polymérase, des signaux environnementaux spécifiques viennent ensuite rompre cette interaction, il existe aussi des facteurs anti-anti- σ . Le génome de *M. tuberculosis* comporte 13

facteurs sigma et la densité de facteurs sigma alternatifs est de 2,8 (nombre de facteurs sigma alternatifs/Mb), ce qui en fait le pathogène avec la densité la plus élevée. Parmi ces 13 facteurs sigma, σ^A appartient au groupe 1 et est le seul facteur sigma essentiel. σ^B appartient au groupe 2, σ^F au groupe 3 et les 10 autres (σ^C , σ^D , σ^E , σ^G , σ^H , σ^I , σ^J , σ^K , σ^L et σ^M) au groupe 4. A partir d'un modèle chez *E. coli*, Chauhan *et al.* proposent un réseau complexe d'interactions entre les facteurs σ (Figure 17) [60].

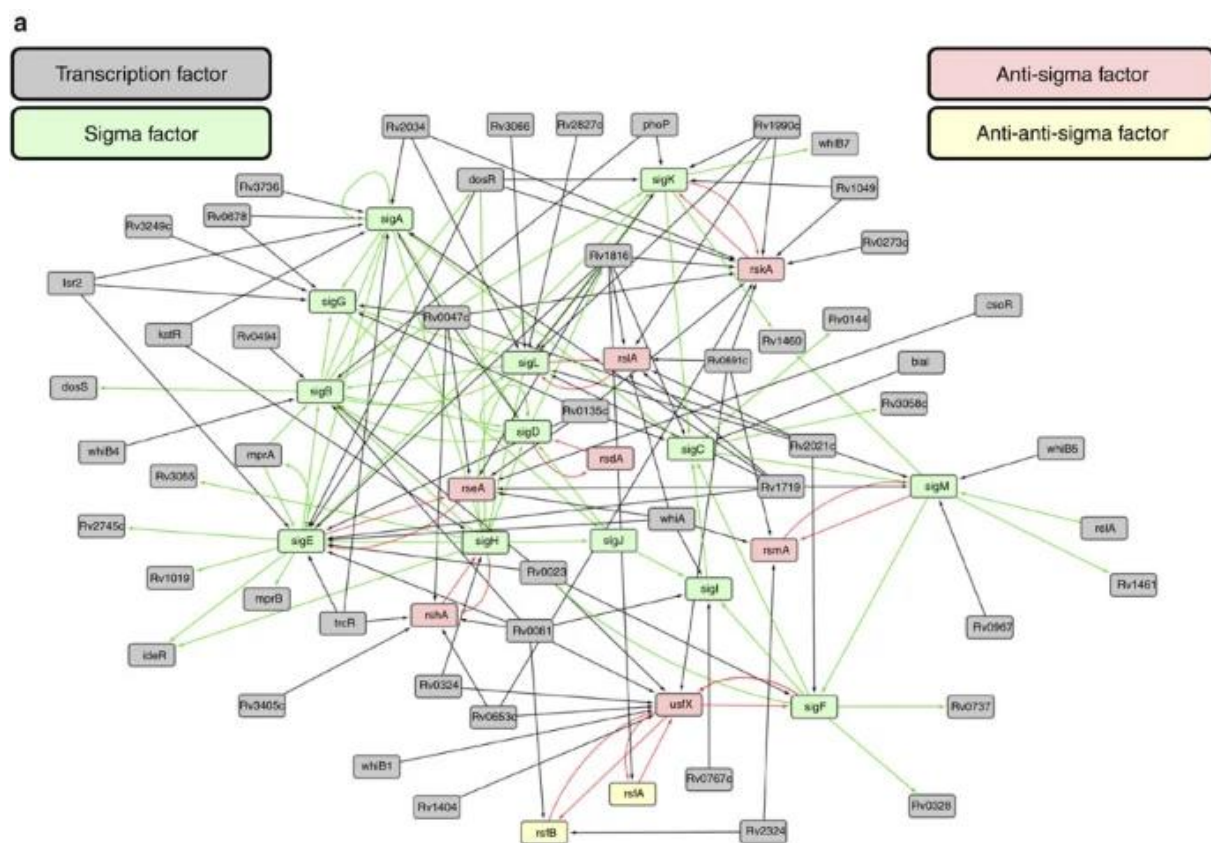


Figure 17. Réseau d'interactions des facteurs σ chez *M. tuberculosis* [ref : 60]

SigE, qui fait partie de la famille des facteurs sigma ECF, est l'un des facteurs sigma les mieux caractérisés chez *M. tuberculosis*. Un mutant *sigE* chez *M. tuberculosis* n'est pas capable de bloquer la maturation du phagosome dans des macrophages humains, apparaît plus sensible à l'activité bactéricide de macrophages murins activés et est sévèrement atténué chez la souris et le cochon d'Inde [61]. Les gènes dont la transcription est contrôlée par SigE sont impliqués

dans les changements métaboliques liés au stress, dans la dégradation des acides gras, dans la synthèse des protéines membranaires et dans la stabilisation membranaire, suggérant une structure de la surface de la bactérie différente en l'absence ou en présence du gène *sigE*. La structure de la surface différente et l'absence de blocage de la maturation du phagosome en l'absence du gène *sigE* suggèrent également des propriétés immunogéniques différentes par rapport à la souche sauvage.

1.9.5. Les protéines PE/PPE

En 1998, le séquençage du génome complet de *M. tuberculosis* met en évidence la présence de gènes classés en deux familles correspondant à environ 7 à 8% du génome total et à 10% du génome codant [33]. Ces protéines sont appelées PE et PPE en raison de motifs conservés Pro-Glu (PE) ou Pro-Pro-Glu (PPE) situés dans les dix premiers acides aminés en N-terminal [62]. La connaissance de ces protéines a été freinée par des difficultés techniques, notamment l'alignement des reads aux génomes de référence gêné par un contenu élevé en *gc*, des séquences répétitives et des duplications, expliquant leur exclusion fréquente des algorithmes de bioinformatique. Des méthodes émergentes, comme le séquençage long-read, ont permis de contourner ces difficultés et approfondir la connaissance de ces protéines [63]. Le génome de *M. tuberculosis* H37Rv comporte 100 *pe* et 69 *ppe* gènes appartenant aux familles correspondantes et subdivisées en sous-familles selon la séquence d'acides aminés en C-terminal [62]. Les 100 protéines de la famille PE possèdent en commun un domaine N-terminal conservé d'environ 100 acides aminés qui forme une structure hélice-tour-hélice et un signal de sécrétion conservé en C-terminal YxxxD/E de type VII (Figure 18) [63]. Ce signal est nécessaire à la sécrétion de ces protéines et pourrait être impliqué dans la reconnaissance des substrats par les systèmes de sécrétion de type VII. Les protéines PE sont divisées en sous-familles PE et PE_PGRS [62]. Les protéines PE_PGRS (polymorphic gc-rich sequences) sont

caractérisées par la présence d'un domaine polymorphe riche en répétitions Gly-Gly-Ala/Gly-Gly-Asn qui peut varier en termes de séquence et de taille. Les gènes *pe_pgrs* sont dispersés dans le génome et la plupart ne sont pas co-transcrits avec d'autres gènes. A l'inverse, la plupart des gènes *pe* sont adjacents à des gènes *ppe* et sont co-transcrits avec un certain nombre de protéines codées par ces gènes qui sont sécrétées sous forme d'hétérodimères via des interactions hydrophobiques avec les trois hélices alpha en N-terminal des protéines PPE, rappelant les hétérodimères formés par les protéines Esx tels que EsxA-EsxB (Figure 18). Certaines protéines PE possèdent un domaine C-terminal unique et ne font pas partie de la sous-famille PE_PGRS ou celle des dimères PE/PPE ; ces protéines sont classées en PE unique.

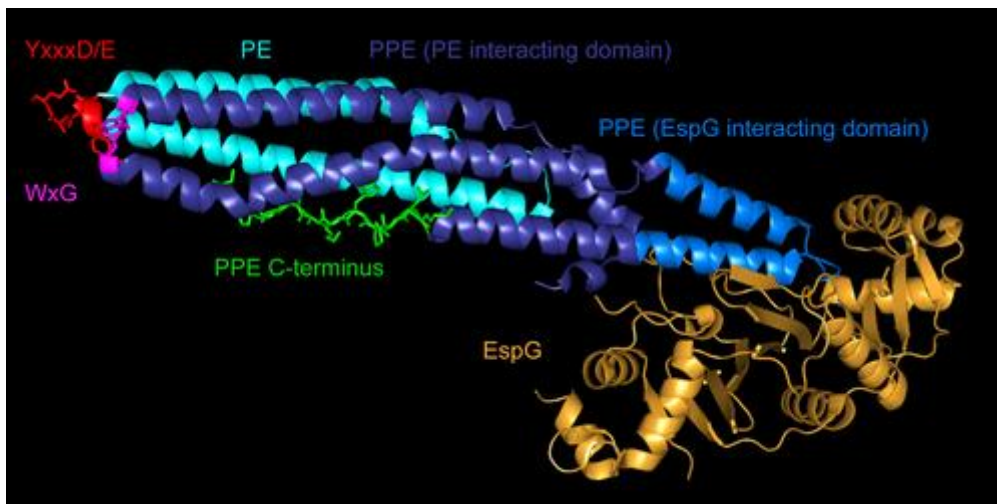


Figure 18. Structure du complexe EspG5-PPE41-PE25 [ref : 63]. La protéine chaperone EspG se lie au domaine de liaison de EspG de la protéine PPE, conférant une spécificité du système de sécrétion de type VII. Le reste de la protéine PPE interagit avec son partenaire PE via des liaisons hydrophobiques.

Les 69 protéines PPE sont caractérisées par la présence d'un domaine conservé N-terminal de 180 acides aminés environ [62]. Un motif conservé WxG est présent entre la deuxième et la troisième hélice alpha de toutes les protéines PPE mais celles-ci ne contiennent pas de signal de sécrétion YxxxD/E. Les hélices 4 et 5 des protéines PPE n'interagissent pas avec le partenaire PE mais avec une protéine chaperonne cytosolique EspG, qui confère une spécificité du système de sécrétion [63]. Certaines protéines PPE ne sont pas couplées à une protéine PE

et les gènes codant pour ces protéines sont dispersés dans le génome [62]. On distingue le groupe PPE-SVP (Ser-Val-Pro) avec la séquence d'acides aminés SVP conservée en C-terminal et le groupe PPE-MPTR (major polymorphic tandem repeat) présentant des répétitions en C-terminal du motif Asn-X-Gly-X-Gly-Asn-X-Gly [63]. ESX-5 serait responsable de la sécrétion de la majorité des protéines PE et PPE [64].

Il a été rapporté que les protéines PE_PGRS auraient un rôle dans la pathogénicité de *M. tuberculosis*, en inhibant par exemple l'autophagie ou la présentation d'antigènes (Figure 19) [65]. Cependant, il a aussi été décrit que des souches cliniques virulentes, notamment celles de la lignée L2 moderne, ne sécrètent pas de protéines PE_PGRS et PPE_MPTR en raison d'une insertion d'IS6110 dans le locus *ppe38* [63]. Le fait que les études soient basées essentiellement sur des délétions uniques de gènes *pe_pgrs* ce qui est différent d'un blocage de sécrétion suggère que le rôle de ces protéines ne serait pas dépendant de leur sécrétion et serait donc indépendant de leur interaction avec l'hôte.

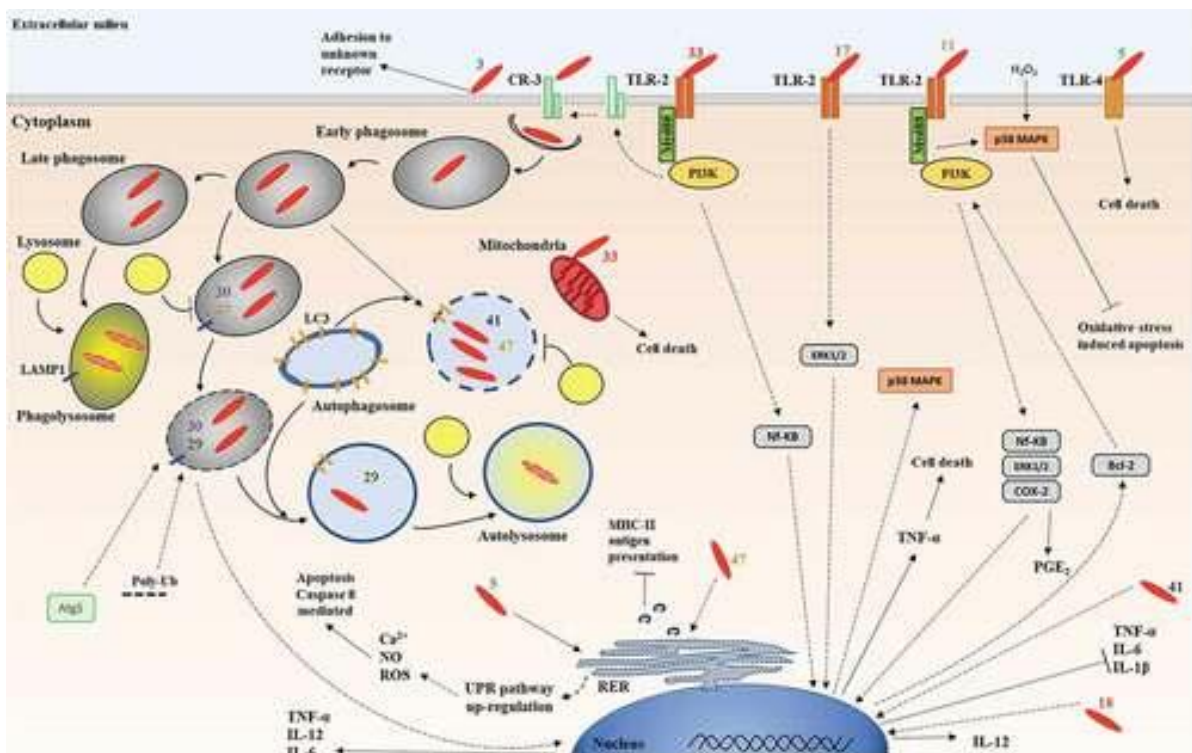


Figure 19. Représentation schématique de la pathogénicité de *M. tuberculosis* au niveau cellulaire impliquant les protéines PE_PGRS [ref : 65]. Le chiffre à côté du bacille représenté en rouge correspond à la protéine PE_PGRS.

Tableau 3. Principaux facteurs de virulence chez *M. tuberculosis*

Facteurs de virulence		Rôle des facteurs de virulence	Références
Systèmes de sécrétion de type VII et autres protéines de la paroi cellulaire	Systèmes de sécrétion de type VII ou ESX	ESX-1 permet via ESAT-6 la rupture du phagosome et la translocation du bacille dans le phagosome	[45]
	Complexe Ag85	Ag85A, Ag85B et Ag85C, localisés à la surface de la mycobactérie, jouent un rôle dans la réponse immune	[48]
	Protéines de la famille Mce	Les protéines de la famille Mce sont impliquées dans l'invasion et la persistance de <i>M. tuberculosis</i> dans les cellules de l'hôte	[49,50]
Lipides de surface	PcaA	PcaA participe au blocage de la fusion phagosome-lysosome et stimule la sécrétion de TNF au cours de l'infection des macrophages	[34]
	KasB	Lorsque KasB est inhibé, la croissance et la virulence de <i>M. tuberculosis</i> sont plus faibles dans le modèle murin	[34]
	PIM, LM et LAM	PIM, LM et LAM ont la capacité de diminuer la présentation des antigènes MHC de classe II, donc d'éviter l'élimination par les cellules T	[34]
	PDIM	PDIM ont la capacité de masquer les motifs de l'enveloppe cellulaire, entraînant le recrutement de macrophages naïfs ; ils favorisent aussi la rupture du phagosome et induisent la réponse interféron de type I	[10,34]
	ManLAM	ManLAM inhibent la production de cytokines pro-inflammatoires, la maturation du phagosome, l'apoptose et l'autophagie	[51]
Protéines impliquées dans la réponse au stress nitro-oxydatif, l'arrêt de la maturation du phagosome et la résistance au pH acide	DosR/S/T	Le régulon Dos permet un changement du métabolisme de <i>M. tuberculosis</i> vers l'état de persistance en réponse à l'environnement redox	[52]
	KatG	KatG participe à la détoxification des ROI	[53]
	SodA et SodC	Les superoxide dismutases SodA et SodC participent à la détoxification des ROI	[53]
	CysH	La délétion de <i>cysH</i> , qui intervient dans la synthèse du mycothiol, atténue la virulence de <i>M. tuberculosis</i> chez des souris immunocompétentes	[53]
Régulateurs d'expression génique	Systèmes à deux composants dont PhoPR	Un mutant PhoP de H37Rv entraîne une croissance atténuée dans les macrophages murins et humains et chez la souris	[56]
	Facteurs sigma dont SigE	Un mutant <i>sigE</i> chez <i>M. tuberculosis</i> n'est pas capable de bloquer la maturation du phagosome dans des macrophages humains, apparaît plus sensible à l'activité bactéricide de macrophages murins activés et est atténué chez la souris et le cochon d'Inde	[61]
Protéines PE/PPE	Protéines PE PGRS	Les protéines PE PGRS inhiberaient l'autophagie et la présentation d'Ag	[65]

2. Le complexe clonal 100-32

2.1. Méthodes de génotypage chez *M. tuberculosis* et évolution de la bactérie

Apparue au début des années 1990, la technique RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) est devenue la première technique de référence pour typer *M. tuberculosis* et a permis d'identifier des chaînes de transmission, différencier une rechute d'une nouvelle infection et mettre en évidence des contaminations de laboratoire. Le principe repose sur la digestion enzymatique de l'ADN chromosomique ; les fragments obtenus sont ensuite séparés les uns des autres par électrophorèse sur gel d'agarose, transférés sur membrane de nylon puis révélés par une sonde spécifique de la séquence d'insertion. La méthode la plus efficace est celle ciblant la séquence d'insertion IS6110, habituellement présente en plusieurs copies dans le chromosome [66]. Les inconvénients de la technique sont une mauvaise reproductibilité inter-laboratoire, la nécessité de travailler avec une quantité importante d'ADN génomique de qualité et l'obligation d'avoir un nombre élevé de copies d'IS6110 pour un pouvoir discriminant suffisant [67].

Ensuite sont apparues les méthodes basées sur une PCR. Le « spoligotyping » étudie le locus DR (direct repeat) du complexe *M. tuberculosis*. Ce locus est une succession de DRs, composées d'une séquence bien conservée de 36 pb et de 43 séquences uniques de 35 à 41 pb appelées « spacers » [68,69]. Les souches peuvent être différenciées entre elles selon la présence/absence des « spacers », qui permet de déterminer un code binaire et un code octal (Figure 20) [69]. La méthode est moins discriminante que RFLP IS6110 lorsque le nombre de copies de la séquence d'insertion est élevé ; cependant le locus est toujours présent, ce qui n'est pas le cas d'IS6110.

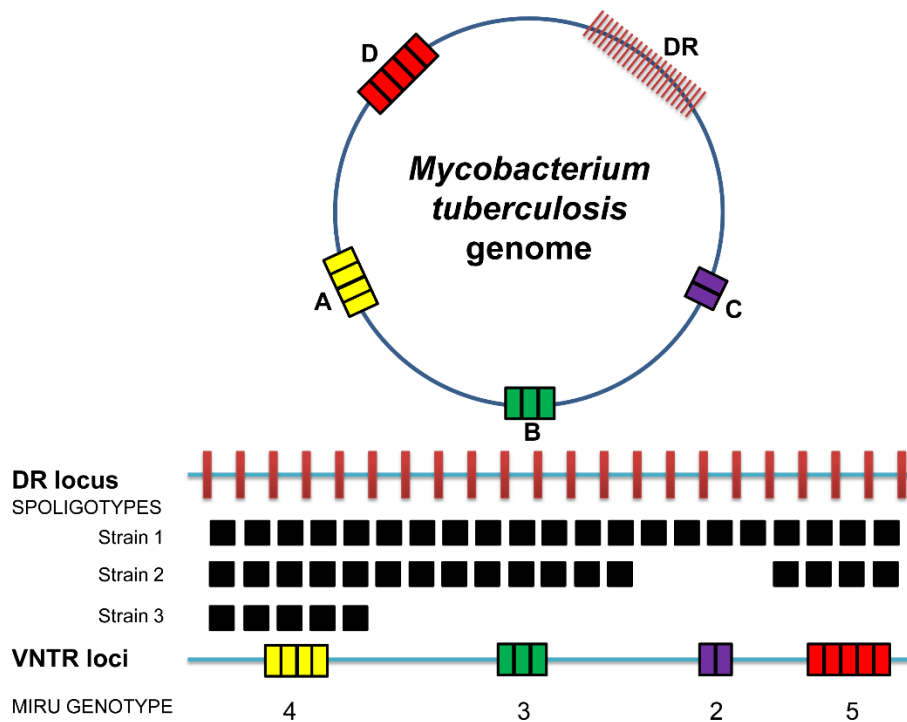


Figure 21. Schéma illustrant les deux méthodes de génotypage spoligotyping et MIRU-VNTR [ref : 70]

Cependant, le WGS reste le seul outil qui permet de différencier les souches de MTBC de façon robuste puisqu'il s'agit de la méthode la plus discriminante. L'analyse est maintenant peu coûteuse et bien répandue. En moyenne, 2 souches adaptées à l'homme diffèrent de 1200 SNP (Single Nucleotide Polymorphism) environ, ce qui correspond à 0,03% du génome en excluant les régions de séquences répétées. La lignée 1 présente la plus grande diversité avec 730 SNP en moyenne entre 2 souches appartenant à cette lignée. La distance moyenne la plus faible est observée pour la lignée 7 avec seulement 230 SNP. En termes de diversité entre les lignées, les souches appartenant aux lignées modernes 2-4 diffèrent de 970 SNP en moyenne. Les souches appartenant aux lignées ancestrales 1, 5 et 6 sont distantes entre elles de 1500 SNP en moyenne [72] (Figure 22).

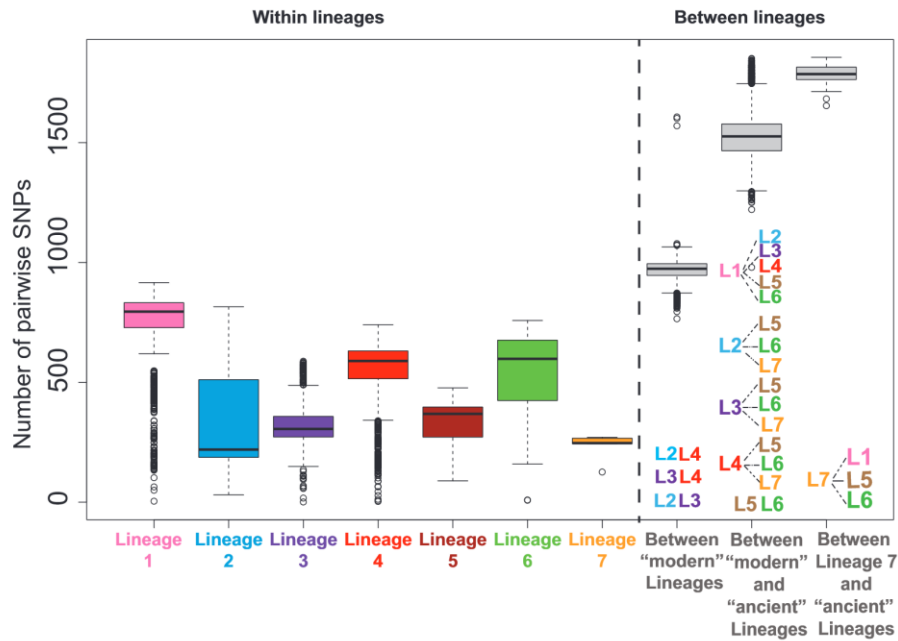


Figure 22. Nombre de différences en comparaison par paires entre des souches de MTBC [ref : 72]

2.2. Evolution du complexe *M. tuberculosis*

A plus grande échelle, il est possible de différencier les souches selon les lignées en amplifiant et séquençant plusieurs gènes structuraux dont le choix varie selon les études puis en étudiant leurs polymorphismes. Par exemple, Coll *et al.* proposent une approche basée sur un code composé de 62 SNP situés dans des gènes essentiels et qui entraînent des mutations synonymes, donc moins susceptibles d'être soumis à une pression sélective ; les 62 SNP permettent de différencier les 7 lignées et 55 sous-lignées [73].

Grâce à l'étude comparative des génomes, des régions variables correspondant à des délétions ou des insertions ont été mises en évidence. Environ une vingtaine de régions, appelées régions de différence (RD), ont permis d'imaginer un scénario d'évolution différent du premier selon lequel les souches isolées chez l'homme dériveraient de *M. bovis* (Figure 23) [40]. *M. canettii* (rare, phénotype lisse, isolé dans la corne de l'Afrique, berceau de l'humanité) et les souches ancestrales ne présentent aucun de ces événements (insertions/délétions) et semblent donc être

les descendants du bacille tuberculeux. L'ancêtre commun ressemblerait à *M. tuberculosis* ou *M. canettii* et serait ainsi un pathogène humain au départ. Une délétion, TbD1, différencie les souches « modernes » des souches ancestrales de *M. tuberculosis*.

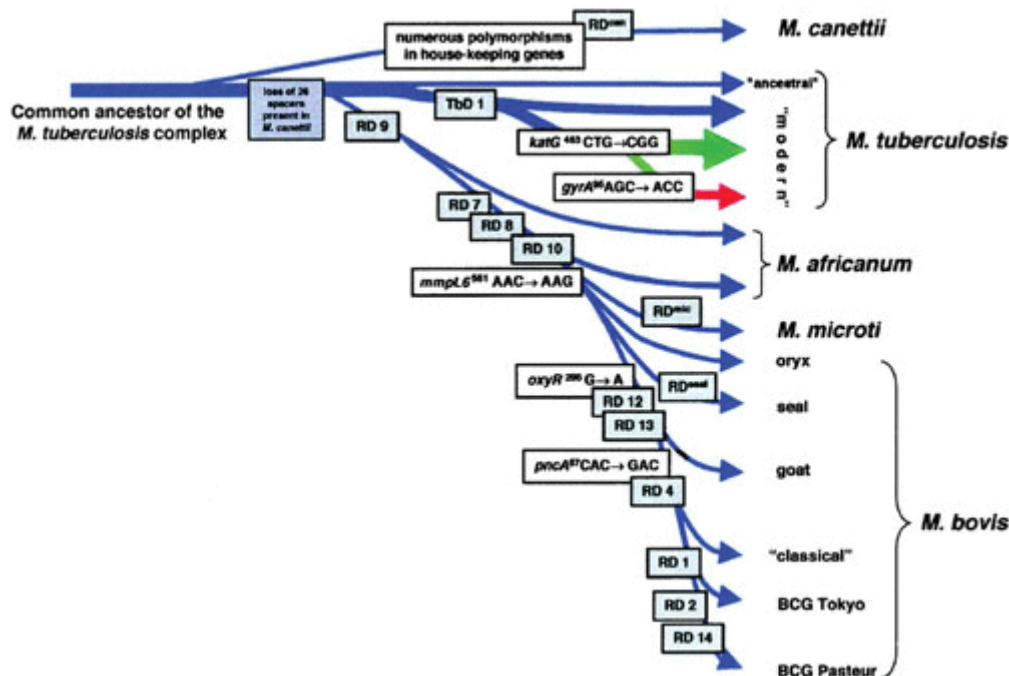


Figure 23. Schéma de l'évolution supposée du bacille tuberculeux. Le schéma comporte la présence ou l'absence de régions conservées et de polymorphismes dans 5 gènes. [ref : 40]

En combinant plusieurs méthodes de génotypage, les souches de *M. tuberculosis* peuvent être classées en différents clades dont le nom est basé sur la prévalence et le lieu géographique initial ; certains présentent cependant une diffusion plus large que les autres, en particulier ceux appartenant aux lignées 2 et 4 (Tableau 4). Les clades (ou familles) les plus importants parmi les lignées « modernes » sont Beijing (lignée 2 ; « East-Asian »), CAS (lignée 3 ; « East African-Indian »), Haarlem, X et LAM (lignée 4 ; « Euro-American »). Les lignées « anciennes » sont composées de *M. africanum* ou West Africa I et II (lignées 5 et 6) et de la lignée 1 (« Indo-Oceanic »). Trois autres lignées ont été décrites plus récemment (L7-9) [74–76]. Les 9 lignées sont retrouvées en Afrique (1 ou 2 lignées pour les autres régions), suggérant

une origine et une évolution du bacille tuberculeux à partir de cette région avec diverses lignées qui se seraient adaptées aux populations humaines au gré des migrations [77].

Tableau 4. Correspondance des souches du complexe *M. tuberculosis* selon les différentes méthodes de génotypage [67]

Evolutionary age (species)	Lineage name based on LSP/SNP ^a		Lineage and sublineage [RD associated]			Spoligotype family					
Ancient lineage (<i>M. tuberculosis</i>)	Indo-Oceanic lineage	1 [RD239]	1.1	1.1.1		EAI4 and EAI5					
				1.1.2	1111	EAI4					
				1.1.3		EAI5 and EAI3					
				1.2	1.2.1		EAI6				
					1.2.2		EAI2				
							EAI1				
							MANU ancestor and orphan profile				
				Modern lineages (<i>M. tuberculosis</i>)	East-Asian lineage	2	2.1 (non-Beijing)	2.2.1 [RD181]		Beijing	
								2.2 (Beijing) [RD105, RD207]		Beijing	
									2.2.1.1 [RD150]		Beijing
	2.2.1.2 [RD142]		CAS except CAS1-Delhi								
	2.2.2		CAS1-Kili								
East African-Indian lineage	3 [RD750]	3.1	3.1.1						CAS2		
			3.1.2					3.1.2.1		CAS	
								3.1.2.2		X2	
			4.1					4.1.1 (X-type)	4.1.1.1 [RD183]		X1
									4.1.1.2		X3 and X1
					4.1.1.3 [RD193]		T1 and H1				
					4.1.2	4.1.2.1 (Haarlem) [RD182]		T1 and H1			
			Euro-American lineage		4	4.2	4.2.1 (Ural)		H3 and H4		
							4.2.2		LAM7-TUR and T1		
								4.2.2.1 (TUR) [RD182]		LAM7-TUR	
4.3 (LAM)	4.3.1						LAM9				
	4.3.2	4.3.2.1 [RD761]						LAM3			
	4.3.3 [RD115]						LAM3				
	4.3.4 [RD174]	4.3.4.1						LAM9 and T5			
		4.3.4.2						LAM1			
				4.3.4.2.1			LAM11-ZWE, LAM9, LAM1, and LAM4				
				LAM11-ZWE							
Ancient lineages (<i>M. africanum</i>)	West-Africa lineage 1	5 [RD711]	4.4	4.4.1	4.4.1.1 (S-type)	S					
					4.4.1.2		T1				
							T1 and T2				
				4.5 [RD122]				H3, H4, and T1			
								T2-Uganda			
				4.6	4.6.1 (Uganda) [RD724]	4.6.1.1					
					4.6.2 [RD726]	4.6.1.2		T2			
						4.6.2.1		T3			
						4.6.2.2		LAM10-CAM			
						(Cameroon)					
Ancient lineages (<i>M. africanum</i>)	West-Africa lineage 2	6 [RD702]	4.7			T1 and T5					
						T1, T2, T3, T4 and T5					
Intermediary lineage (<i>M. tuberculosis</i>)	Lineage 7	7	4.8 [RD219]			T1					
						AFRI_2 and AFRI_3					
			4.9 (H37Rv-like)			AFRI_1					

^aRegions of deletion (RD) are given in brackets and appear below the lineage/sublineage in which they are present. Synthetic table adapted from Coll et al. [86].
^bLSP, large sequence polymorphism.

Selon des données génomiques, les lignées animales ont émergé à partir d'un ancêtre commun relié à la lignée 6 (Figure 24). Ces génomes sont particulièrement intéressants car les gènes qui

subissent une pseudogénéralisation ou disparaissent suggèrent une spécificité de l'hôte, notamment ici *H. sapiens*. Par exemple, la région RD1 est absente chez *M. microti* et *M. mungi*. Cette évolution convergente semble ainsi indiquer le rôle clé du système de sécrétion ESX-1 pour infecter *H. sapiens*. Les souches de la lignée 6 ont en commun avec les lignées animales, l'absence des régions RD9 et RD8 [78]. Associé à la région RD9 absente, on trouve des mutations dans la région qui code pour le système à deux composants PhoP/PhoR précédemment décrit, qui régule plus d'une centaine de gènes dont de nombreux gènes impliqués dans la virulence. Ces mutations correspondent à un changement de codon ggt en att dans le senseur PhoR présent avant l'embranchement avec la lignée 5 et à une mutation dans le promoteur de PhoP (-48 g en a) identifiée dans les souches de la lignée 6 et des lignées animales. En changeant les allèles *phoP/R* entre *M. tuberculosis* et *M. bovis*, il a été montré que ces mutations entraînent une plus faible production de lipides des familles polyacyltréhalose et sulfolipides ainsi qu'une diminution de la sécrétion des substrats EsxA et EsxB. Cet effet est lié à la régulation par PhoP/R de EspR, Lsr2 et du système à deux composants MprA/B sur l'expression des protéines du système ESX-1, EspA et EspC, dont la sécrétion est dépendante de celle de EsxA et EsxB. Cependant, cette régulation est modifiée pour les souches de la lignée 6 et des lignées animales avec la région RD8 absente, située en amont de l'opéron *espACD*, qui contient plusieurs sites de liaison à des régulateurs transcriptionnels. L'absence de la région RD8 permet ainsi la sécrétion de EsxA/B malgré l'activité fortement réduite de PhoP/R, ce qui peut être une explication au succès de l'infection chez d'autres hôtes que l'homme.

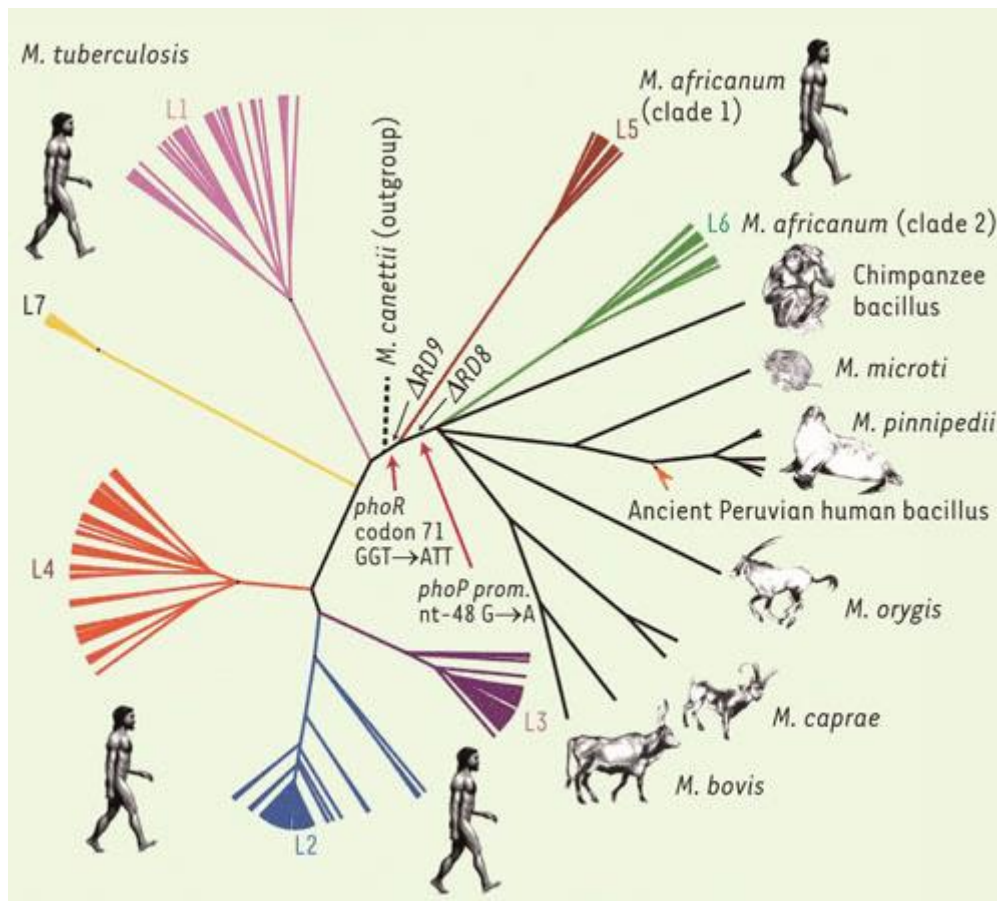


Figure 24. Phylogénie basée sur le génome de 261 souches appartenant au complexe *M. tuberculosis*. Les délétions des souches de la lignée 6 et des lignées animales sont notées, ainsi que les mutations du facteur de virulence *PhoPR* [ref : 67].

2.3. La diffusion du complexe clonal 100-32

En 2021, le nombre estimé de personnes atteintes de tuberculose dans le monde était de 10,6 millions, soit une augmentation de 4,5% par rapport à 2020 (10,1 millions), en lien avec la pandémie COVID [5]. La part de tuberculose résistante semble également avoir augmenté entre 2020 et 2021 avec 450 000 nouveaux cas estimés de TB résistante à la rifampicine [5]. Ce chiffre est inquiétant puisque les chances de guérison sont moindres dans les cas de tuberculose résistants à la rifampicine ou MDR (multirésistants, c'est-à-dire à la fois résistants à la rifampicine et à l'isoniazide) (60%) par rapport à une tuberculose multisensible (86%) [5]. Des taux élevés de tuberculose MDR sont observés particulièrement en Europe de l'Est : par

exemple, Turkménistan (46,4% de cas confirmés de résistance à la rifampicine), Biélorussie (37,8%), Kazakhstan (37,7%) et Russie (36,0%) [6].

Certains auteurs attribuent les taux élevés de tuberculose MDR à des raisons environnementales, en particulier au fait qu'un grand nombre de cas de tuberculose sont diagnostiqués en prison alors que le taux de détention est très élevé en Russie [79,80]. La surpopulation, une ventilation inadaptée et des longues périodes d'incarcération faciliteraient la transmission. Une mauvaise adhésion du patient au traitement pendant et après la période de détention et les perdus de vue après libération favoriseraient ensuite la transmission au sein de la population générale. Dans une étude récente menée en Géorgie, les auteurs ont montré que 63% des cas de TB MDR étaient dus à une transmission inter-patient et que les mutations compensatoires et l'incarcération étaient associés de façon indépendante à la transmission [81].

Cependant, la diversité génotypique des souches pourrait avoir, elle aussi, un impact sur l'évolution de la maladie, mais également sur la capacité de transmission. Il a été démontré dans des modèles expérimentaux et dans des études cliniques que des souches appartenant à différentes lignées varient en termes de virulence et d'immunogénicité [72,82]. Notamment, les lignées 2 et 4 qui ont le plus diffusé à travers le monde présentent une plus grande virulence qui est associée à une réponse immunitaire pro-inflammatoire de l'hôte diminuée ou retardée, une sévérité de la maladie plus marquée et une transmission inter-patient favorisée. Une plus grande transmissibilité des souches appartenant à la lignée 2 et 4 est de plus suggérée par une faible distance entre les souches en termes de SNP au sein d'une même lignée [83]. Dans un travail incluant 679 souches de *M. tuberculosis* isolées à la fin des années 1990 aux Etats-Unis, il a été observé que les patients infectés par une souche de la lignée 2 ont trois fois plus de risque d'avoir une localisation extra-thoracique que les patients infectés par une souche qui n'appartient pas à la lignée 2 [84]. D'autre part, il existe une association entre certaines souches en particulier celles de la lignée 2 et la multirésistance. Deux hypothèses sont envisageables :

la première serait que ces souches présentent un taux de mutation plus élevé [85], la seconde serait qu'elles ont une plus grande capacité à faire face aux changements physiologiques engendrés par les mutations de résistance [86].

Parmi les souches MDR isolées en Europe et en Russie, un grand nombre appartiennent au clade Beijing (lignée 2) dont certaines au clone W148 [87]. On trouve plusieurs appellations dans la littérature de ce clone : W148, B0/W148, complexe clonal (CC) 100-32 ou « clone russe ». L'appellation B0/W148 (ou W148) ou CC 100-32 dépend de la méthode de génotypage utilisée : respectivement, RFLP *IS6110* ou MIRU-VNTR. La plupart des souches appartenant au clone B0/W148 (double bande caractéristique à 7,1 kb et 9,2 kb dans la partie supérieure du profil RFLP) présentent le code MIRU-VNTR à 24 loci 244233352644425173353723 avec les 3 loci hypervariables, respectivement 14, 14 et 10 copies, mais il en existe d'autres, plus rarement décrits. Selon la base de données internationale MIRU-VNTRplus (<http://www.miru-vntrplus.org/>), celui-ci correspond au code MLVA *Mtbc* 15-9 100-32.

Dans une revue consacrée au clone B0/W148 publiée en 2013, Igor Mokrousov a répertorié 63 études mentionnant ce clone et rapporte qu'il représente environ un quart des souches Beijing isolées en Russie, dans les pays de l'ex-URSS et chez les émigrés russes aux Etats-Unis et en Europe, avec les taux les plus importants en Sibérie (Novosibirsk et Tuva) (Figure 25) [88].

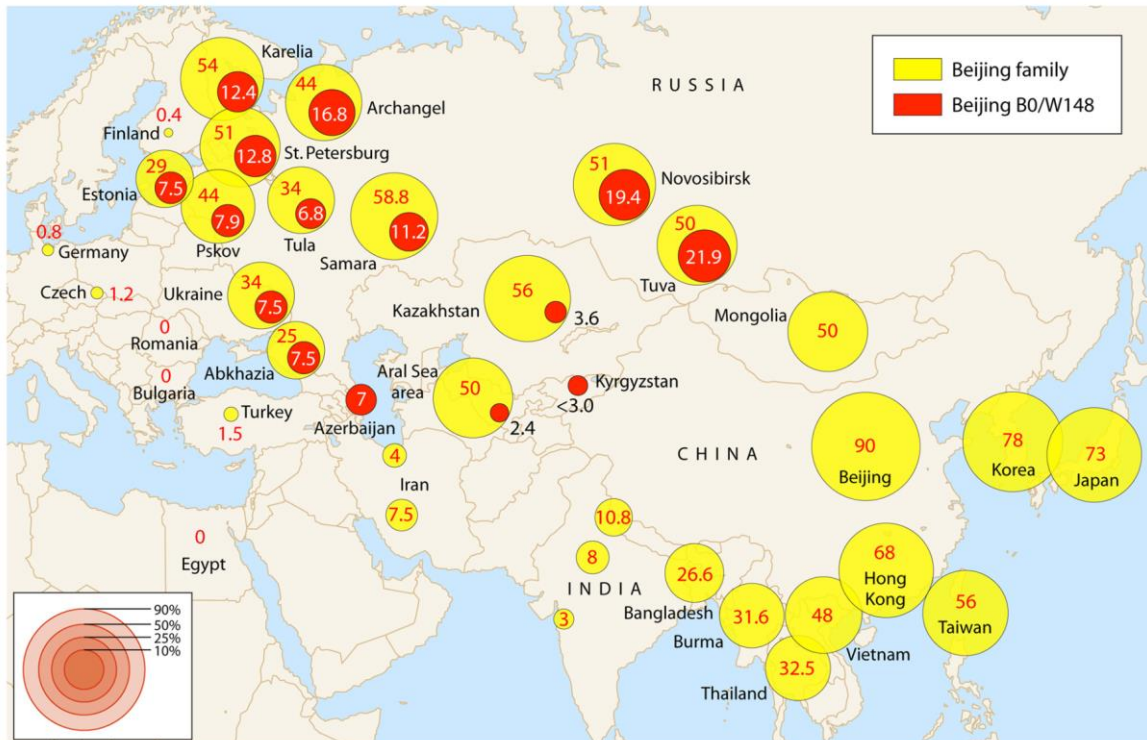


Figure 25. Distribution des souches de *M. tuberculosis* Beijing et Beijing B0/W148 (données en pourcentage ; la taille des cercles est proportionnelle aux pourcentages) [ref : 88]

En étudiant les MIRU-VNTR des souches B0/W148 de Saint-Pétersbourg (Nord-Ouest de la Russie) et celles de Novosibirsk (Ouest de la Sibérie), Mokrousov observe que les souches de Saint-Pétersbourg présentent un profil prédominant « star-like phylogeny », témoignant d'une dissémination récente, alors que les souches sibériennes sont plus diverses « chain-like phylogeny », suggérant une période d'évolution plus longue (Figure 26). Ces constats poussent à croire que l'Ouest de la Sibérie serait l'origine géographique du clone B0/W148 [88].

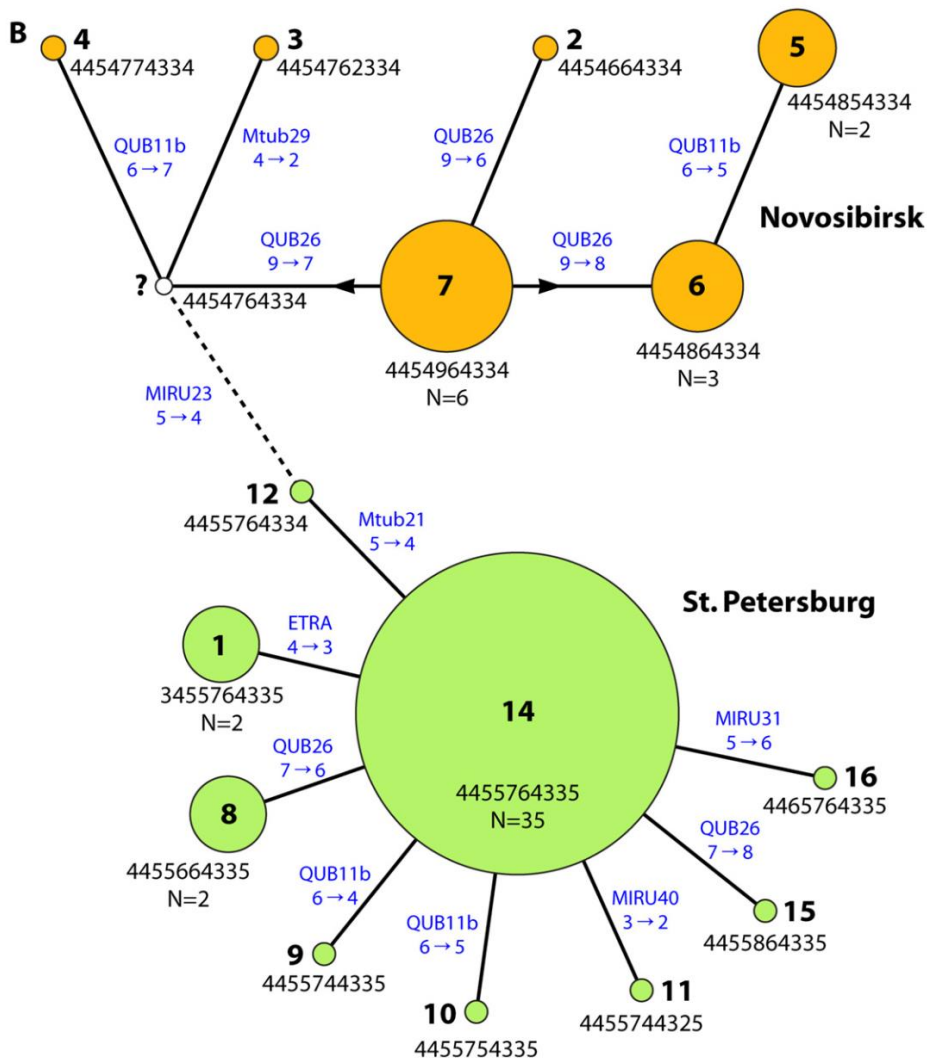


Figure 26. Minimum spanning tree des souches Beijing B0/W148 (profils 10-VNTR-locus) [ref : 88]

En analysant les mouvements de population en Russie au cours du XXème siècle en parallèle avec les taux de souches B0/W148 rapportés dans la littérature, Mokrousov fait l’hypothèse que le clone B0/W148 est apparu en Sibérie avant 1960 puis a disséminé vers la Russie proche de l’Europe et les pays de l’ex-URSS grâce aux mouvements de population de l’époque. Le clone aurait ensuite émergé de façon importante avec l’utilisation des anti-tuberculeux de première ligne dans la deuxième partie du XXème siècle grâce à sa capacité à acquérir des résistances [88]. Dans une vaste étude publiée en 2015 rassemblant 4987 souches Beijing provenant de 99 pays, Merker *et al.* montrent que le clone B0/W148 présente une des distances en termes de

SNP les plus faibles lorsqu'on compare les souches une à une parmi les sous-groupes du clade avec une moyenne de 23 SNP [89]. Par ailleurs, le sous-groupe CC2 associé au clone B0/W148 possède la proportion de souches MDR la plus élevée par rapport aux autres sous-groupes (75% ; 111/148). Une deuxième étude allemande de 2022 rassemblant 720 souches B0/W148 issues de 23 pays différents estime l'origine du clone aux alentours de 1963 grâce à l'analyse des génomes, confirmant l'hypothèse de Mokrousov [87]. Parmi 676 souches MDR (93%), 49,6% sont pré-XDR et 20,9% XDR selon l'ancienne définition OMS (avant 2021). Les auteurs établissent une association entre le succès épidémique et des mutations compensatoires ; 585 souches (86,5%) présentent une telle mutation dans au moins un des 3 gènes de l'ARN polymérase *rpoA*, *rpoB* ou le plus souvent *rpoC*.

Dans une étude de 2010 comparant des souches cliniques russes Beijing incluant le clone B0/W148 à des souches cliniques brésiliennes sporadiques également Beijing et à la souche de référence H37Rv, les auteurs observent que les souches B0/W148 poussent plus rapidement dans les macrophages humains, entraînent des taux de mort cellulaire plus élevés et induisent un bas niveau du facteur TNF alpha pro-inflammatoire et un haut niveau de IL-10 anti-inflammatoire après infection de macrophages par rapport aux souches brésiliennes et à H37Rv ; ces différentes propriétés sont considérées comme de l'hypervirulence [90]. Récemment, Fursov *et al.* ont utilisé le modèle murin C57BL/6 pour comparer l'activité de 2 souches cliniques, une appartenant au clone B0/W148 (XDR selon la définition OMS avant 2021) et l'autre au clone Beijing prédominant en Asie Centrale (MDR), à la souche de référence H37Rv [91]. Le taux de survie était plus faible pour la souche B0/W148 comparée à la souche Beijing d'Asie Centrale et H37Rv (respectivement, 10% versus 40% et 70%). La charge bacillaire dans les poumons, la rate et le foie était plus élevée pour la souche B0/W148 comparée aux deux autres souches. La réponse cytokinique pro-inflammatoire (IL-1 α , IL-6, IL-7 et IL-17) mais aussi anti-inflammatoire (IL-13) après infection avec la souche B0/W148 était

régulée négativement par rapport à H37Rv. Dans une étude incluant tous les cas de spondylodiscite tuberculeuse diagnostiqués à Saint-Petersbourg de 2008 à 2011, 30 parmi les 107 souches (28%) appartenaient au clone B0/W148, soit 2 fois plus que la prévalence de celui-ci parmi les cas de tuberculose quelque soit l'atteinte en Russie, suggérant une plus grande virulence [92].

Selon Merker *et al.*, le clone B0/W148 présente de manière spécifique 44 SNP correspondant à des mutations synonymes ou non, 7 SNP situés dans des régions intergéniques et 3 petites délétions de 1 à 3 nucléotides [89]. En particulier, on note une délétion de 2 nucléotides à la fin du gène *kdpD* entraînant une protéine de fusion KdpDE et une mutation non synonyme substituant une thréonine par une proline en position 51 dans le régulateur transcriptionnel WhiB6.

3. KdpDE

3.1. Importance du potassium chez les bactéries et son transport

Alors que le sodium est très abondant dans les milieux extracellulaires, le potassium est l'ion majoritaire dans les cellules procaryotes (entre 0,2 et 1M chez les bactéries) et eucaryotes [93]. Les raisons évoquées pour cette localisation différentielle seraient une meilleure régulation des enzymes par le potassium et le fait que des concentrations intracellulaires élevées de sodium seraient toxiques [94]. Le potassium est important pour le maintien de la turgescence et du pH intracellulaire, l'activation d'enzymes, l'expression de gènes et la régulation de réponses aux stress [95]. Plusieurs types de transporteurs ou canaux du potassium existent chez les bactéries : i) des systèmes d'absorption (Trk, Ktr et Kdp pour les principaux ; Figure 27), ii) des systèmes d'efflux et iii) des canaux [96]. Parmi les systèmes d'absorption, le système Trk existe dans un

grand nombre d'espèces bactériennes, mais aussi chez les archées. L'affinité de ce système d'expression constitutive pour le potassium est modérée tandis que la spécificité est élevée, avec probablement un symport K^+/H^+ . Chez *E. coli*, trois gènes sont nécessaires à l'activité du système Trk : *trkA*, *trkE* and *trkH*. TrkE possède un site de liaison à l'ATP et TrkH permet le passage du potassium. L'activité du système Trk nécessiterait la force proton-motrice et l'ATP. Un ion K^+ entrerait dans le système de transport en même temps qu'un proton ; l'ATP ne serait pas hydrolysé et aurait plutôt une fonction de régulation. Un système similaire Ktr, absent chez les archées, comporte deux composants : KtrA et KtrB. Ce serait un symport Na^+/K^+ pour ce système qui permettrait le transport du potassium. Le système Kdp, détaillé plus loin, possède une affinité et une spécificité élevée pour le potassium. Kdp est une pompe ATPase de type P composée de quatre sous-unités membranaires (KdpF, KdpA, KdpB et KdpC). D'autres systèmes d'absorption du potassium existent chez les bactéries comme par exemple le système Kup (anciennement TrkD). Des systèmes d'efflux du potassium sont également décrits chez les bactéries, les plus caractérisés d'entre eux chez *E. coli* sont les systèmes KefB et KefC avec un échange K^+/H^+ . Enfin, des canaux permettent également les échanges de potassium entre les milieux intra- et extracellulaire, mais ceux-ci auraient un rôle mineur. Ils s'ouvriraient lorsqu'un seuil de pression est dépassé, autorisant l'efflux non spécifique de molécules, basé sur la taille et dans une moindre mesure la charge. Trois types de canaux ont été rapportés chez *E. coli* : MscL, MscS et MscM. A noter que la structure cristallographique de MscL a été obtenue chez *M. tuberculosis*.

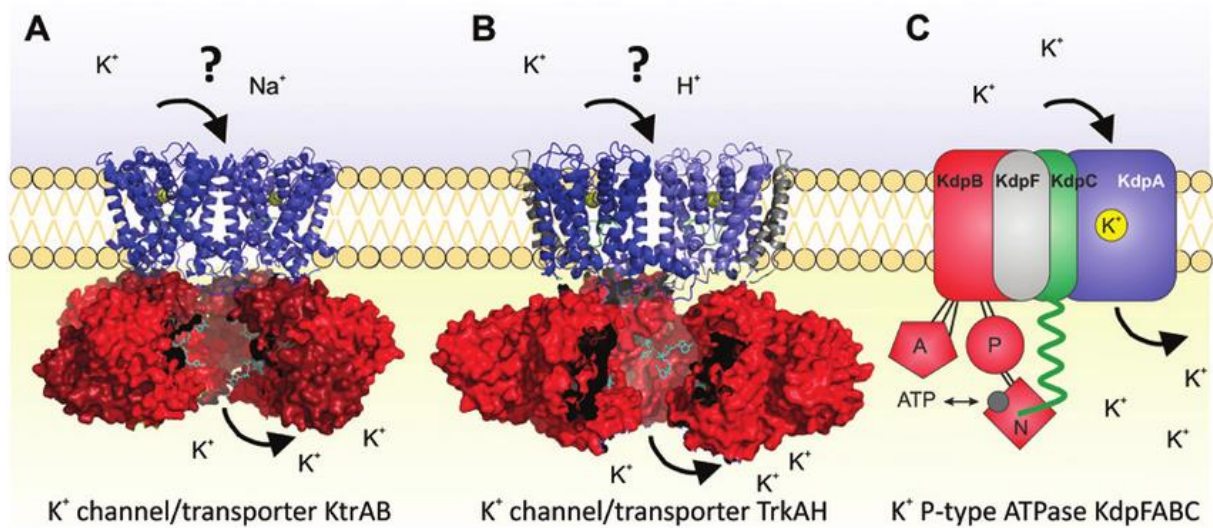


Figure 27. Schémas des systèmes de transport du potassium chez les bactéries [ref : 94]. (A) KtrB, (B) TrkH et (C) KdpA avec leurs sous-unités associées, respectivement, KtrA, TrkA et KdpFBC [94]. (A, B) Les deux sous-unités KtrB et TrkH en bleu sont liées aux ions K⁺ en jaune. Les anneaux impliqués dans la régulation en rouge sont formés par huit sous-unités KtrA et quatre sous-unités TrkA. (C) Organisation supposée du complexe KdpFABC chez *E. coli*, avec notamment KdpA pour le transport du potassium et l'ATPase KdpB.

3.2. Le système Kdp chez les bactéries en général

KdpFABC permet donc le transport du potassium et est régulé par KdpDE. KdpD perçoit trois stimuli : la concentration de potassium, l'osmolarité et la concentration d'ATP (Figure 28) [95]. D'autres stimuli ont été suggérés comme la turgescence mais restent débattus [95].

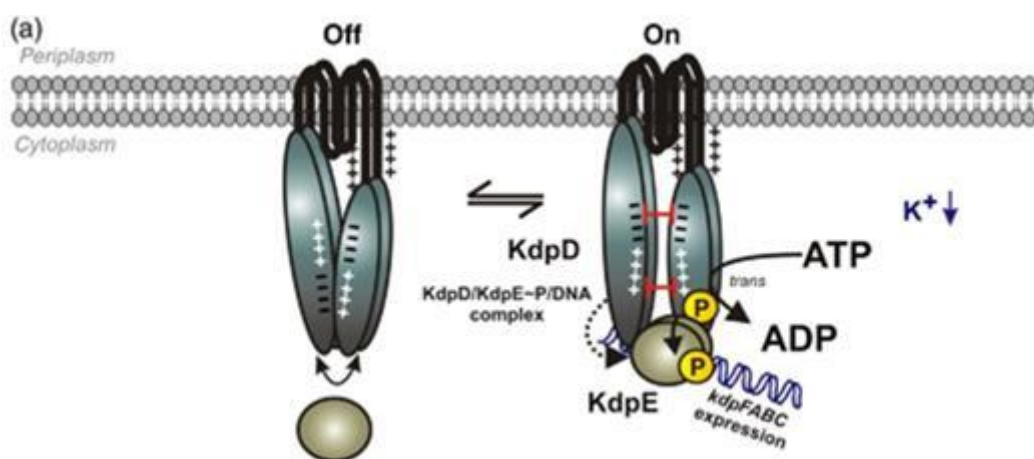


Figure 28. Schéma du signal KdpD/KdpE [ref : 95]

Le complexe KdpFABC comporte entre autres une pompe ATPase de type P (KdpB). Il existe en effet trois types d'ATPases : F, V et P [93]. Les ATPases de type P sont les plus répandues et sont définies par la phosphorylation d'un acide aspartique conservé. Les quatre sous-unités KdpF, KdpA, KdpB et KdpC comportent une ou plusieurs hélices transmembranaires qui ancrent solidement le complexe à la membrane. A partir de la structure cristallographique chez *E. coli* et des données de cryo-microscopie électronique, Pedersen *et al.* proposent deux scénarios : le passage du potassium seulement dans KdpA ou bien dans KdpA puis KdpB (Figure 29) [93].

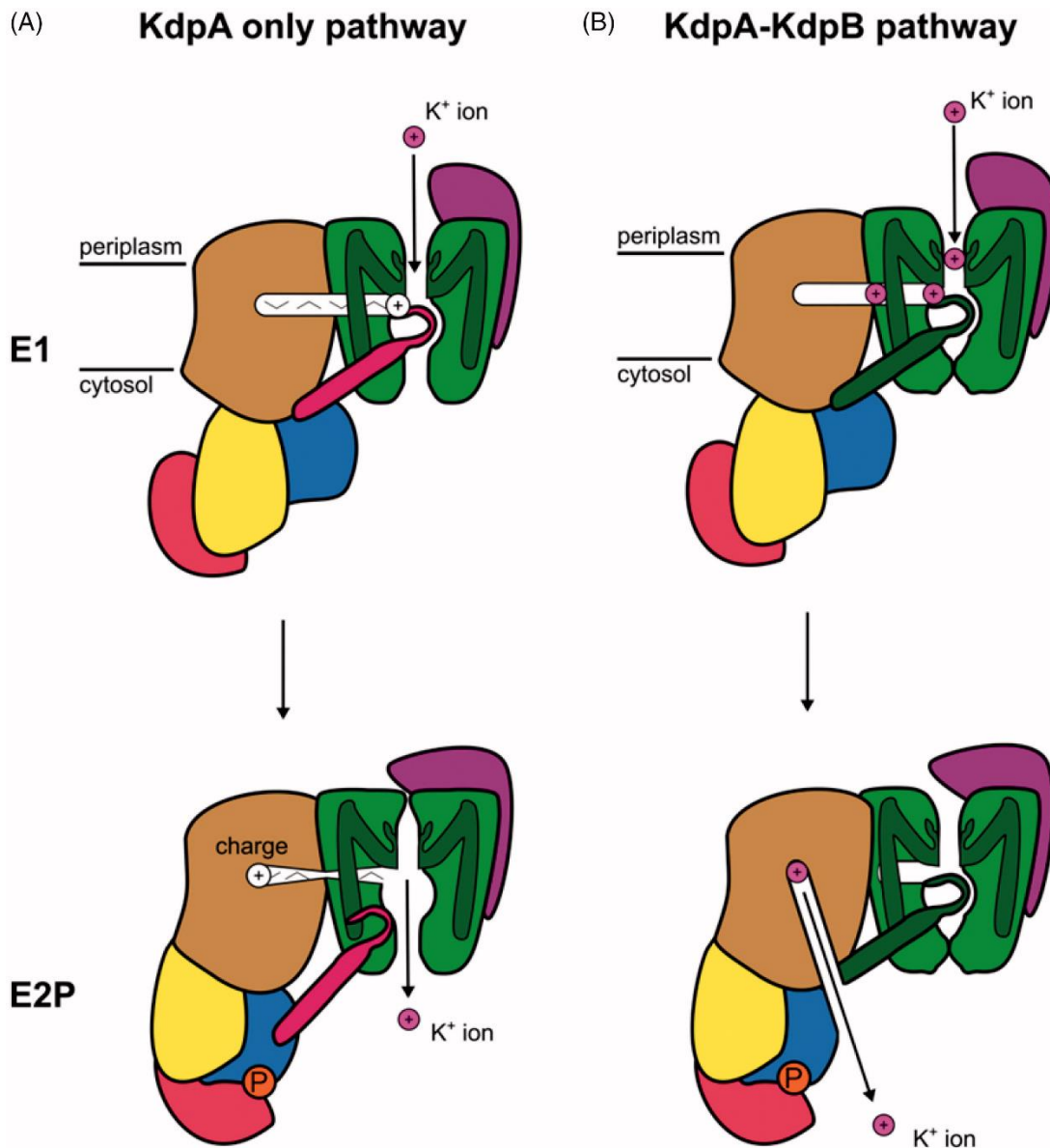


Figure 29. Schéma des deux mécanismes possibles proposés par Pedersen et al. pour le fonctionnement de KdpFABC [ref : 93]. A) Le potassium passe à travers un tunnel dans KdpA (vert). K⁺ est lié à partir du périplasm grâce au filtre sélectif de KdpA (conformation E1). Une charge migre alors à travers le tunnel et active le cycle ATPase de KdpB représenté par plusieurs domaines (le domaine transmembranaire en marron, le domaine P contenant le résidu aspartate en bleu, le domaine A qui hydrolyse l'aspartyl phosphate en jaune et le domaine N avec le site de liaison à l'ATP en rose). Il en résulte un changement conformationnel (E2P) avec une hélice qui autorise le passage de K⁺ dans le cytoplasme. B) A partir du périplasm, le potassium passe à travers un tunnel dans KdpA puis KdpB (E1) ; il est ensuite relargué dans le cytoplasme par KdpB (E2P). KdpC est représenté en violet sur les schémas A et B.

En dehors de son rôle dans le maintien de l'osmolarité, KdpD/KdpE a plus récemment été impliqué dans la virulence et la survie intracellulaire de la bactérie, notamment chez *Staphylococcus aureus*, *E. coli* entéro-hémorragique, *Salmonella typhimurium*, *Yersinia pestis*, *Francisella* sp, *Photobacterium* *asymbiotica* et chez les mycobactéries [97]. Des études montrent

en particulier que la délétion de *kdpD* et/ou *kdpE* entraîne une diminution du temps de survie de la bactérie *in vivo* chez *S. aureus*, *S. typhimurium* et *Y. pestis* (Tableau 5 et Figure 30). Le rôle de KdpD/KdpE dans la virulence chez *M. tuberculosis* est détaillé dans le chapitre suivant. KdpD/KdpE pourrait aussi jouer un rôle dans la résistance aux stress [97]. Des études rapportent le rôle de KdpD/KdpE dans la résistance i) aux microbicides chez *S. typhimurium* et *Y. pestis*, ii) au stress oxydatif chez *S. typhimurium* et iii) au stress adrénérgique chez *E. coli* entérohémorragique (Tableau 6).

Tableau 5. Eléments en faveur du rôle de KdpD/KdpE dans la virulence et la survie dans des modèles *in vivo* [97]

Bacterium	Model	Link to virulence/survival	References
<i>Staphylococcus aureus</i>	Human blood	Knock-out (KO) decreases survival	[98]
	Human blood	Increased transcription of <i>kdpD/kdpE</i> is concurrent with increased survival in blood; KO is attenuated.	[99]
	Macrophage	KO decreases survival	[98]
	Macrophage	Increased transcription of <i>kdpD/kdpE</i> is concurrent with increased survival in blood; KO is attenuated.	[99]
	Neutrophil	<i>kdpD</i> is differentially transcribed during phagocytosis	[100]
<i>Salmonella typhimurium</i>	Nematode	KdpD/KdpE is required for colonization of the worm; KO is attenuated	[101]
	Macrophage	KO decreases survival	[101]
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Mouse	KO increases virulence	[102]
<i>Mycobacterium avium</i>	Macrophage	<i>kdpD</i> is differentially transcribed during phagocytosis	[103]
<i>Yersinia pestis</i>	Neutrophil	KO decreases survival	[104]
<i>Photobacterium asymbiotica</i>	Insect phagocyte	Transgenic expression of <i>P. asymbiotica</i> KdpD/KdpE in <i>Escherichia coli</i> increases intracellular survival	[105]
<i>Francisella novicida</i>	Fruit fly	Mutation of <i>kdpD</i> , <i>kdpE</i> , <i>kdpA</i> or <i>kdpC</i> is attenuating in a competitive index assay	[106]
<i>Francisella tularensis</i>	Mouse	Mutation of KdpD is attenuating for growth and survival	[107]
Enterohaemorrhagic <i>Escherichia coli</i> (EHEC)	HeLa cells	Deletion of <i>kdpE</i> resulted in slightly fewer lesion “pedestals” in infected cells; double deletion of <i>kdpE</i> and <i>cra</i> prevented pedestal formation	[108]

Tableau 6. Eléments en faveur du rôle de KdpD/KdpE dans la résistance aux stress [97]

Bacterium	Link to stress resistance	References
<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>kdpD</i> KO increases sensitivity to antimicrobial stress (polymyxin B), osmotic stress (NaCl), and oxidative stress (H ₂ O ₂); the KO mutant elicits a 3-fold greater host response (production of nitric oxide) from macrophages	[101]
<i>Yersinia pestis</i>	KdpD/KdpE KO results in hypersensitivity to crude neutrophil granule extracts and to five individual neutrophil microbicides	[104]
<i>Photorhabdus asymbiotica</i>	<i>P. asymbiotica</i> KdpD/KdpE enables <i>E. coli</i> to persist in phagocytes whereas the native KdpDE does not; the greatest amino acid divergence is in KdpD's Universal Stress Protein (Usp) domain, thought to be involved in stress sensing	[105]
Enterohaemorrhagic <i>Escherichia coli</i> (EHEC)	KdpE is activated by the sensor kinase QseC, a receptor for adrenergic signals; adrenergic regulation of bacterial gene expression is an underlying mechanism of stress response and cellular survival	[109]

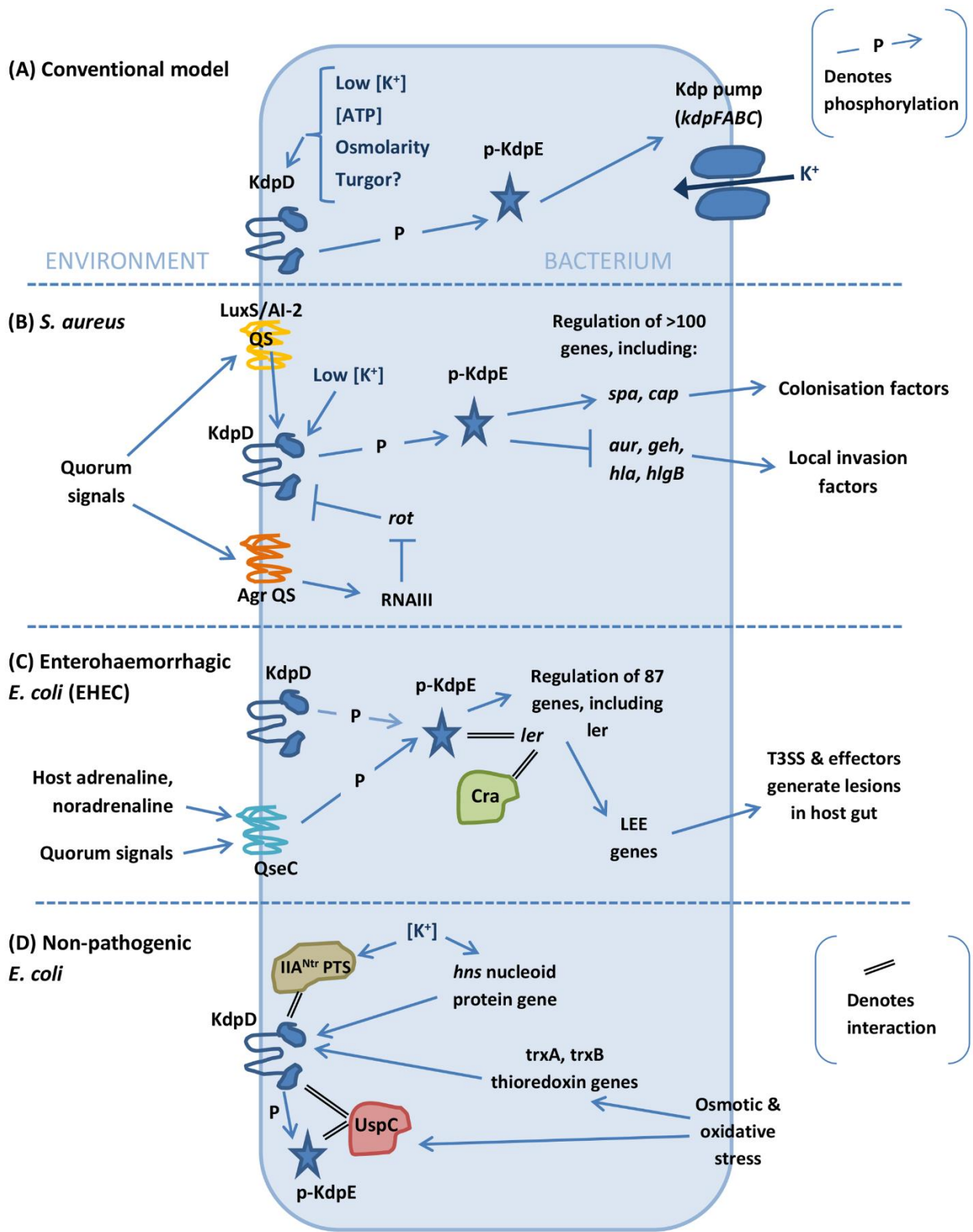


Figure 30. Schéma des effets de la régulation de KdpD/KdpE [ref : 97]

3.3. Le système Kdp chez *M. tuberculosis*

En l'absence de potassium et/ou en milieu acide, le métabolisme de la bactérie est altéré et évolue vers un état « dormant » avec une croissance lente voire nulle permettant au bacille de survivre à ces conditions défavorables [110]. Pour maintenir la concentration intracellulaire de potassium essentielle au métabolisme, *M. tuberculosis* possède deux systèmes d'absorption du potassium (Trk et Kdp) et un système d'efflux du potassium [33]. Le système Trk est composé de deux protéines TrkA, CeoB et CeoC, codées par deux gènes homologues *ceoB* et *ceoC* situés au sein de l'opéron *ceoBC*. Ce système est exprimé de façon constitutive et possède une plus faible affinité pour le potassium que le système Kdp [111].

3.3.1. Organisation des deux opérons *kdpDE* et *kdpFABC*

Le système de transport Kdp comporte chez *M. tuberculosis* 6 protéines codées par 6 gènes organisés en 2 opérons, *kdpDE* et *kdpFABC*. Ces deux opérons sont transcrits de façon opposée comme chez *M. bovis* et à l'inverse de *E. coli* ou *M. smegmatis* où les expressions sont collinéaires, et sont séparés par une région intergénique de 234 paires de bases (Figure 31) [33,112]. L'activation de KdpD (860 aa) est entraînée par la phosphorylation du résidu histidine en position 642 ; KdpD transmet ensuite le groupement phosphoryl à KdpE (226 aa) sur le résidu aspartate en position 52 (Figure 32) [113].

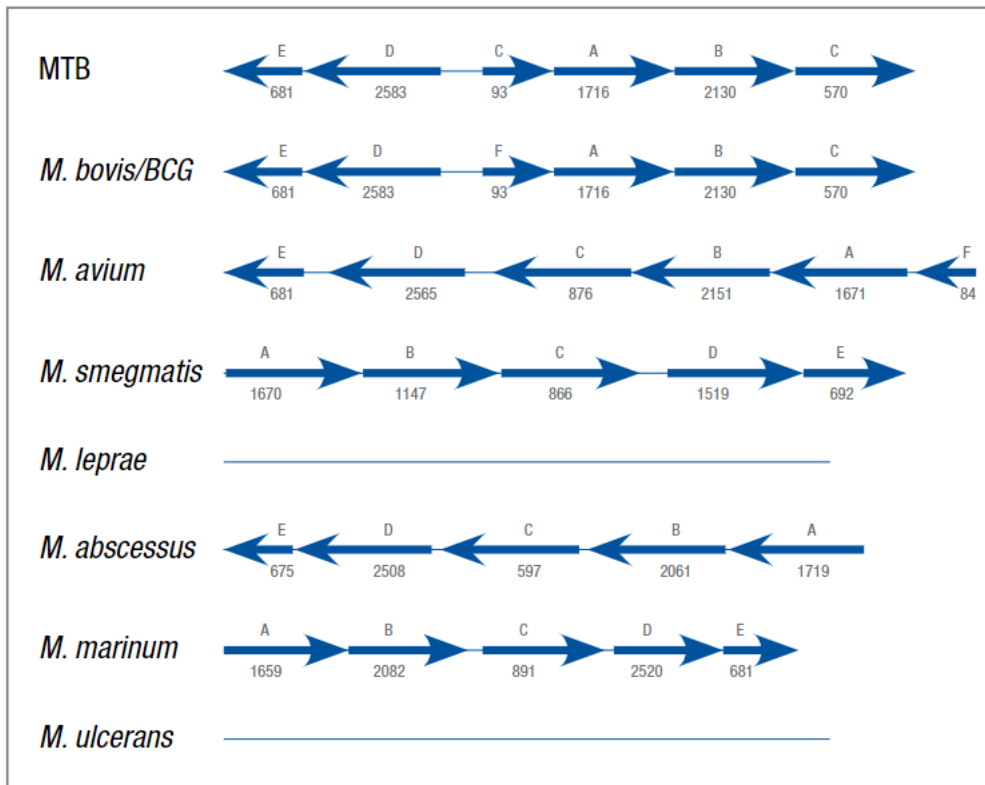


Figure 31. Organisation au sein du génome des gènes *kdp* chez *M. tuberculosis* et les autres mycobactéries [ref : 112]

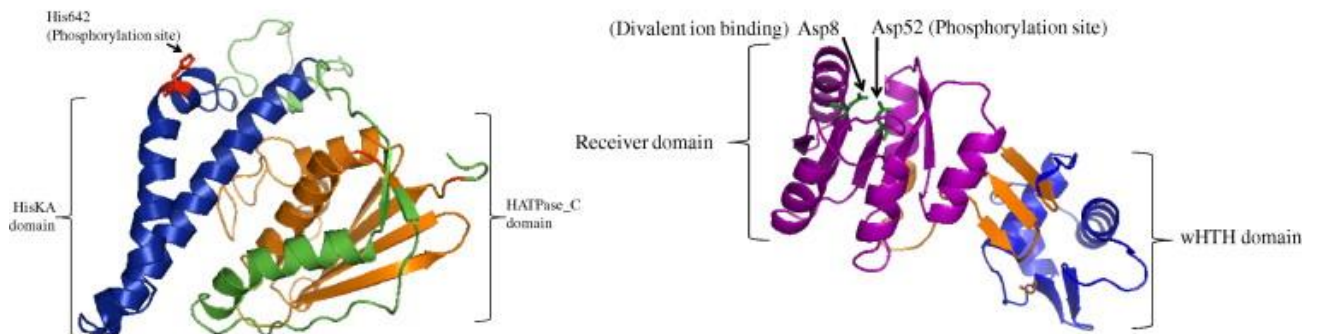


Figure 32. Modélisation de la structure 3-D de KdpD (portion cytosolique) et KdpE chez *M. tuberculosis* [ref : 113]

3.3.2. Régulation transcriptionnelle de KdpFABC

La région située entre les deux opérons *kdpDE* et *kdpFABC* semble impliquée dans la régulation transcriptionnelle de KdpFABC. En effet, en clonant la région promotrice de *kdpF* en amont du rapporteur GFP dans un plasmide puis en transformant ce plasmide dans *M. tuberculosis*,

MacGilvary *et al.* ont observé qu'une fluorescence est induite lorsque la concentration de potassium est basse [114]. De façon intéressante, d'autres conditions fréquemment rencontrées par *M. tuberculosis* (pH acide, concentration élevée de Cl⁻, osmolarité élevée et hypoxie) n'entraînent pas de fluorescence. L'induction d'un signal GFP est perdue avec le mutant $\Delta kdpDE$ en présence d'une concentration basse de potassium, suggérant l'implication de KdpDE dans l'induction de l'expression de *kdpFABC*.

En l'absence de *trk* dans la souche de référence H37Rv, Cholo *et al.* ont, quant à eux, observé une expression plus importante des gènes *kdpD* et *kdpA* à pH acide en présence d'une concentration élevée de potassium [115]. De plus, l'assimilation de potassium en phase exponentielle (pH neutre) et phase stationnaire (pH acide) déterminée à l'aide du radioisotope rubidium (⁸⁶Rb⁺) est plus importante pour le mutant de délétion *kdpDE* et le double mutant *kdpDE/trk* [111]; ceci pourrait être expliqué par l'absence de régulation par KdpDE. Le transporteur KdpFABC serait ainsi actif de façon constitutive en l'absence de son régulateur KdpDE, soit de façon spontanée, soit par un mécanisme d'induction. Cependant, ⁸⁶Rb⁺ ne serait pas un bon traceur selon Epstein pour étudier les systèmes de transport du potassium chez les bactéries [96].

La fixation de KdpE en amont de KdpF a été démontrée chez *M. smegmatis*, espèce présentant l'avantage d'une croissance rapide et d'une moindre pathogénicité par rapport à *M. tuberculosis* (Figure 33) [116]. En revanche, Agrawal *et al.* n'ont pas réussi à observer cette liaison chez *M. tuberculosis*, suggérant un mode de régulation plus complexe pour cette espèce [113].

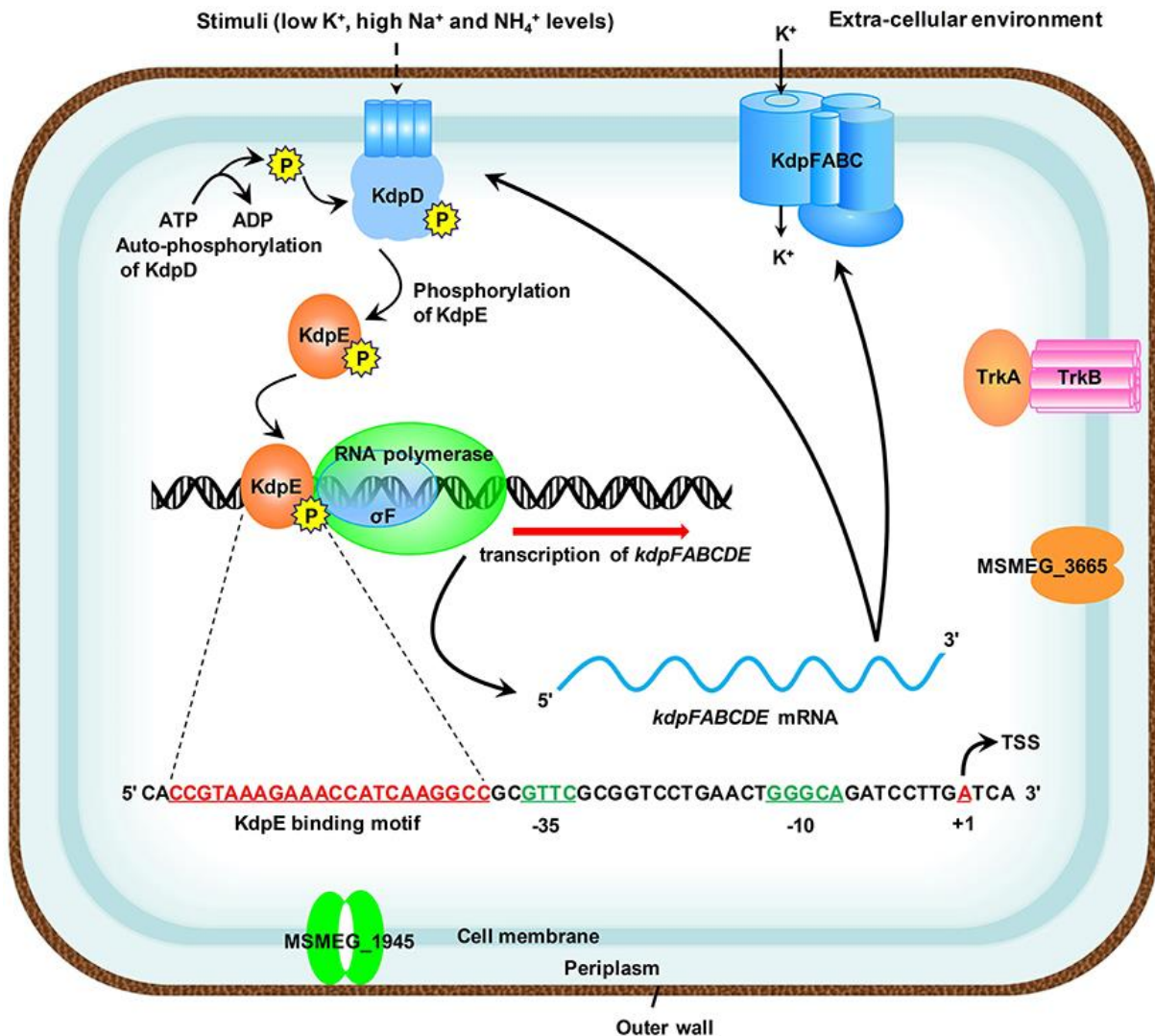


Figure 33. Schéma de la transcription de l'opéron *kdpFABC* chez *M. smegmatis* [ref : 116]

La façon avec laquelle KdpD perçoit les signaux, par exemple une concentration basse en potassium, est encore mal définie. A ce sujet, Steyn *et al.* ont mis en évidence l'interaction de KdpD avec deux lipoprotéines membranaires, LprF et LprJ [117]. Le domaine C-terminal histidine kinase formerait un complexe avec ces lipoprotéines et la partie N-terminal senseur (Figure 34). Les auteurs suggèrent ainsi que les signaux précédemment décrits sont détectés par KdpD via ces protéines.

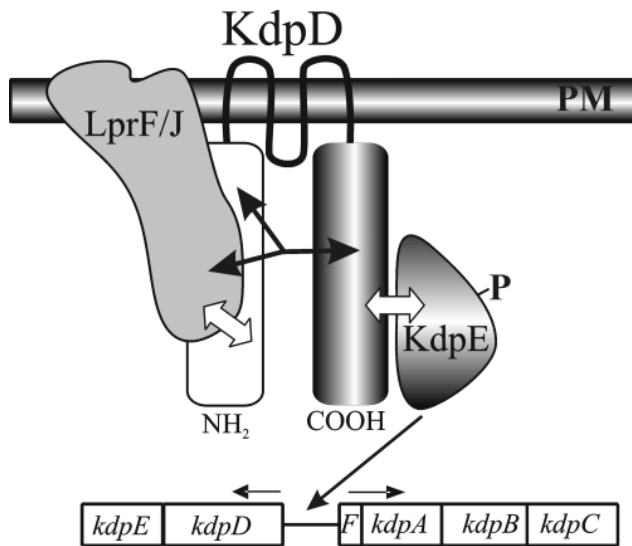


Figure 34. LprF et LprJ transmet le signal à la partie senseur N-terminal de KdpD, qui entraîne l'activité histidine kinase C-terminal, qui elle-même module l'expression de l'opéron *kdpFABC* via le régulateur KdpE [ref : 117].

3.3.3. Fonctions du système Kdp

Le système Kdp aurait d'autres rôles en dehors du transport du potassium précédemment décrit chez *M. tuberculosis*. Dans un milieu 7H9, en condition aérobie, Cholo *et al.* montrent que les mutants de délétion KdpDE et KdpDE/Trk présentent une croissance significativement plus lente que celle de H37Rv [111]. KdpDE permettrait de réduire le début de la phase exponentielle, y compris lorsque la concentration de potassium n'est pas limitée. Cela a été suggéré précédemment avec le rôle essentiel du gène *kdpE* au cours de la croissance bactérienne *in vitro* mais aussi au cours de l'infection du macrophage murin et humain [118–120].

Dans un modèle de dormance avec limitation des nutriments (PBS), Betts *et al.* observent une augmentation de l'expression de *kdpE* chez *M. tuberculosis*, suggérant un rôle du système Kdp dans cet état de métabolisme ralenti [121]. Dans une étude menée chez *M. marinum*, espèce proche de *M. tuberculosis*, pathogène du poisson, d'autres ectothermes et de l'homme, la délétion de *kdpA* conduirait à une diminution de la persistance, définie par une capacité à croître en présence d'une concentration élevée d'antibiotique (ici la rifampicine) alors que la CMI de la souche pour cet antibiotique est basse, une hyperpolarisation et des niveaux intracellulaires

élevés d'ATP [122]. Enfin, une étude publiée en 2003 suggère l'implication potentielle du système Kdp dans la virulence en montrant des délais de survie significativement plus courts pour les souris SCID infectées par *M. tuberculosis* $\Delta kdpDE$ par rapport à la souche H37Rv [102].

Comme décrit dans d'autres espèces bactériennes, le système Kdp semble avoir un rôle plus complexe qu'un simple transporteur de potassium chez *M. tuberculosis*.

4. WhiB6

4.1. Les protéines contenant un cluster Fe-S

La plupart des actinobactéries étant des organismes aérobies stricts, ils doivent faire face à la production de dérivés réactifs de l'oxygène, une des conséquences du métabolisme aérobie, qui peuvent endommager certains composants cellulaires, dont des lipides, des acides nucléiques, des protéines et des cofacteurs métalliques, entraînant une détérioration des fonctions cellulaires appelée le stress oxydatif [123]. Le stress oxydatif peut aussi être induit chez la bactérie dans le milieu extracellulaire ; par exemple des dérivés réactifs de l'oxygène sont produits par les phagocytes contre les actinobactéries pathogènes telles que *M. tuberculosis* ou *Corynebacterium diphtheriae*.

Le stress oxydatif peut notamment entraîner la formation de ponts disulfides. Pour empêcher la formation de ces ponts disulfides, des tampons thiol présents dans le cytoplasme comme le glutathion, ou dans le cas des actinobactéries le mycothiol, mais aussi des enzymes comme les thioredoxines présentes chez les actinobactéries, permettent aux cystéines des protéines d'être maintenues dans leur état réduit thiol (-SH) et préservent ainsi leurs fonctions. Pour faire face au stress oxydatif, les actinobactéries utilisent également des protéines (le plus souvent des facteurs de transcription) qui vont être activées ou non selon l'exposition au stress

oxydatif ; c'est le cas par exemple des protéines contenant un cluster fer-soufre (Fe-S). Ces protéines permettent aussi à *M. tuberculosis* de s'adapter à l'hypoxie auquel le bacille est soumis dans le granulome et ainsi de survivre pendant des années chez l'homme dans un état latent avec une division lente. Pour la plupart des protéines contenant un cluster Fe-S, les éléments Fe sont liés au soufre de résidus cystéine. L'assemblage des clusters Fe-S est obtenu via des systèmes protéiques complexes qui construisent les clusters sur des protéines intermédiaires puis transfèrent ces clusters sur des apoprotéines [124]. Il existe trois systèmes d'assemblage des clusters Fe-S chez les bactéries : l'opéron *nif*, l'opéron *isc* et l'opéron *sufABCDSE*. Un certain nombre d'organismes possèdent plus d'un système, tandis que le système *suf* est le seul système chez certaines bactéries et cyanobactéries. L'exemple classique de protéine contenant un cluster Fe-S est l'homodimère FNR qui comporte un cluster $[4\text{Fe}-4\text{S}]^{2+}$ par monomère et régule plus d'une centaine de gènes lorsque l'oxygène est limité [124,125]. En présence d'oxygène, le cluster se transforme en $[2\text{Fe}-2\text{S}]^{2+}$ déclenchant la dissociation du dimère, ce qui entraîne une faible affinité de liaison à l'ADN et la dérégulation des gènes cibles (Figure 35).

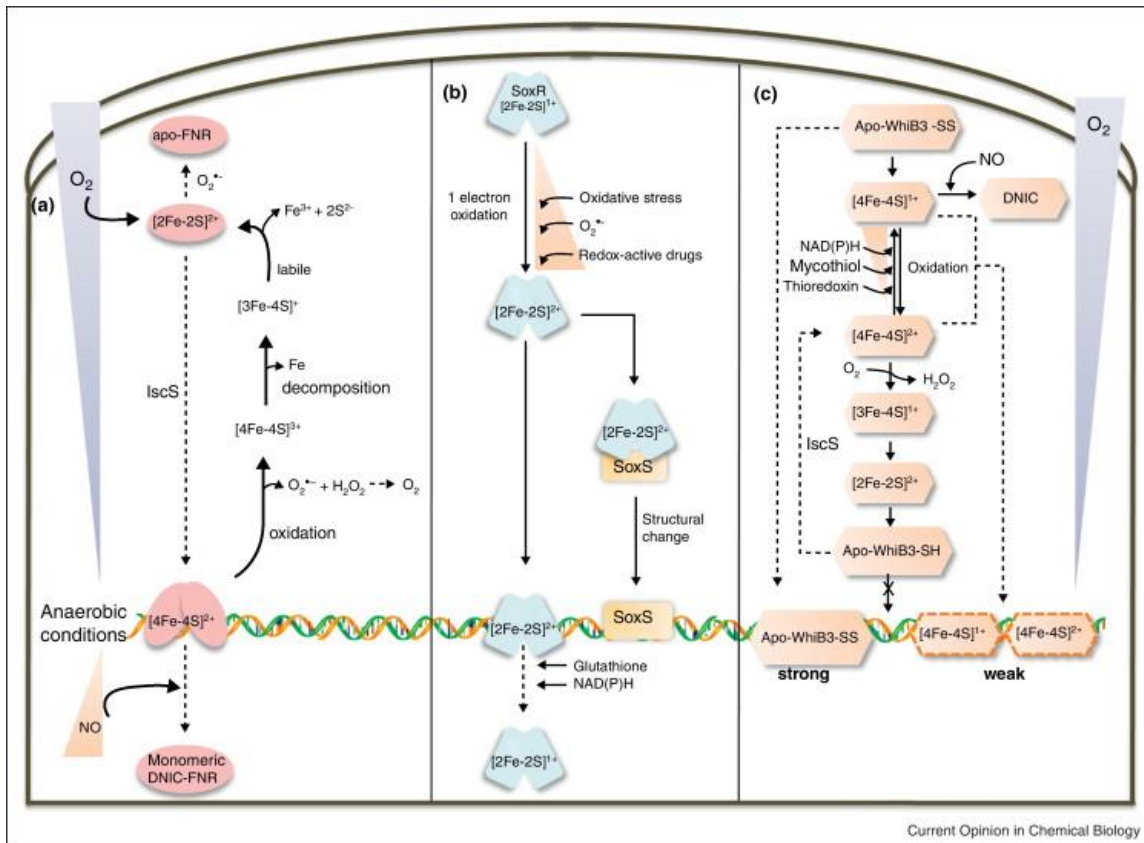


Figure 35. Schéma du mécanisme d'action de FNR et SoxR chez *E. coli* et WhiB3 chez *M. tuberculosis* [ref : 124]

4.2. Les protéines WhiB-like

Parmi les protéines contenant un cluster Fe-S, on trouve les protéines WhiB-like. Ces protéines, dont la première WhiB identifiée chez *Streptomyces coelicolor* a un rôle dans la formation des hyphes ou la sporulation (la délétion du gène entraîne une couleur blanche (**white**) des filaments mycéliens au lieu de grise), sont présentes uniquement chez les actinobactéries [126]. En particulier, il existe 7 protéines WhiB-like, allant de 84 à 139 acides aminés, chez *M. tuberculosis* : WhiB1 (Rv3219), WhiB2 (Rv3260c), WhiB3 (Rv3416), WhiB4 (Rv3681c), WhiB5 (Rv0022c), WhiB6 (Rv3862c) et WhiB7 (Rv3197A) [127]. Les protéines WhiB-like comportent quatre cystéines bien conservées, dont les deux centrales forment un motif CXXC (Figure 36). Cependant, une similarité modérée existe entre les séquences des acides aminés des différentes protéines WhiB-like chez *M. tuberculosis* (<70%) [128]. L'analyse BLAST de

ces séquences avec une database d'éléments mobiles génétiques met en évidence des protéines homologues dans des plasmides. L'hypothèse serait que les protéines WhiB-like chez *M. tuberculosis* auraient été acquises indépendamment chez des ancêtres des mycobactéries via des transferts horizontaux à partir d'éléments génétiques mobiles, comme des plasmides ou des phages, plutôt que par duplication [128].

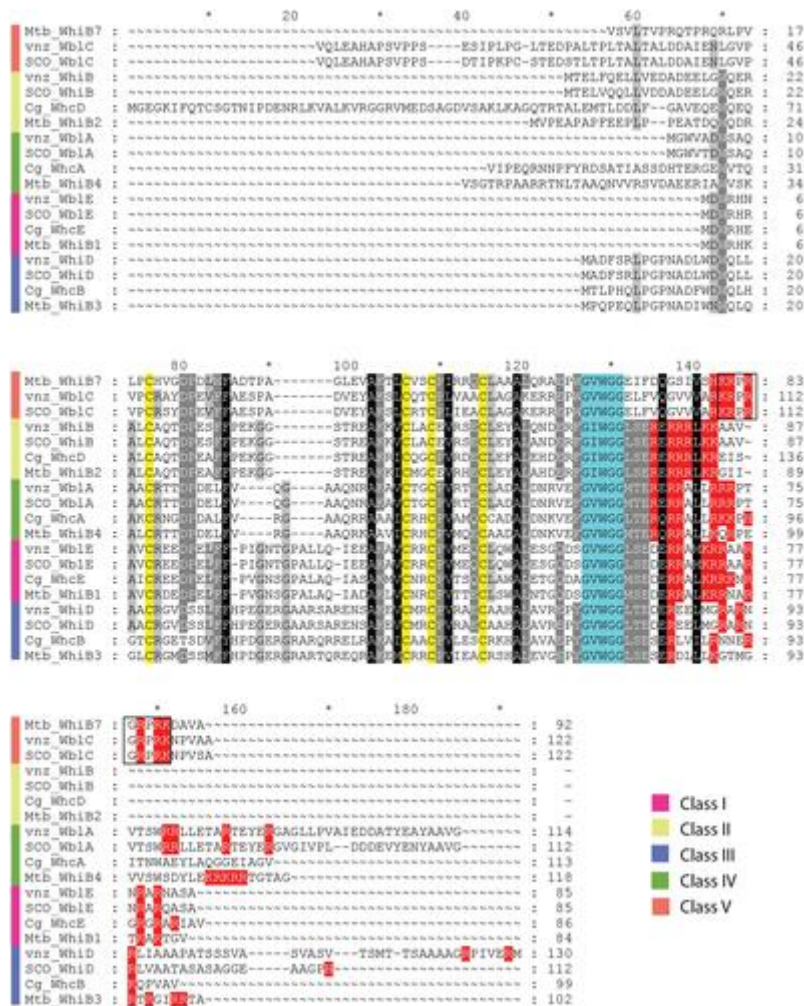


Figure 36. Alignement des séquences protéiques de protéines WhiB-like : *Streptomyces venezuelae* ATCC10712 (vnz), *Streptomyces coelicolor* A3(2) (SCO), *M. tuberculosis* H37Rv (Mtb) et *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 (Cg) [ref : 128]

Jakimowicz *et al.* ont démontré que WhiD, codé par un gène présent chez *Streptomyces coelicolor* et qui fait partie de la famille des protéines WhiB-like, se lie à un cluster [4Fe-4S] en condition anaérobie [129]; en présence d'oxygène, le cluster se transforme en [2Fe-2S] puis

disparaît. D'autres équipes l'ont observé pour les protéines WhiB1, WhiB3 et WhiB4 chez *M. tuberculosis*, suggérant que l'ensemble des protéines WhiB-like lient un cluster Fe-S [130–132]. En dehors de l'interaction du cluster Fe-S avec l'oxygène, celui-ci est également capable de réagir avec le NO et former un complexe DNIC (DiNitrosyl-Iron dithiol Complex) [127].

Geiman *et al.* ont étudié les variations de transcription des 7 gènes codant pour les protéines WhiB-like chez *M. tuberculosis* après exposition à divers stress environnementaux : détergent, stress oxydatif, pH acide, manque de nutriments, éthanol, antibiotique, chaleur et concentration basse en Fer [133]. WhiB6 apparaît être la protéine répondant au plus grand nombre de variations environnementales (Figure 37).

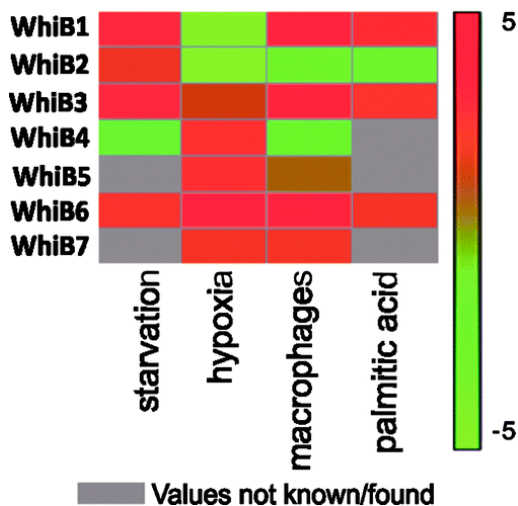


Figure 37. Niveaux de transcription relatifs des gènes codant pour les protéines WhiB-like chez *M. tuberculosis* [ref : 133]

En dehors d'un rôle de disulfide réductase potentiel, les protéines WhiB pourraient réguler la transcription de gènes [127,132]. L'absence d'un domaine de liaison à l'ADN en dehors de WhiB7 (domaine « AT-hook ») suggère que les protéines WhiB-like auraient un partenaire permettant de rendre la liaison à l'ADN spécifique. Chez les mycobactéries par exemple, il a été démontré que WhiB1, WhiB3 et WhiB7 interagissent avec le facteur SigA.

4.3. WhiB6 au sein du système de sécrétion de type VII ESX-1 chez *M. tuberculosis*

Au cours de l'infection, le bacille de la tuberculose s'échappe du phagosome pour aller dans le cytosol des cellules hôtes en induisant la formation de pores qui entraîne la lyse du phagosome. Ce phénomène est dépendant de la sécrétion de ESAT-6 et CFP-10 via le système de sécrétion de type VII ESX-1, comme décrit dans un chapitre précédent [134]. Les signaux qui déclenchent l'activation de ESX-1 sont encore mal identifiés. Le système à deux composants PhoPR en détectant le pH acide à l'intérieur du phagosome pourrait être impliqué dans le processus. En effet, l'inactivation de PhoP entraîne une diminution de la sécrétion de ESAT-6 en lien probable avec la diminution de l'expression de l'opéron *espACD* [58]. De plus, *phoP* et l'opéron *espACD* sont régulés positivement en présence d'H₂O₂, dans le phagosome et en pH acide [58]. Selon l'étude de Solans *et al.*, PhoP pourrait également interférer avec la régulation de WhiB6, codé par un gène situé en amont de la région de délétion RD1 (Figure 38) [135].

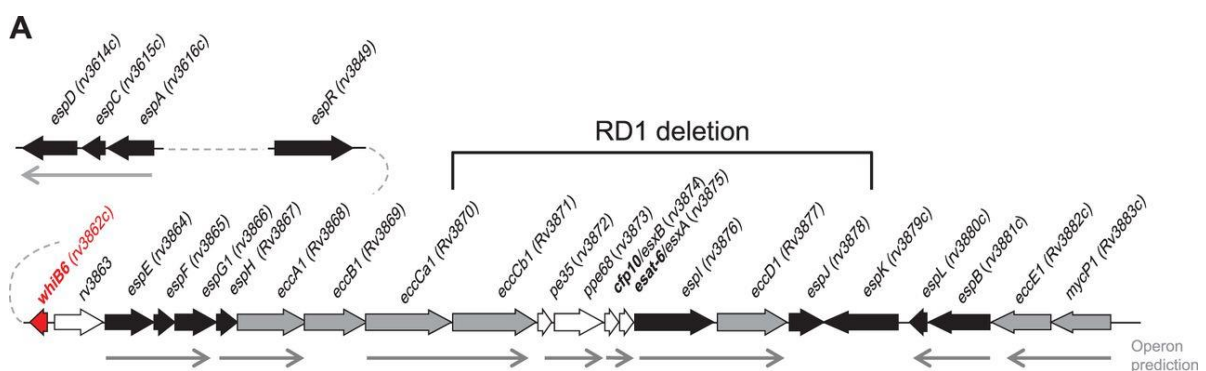


Figure 38. Représentation schématique de ESX-1 chez *M. tuberculosis* [ref : 135]

Les auteurs ont mis en évidence une plus faible sécrétion d'ESAT-6 pour H37Rv par rapport à des souches cliniques et l'expliquent par une différence de régulation de ESX-1 par WhiB6 en lien avec l'insertion d'un G en position -74 en amont du codon start de *whiB6* dans les souches H37Rv/Ra. La région correspond à un site de liaison de PhoP. Les auteurs proposent ainsi que l'insertion de ce nucléotide entraînerait une séquence inversée ; celle-ci serait responsable de la

formation d'une boucle gênant la fixation de PhoP et modulant par conséquent l'expression de *whiB6* (Figure 39).



Figure 39. Séquence inversée probablement responsable de la formation d'une boucle gênant la fixation de PhoP [ref : 135]

WhiB6 induit l'expression des gènes codant pour les substrats de ESX-1 chez *M. tuberculosis* et *M. marinum* [135–137]. Bosserman *et al.* ont observé que l'absence du complexe membranaire composé des protéines Ecc (ESX Conserved Component) diminue l'expression du gène *whiB6* et des gènes codant pour les substrats du système ESX-1 chez *M. marinum* [136]. Dans une deuxième étude chez *M. marinum*, la même équipe a montré que EspM, codé par un gène adjacent à *whiB6* dont le sens de transcription est opposé, réprime la transcription de *whiB6* en se liant à la région intergénique entre *whiB6* et *espM* (Figure 40) [138]. En l'absence d'un système ESX-1 fonctionnel, la répression de la transcription de *whiB6* par EspM est majorée.

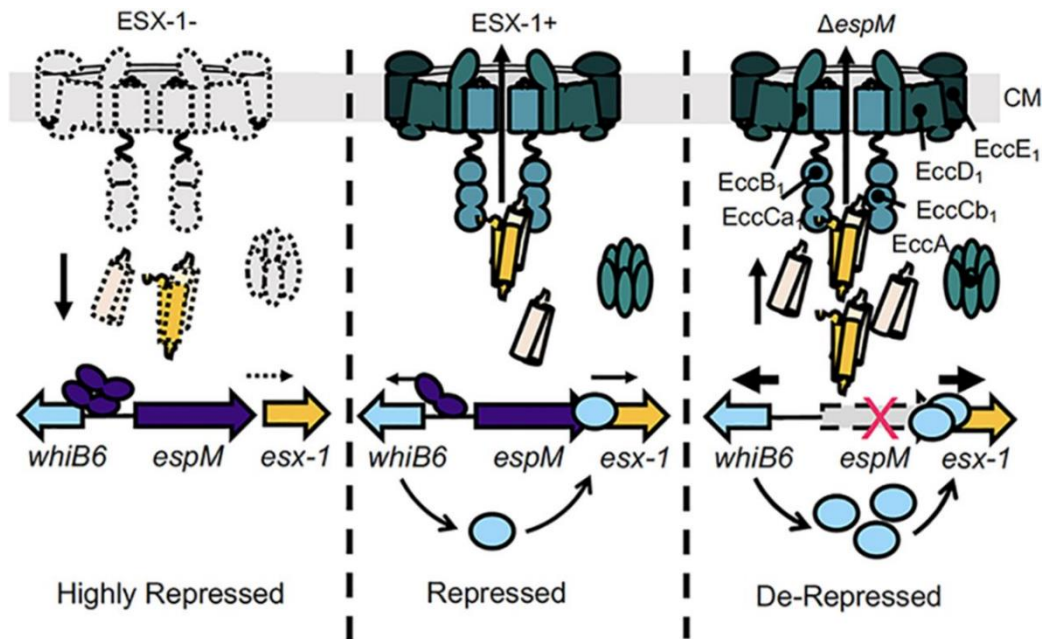


Figure 40. Modèle proposé par Sanchez et al. de la régulation de l'expression de *whiB6* par *EspM* [ref : 138]

Dans un troisième travail toujours chez *M. marinum*, les auteurs ont mis en évidence que des niveaux élevés de *EspE* et *EspF*, substrats du système ESX-1, codés par des gènes situés en aval de *whiB6* (Figure 38), réduisent la production des substrats de ESX-1 via *WhiB6* (Figure 41) [139]. En l'absence de *EspE* et *EspF*, la souche serait atténuée dans un modèle de macrophage murin et entraînerait moins de lyse cellulaire, celle-ci étant consécutive à la rupture du phagosome dépendante de ESX-1. Ces résultats suggèrent ainsi un rôle des deux substrats dans la virulence et l'activité lytique du système ESX-1.

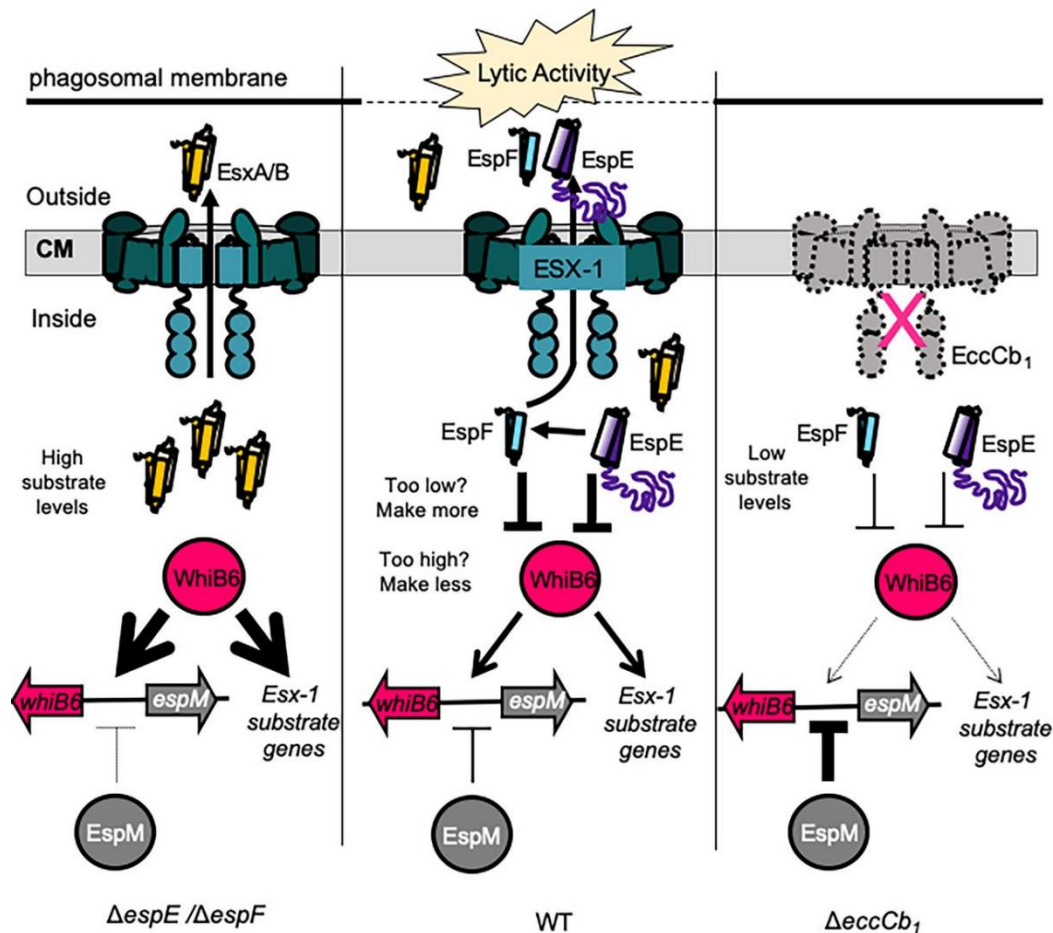


Figure 41. Schéma proposé de la régulation du système ESX-1 chez *M. marinum* [ref : 139]. Lorsque la souche est WT (au centre), les substrats du système ESX-1 EspE et EspF contrôlent l'autorégulation de WhiB6 et la régulation des substrats ESX-1 par WhiB6. La sécrétion de EspE et EspF entraîne la lyse de la membrane phagosomale. En l'absence d'un système ESX-1 fonctionnel (à droite), EspM diminue l'expression de WhiB6 et la faible quantité de substrats EspE et EspF diminue l'autorégulation de WhiB6. En l'absence de EspE et EspF (à gauche), WhiB6 s'autorégule positivement, entraînant une augmentation de l'expression des substrats ESX-1. Cependant, en l'absence de EspE et EspF, les substrats ESX-1 ne peuvent pas causer la lyse de la membrane phagosomale.

Chen *et al.* ont étudié le rôle du cluster Fe-S de WhiB6 dans la régulation du système ESX-1 chez *M. marinum* et ont montré que les quatre cystéines conservées sont nécessaires à la sécrétion de EsxA et EsxB et à leur activité cytolitique [140]. Dans ce même travail, l'étude transcriptomique a mis en évidence l'activation par WhiB6 du régulon Dos, qui contrôle environ 50 gènes et est capable d'induire un métabolisme non-réplicatif « dormant » lorsque le bacille est exposé au NO, au CO et à l'hypoxie [140,141]. Chen *et al.* ont observé que le NO, généré par les macrophages activés, interagit avec le cluster Fe-S de WhiB6 et forme un complexe DNIC. L'expression de *whiB6* est induite lors de l'exposition au NO ; WhiB6 active

alors ESX-1 dans un premier temps, ce qui permet au bacille de survivre dans le macrophage en s'échappant du phagosome. Le cluster Fe-S réagit ensuite avec des dérivés réactifs de l'oxygène (ROS) et le NO produits par le système immunitaire pour former l'apo-WhiB6 oxydée et le complexe DNIC, respectivement. L'accumulation de NADH induite par l'hypoxie dans le granulome entraîne la formation de l'apo-WhiB6 réduite. Les deux formes apo-WhiB6 réduite et DNIC activent le régulon Dos qui va permettre la persistance du bacille et le maintien de l'intégrité du granulome (Figure 42).

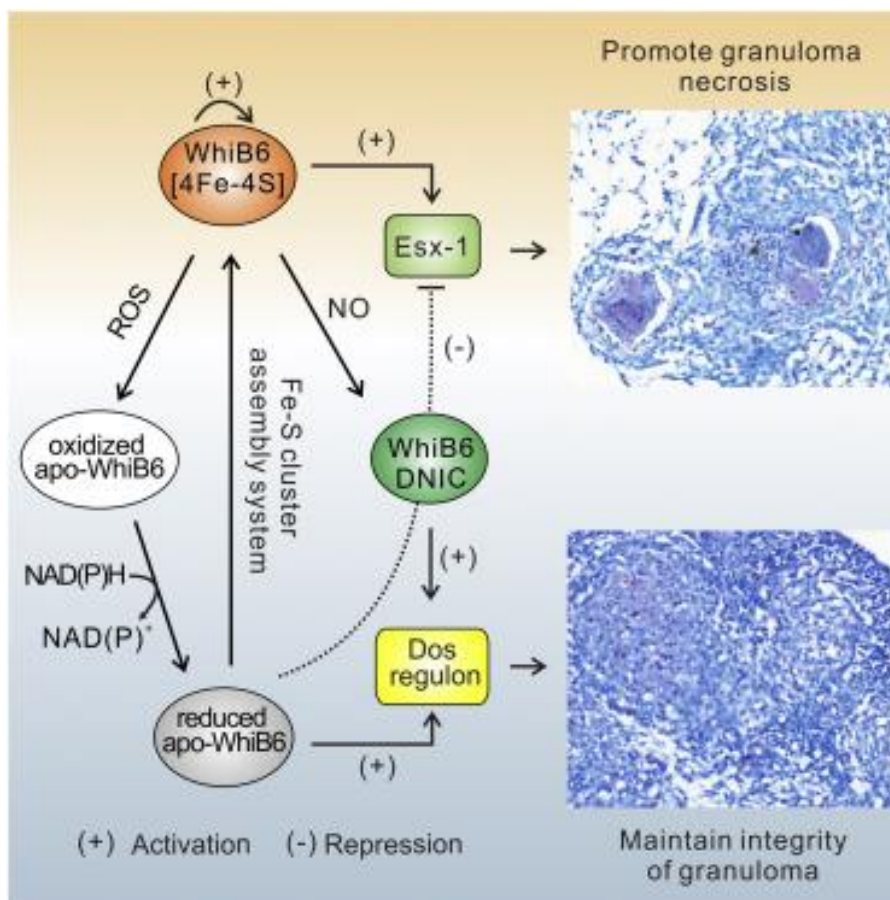


Figure 42. Schéma proposé par Chen et al. pour la régulation par WhiB6 de la dissémination du bacille et le maintien du granulome chez *M. marinum* [ref : 140]

CONTEXTE ET OBJECTIFS

L'objectif général de notre programme de recherche était l'étude des souches MDR de *M. tuberculosis*. En effet, ces souches représentent un obstacle majeur à l'éradication de la tuberculose dans le monde puisque les cas de tuberculose MDR sont plus difficiles à traiter avec un taux de succès thérapeutique de 60% comparé à 85% en cas de tuberculose multisensible. Dans les cas de TB MDR, un élément participant au succès thérapeutique est le choix d'un traitement adapté au plus tôt. Il s'agit d'identifier les molécules auxquelles la souche apparaît sensible pour éviter la sélection de mutants résistants et augmenter les chances de guérison. Compte tenu de la croissance très lente de *M. tuberculosis*, les techniques de biologie moléculaire apparaissent intéressantes pour obtenir rapidement le profil de sensibilité de la souche en comparaison avec l'antibiogramme phénotypique qui nécessite un temps de croissance à partir d'une culture positive. Les techniques de diagnostic rapide présentent l'inconvénient de n'identifier que quelques mutations fréquemment rapportées. Alors que le WGS n'est encore pas au point à partir du prélèvement puisque l'analyse est gênée par l'ADN humain et manque de profondeur, le séquençage haut débit ciblé permet d'obtenir un antibiogramme génotypique étendu directement à partir du prélèvement. Nous avons évalué l'utilisation en routine de l'outil Deeplex Myc-TB, basé sur du séquençage haut débit ciblé, au CNR MyRMA en cas de suspicion de TB résistante. Avant l'utilisation de cet outil au CNR MyRMA, nous réalisions des tests de diagnostic rapide à partir des prélèvements ou souches qui permettaient d'obtenir rapidement la confirmation du caractère MDR de la souche mais aussi de connaître la sensibilité à quelques antituberculeux de seconde ligne. Dans le cas de prélèvements, il fallait ensuite attendre une culture positive pour compléter l'antibiogramme génotypique en amplifiant et en séquençant chaque gène cible impliqué dans la résistance. L'antibiogramme phénotypique selon la méthode des proportions est réalisé à partir d'une culture ; une première lecture est effectuée à 28 jours puis une seconde à 42 jours. La technologie de séquençage haut débit ciblé peut-elle permettre d'obtenir plus rapidement un

antibiogramme génotypique complet ? Les données obtenues sont-elles fiables ? La méthode peut-elle être appliquée au prélèvement pour gagner du temps ? Ensuite, nous utilisons la méthode de génotypage MIRU-VNTR au CNR MyRMA pour mettre en évidence des transmissions inter-patients. Le spoligotype déterminé par Deeplex Myc-TB en même temps que le profil de sensibilité de la souche peut-il remplacer la méthode MIRU-VNTR ? Le travail que j'ai mené pour répondre à ces questions est décrit dans le premier article de la section Résultats.

Une autre problématique à laquelle nous nous sommes intéressés est celle posée par certains clones MDR de *M. tuberculosis* qui diffusent rapidement, notamment le clone Beijing B0/W148 ou clone russe, apparu dans les années 1960, et qui a depuis été isolé en Russie et dans de nombreux pays européens. Or, les raisons expliquant cette diffusion rapide ne sont pas connues. En dehors de facteurs environnementaux, est-ce que des spécificités génétiques, mutations, délétions, insertions, peuvent entraîner des modifications phénotypiques expliquant la plus grande diffusion du clone B0/W148 ? Quelles sont-elles et quels sont les impacts de ces mutations ?

Nous avons choisi d'étudier ces questions en tirant avantage d'une large collection de souches MDR de *M. tuberculosis* présente au sein du CNR MyRMA. Nous avons identifié des polymorphismes spécifiques des souches du clone MDR B0/W148. Nous avons choisi de construire des mutants dans la souche de référence H37Rv pour deux mutations spécifiques du clone afin d'étudier l'impact de ces mutations et voir si celles-ci pourraient être un avantage pour la bactérie. Ce travail est décrit dans l'ébauche d'article 2 de la partie Résultats.

D'autres études ont été menées en parallèle de ces travaux. J'ai notamment été associée à un travail qui portait sur l'évaluation du dépistage actif de la tuberculose chez les migrants en provenance d'Ukraine, pays à forte incidence de TB, en l'absence de recommandations par l'OMS et l'ECDC. Les recommandations sur la tuberculose MDR concernant essentiellement l'atteinte pulmonaire, nous avons évalué l'efficacité des traitements recommandés dans la tuberculose MDR osseuse en reprenant rétrospectivement 23 cas français de TB MDR osseuse. A côté du Deeplex Myc-TB, j'ai également participé à plusieurs travaux en lien avec le diagnostic de la tuberculose, en particulier moléculaire, et son importance. Enfin, j'ai été associée à un article portant sur l'impact de la nouvelle définition XDR établie par l'OMS en 2021. Ces articles sont inclus dans la section Autres publications de ce manuscrit.

RESULTATS

Publication n°1

Bonnet I, Enouf V, Morel F, Ok V, Jaffré J, Jarlier V, Aubry A, Robert J, Sougakoff W. A comprehensive evaluation of Genelead VIII DNA platform combined to Deeplex Myc-TB® assay to detect in 8 days drug resistance to 13 antituberculous drugs and transmission of *Mycobacterium tuberculosis* complex directly from clinical samples. *Front Cell Infect Microbiol.* 2021 Oct 29;11

Nous avons étudié la technologie Deeplex Myc-TB pour détecter rapidement le génotype et la sensibilité des souches cliniques de *M. tuberculosis* MDR. Cette technologie, basée sur une PCR multiplexe et du séquençage haut débit, détermine à la fois l'espèce (*hsp65*), le génotype (spoligotype) et la sensibilité à 13 antituberculeux de première et seconde ligne (18 cibles) avec une couverture de la résistance plus large que celle des tests classiques. L'objectif de l'étude menée au CNR MyRMA était d'évaluer la performance de ce test en routine.

Nous avons observé que le test fonctionne sur prélèvement positif à l'examen microscopique et sur souche. Les profils de résistance obtenus sont concordants à 85,4% avec les résultats obtenus par la méthode phénotypique de référence. Lorsque Deeplex Myc-TB est réalisé sur prélèvement, les résultats sont disponibles en une dizaine de jours et environ 6 semaines avant ceux de l'antibiogramme phénotypique. Deeplex Myc-TB permet donc d'adapter l'antibiothérapie bien avant que ce qui était fait jusqu'à présent.



A Comprehensive Evaluation of GeneLEAD VIII DNA Platform Combined to Deeplex Myc-TB[®] Assay to Detect in 8 Days Drug Resistance to 13 Antituberculous Drugs and Transmission of *Mycobacterium tuberculosis* Complex Directly From Clinical Samples

OPEN ACCESS

Edited by:

Diana Machado,
New University of Lisbon, Portugal

Reviewed by:

Guislaine Refrégier,
Université Paris-Saclay,
France
Margaretha De Vos,
Foundation for Innovative New
Diagnostics, Switzerland

*Correspondence:

Wladimir Sougakoff
wladimir.sougakoff@aphp.fr

Specialty section:

This article was submitted to
Clinical Microbiology,
a section of the journal
Frontiers in Cellular and
Infection Microbiology

Received: 21 May 2021

Accepted: 04 October 2021

Published: 29 October 2021

Citation:

Bonnet I, Enouf V, Morel F, Ok V, Jaffré J, Jarlier V, Aubry A, Robert J and Sougakoff W (2021) A Comprehensive Evaluation of GeneLEAD VIII DNA Platform Combined to Deeplex Myc-TB[®] Assay to Detect in 8 Days Drug Resistance to 13 Antituberculous Drugs and Transmission of *Mycobacterium tuberculosis* Complex Directly From Clinical Samples. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 11:707244. doi: 10.3389/fcimb.2021.707244

Isabelle Bonnet^{1,2,3}, Vincent Enouf⁴, Florence Morel^{1,2,3}, Vichita Ok^{1,2,3}, Jérémy Jaffré^{1,2,3}, Vincent Jarlier^{1,2}, Alexandra Aubry^{1,2,3}, Jérôme Robert^{1,2,3} and Wladimir Sougakoff^{1,2,3*}

¹ Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP), Hôpital Pitié-Salpêtrière, Service de Bactériologie-Hygiène, Paris, France, ² Centre National de Référence des Mycobactéries et de la Résistance des Mycobactéries aux Antituberculeux (CNR-MyRMA), Paris, France, ³ Sorbonne Université, INSERM, Centre d'Immunologie et des Maladies Infectieuses (CIMI-Paris), Unité Mixte de Recherche (UMR) 1135, Paris, France, ⁴ Plateforme de Microbiologie Mutualisée (P2M), Pasteur International Bioresources network (PIBnet), Institut Pasteur, Paris, France

The GeneLEAD VIII (Diagenode, Belgium) is a new, fully automated, sample-to-result precision instrument for the extraction of DNA and PCR detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTBC) directly from clinical samples. The Deeplex Myc-TB[®] assay (Genoscreen, France) is a diagnostic kit based on the deep sequencing of a 24-plexed amplicon mix allowing simultaneously the detection of resistance to 13 antituberculous (antiTB) drugs and the determination of spoligotype. We evaluated the performance of a strategy combining the both mentioned tools to detect directly from clinical samples, in 8 days, MTBC and its resistance to 13 antiTB drugs, and identify potential transmission of strains from patient-to-patient. Using this approach, we screened 112 clinical samples (65 smear-negative) and 94 MTBC cultured strains. The sensitivity and the specificity of the GeneLEAD/Deeplex Myc-TB approach for MTBC detection were 79.3% and 100%, respectively. One hundred forty successful Deeplex Myc-TB results were obtained for 46 clinical samples and 94 strains, a total of 85.4% of which had a Deeplex Myc-TB susceptibility and resistance prediction consistent with phenotypic drug susceptibility testing (DST). Importantly, the Deeplex Myc-TB assay was able to detect 100% of the multidrug-resistant (MDR) MTBC tested. The lowest concordance rates were for pyrazinamide, ethambutol, streptomycin, and ethionamide (84.5%, 81.5%, 73%, and 55%, respectively) for which the determination of susceptibility or resistance is generally

difficult with current tools. One of the main difficulties of Deeplex Myc-TB is to interpret the non-synonymous uncharacterized variants that can represent up to 30% of the detected single nucleotide variants. We observed a good level of concordance between Deeplex Myc-TB-spoligotyping and MIRU-VNTR despite a lower discriminatory power for spoligotyping. The median time to obtain complete results from clinical samples was 8 days (IQR 7–13) provided a high-throughput NGS sequencing platform was available. Our results highlight that the GeneLEAD/Deeplex Myc-TB approach could be a breakthrough in rapid diagnosis of MDR TB in routine practice.

Keywords: GeneLEAD VIII, Deeplex Myc-TB, *Mycobacterium tuberculosis*, diagnostic, resistance, spoligotype

INTRODUCTION

In 2019, tuberculosis (TB) was responsible for more deaths than any other infectious disease in the world (Furin et al., 2019). According to the World Health Organization (WHO), an estimated number of 10 million people have contracted TB and approximately 1.5 million died from the disease in 2019 (World Health Organization, 2020). In order to rapidly implement appropriate treatment against potentially resistant strains, drug-sensitive or drug-resistant TB must be quickly and accurately identified to avoid the selection of additional resistance, improve treatment outcomes, and reduce transmissibility (World Health Organization, 2018a; World Health Organization, 2018b; World Health Organization, 2019; Nahid et al., 2019). Because *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTBC) is a slow-growing bacterium [average delay of 30 days between culture and phenotypic drug susceptibility testing (DST)], genotypic DST, especially from specimens, appears to be more advantageous than phenotypic DST.

Among the genotypic DST methods available to date, the widely used Xpert[®] MTB/RIF test (Cepheid, USA) is an automated molecular unit test that identifies MTBC but only predicts rifampin resistance in clinical specimens (Boehme et al., 2010). Semi-automated tests such as the Fluorotype[®] MTB test (Hain, Germany) combined with the Anyplex[™] II MTB/MDR and MTB/XDR kits (Seegene, Korea) have been designed for large runs and are capable of detecting both MTBC and resistance to rifampicin, isoniazid, fluoroquinolones, and injectable drugs (Hofmann-Thiel and Hoffmann, 2014; Igarashi et al., 2017). Nevertheless, misidentifications, particularly with regard to resistance to rifampicin and fluoroquinolones, have been reported in the literature (Igarashi et al., 2017). DNA strip testing such as the MTBDRplus and MTBDRsl tests (Hain, Germany), and Sanger sequencing of genes involved in drug resistance can also detect drug resistance mutations (Brossier et al., 2009; Brossier et al., 2016; Brossier et al., 2017). However, both methods remain technically time-consuming, expensive, complex, and generally need to be performed on cultures to give good results. Recently, the development of next-generation sequencing (NGS) has led to widespread use of whole-genome sequencing (WGS) for TB diagnosis, drug resistance detection, and MTBC typing (Colman et al., 2019; Meehan et al., 2019; Nimmo et al., 2019; van Beek et al., 2019). However, some

progress remains to be made in terms of the timeliness of results, performance when applied directly on clinical samples/data interpretation even if large systematic reviews have been published, and standardization to implement WGS in the routine clinical setting (Votintseva et al., 2017; Doyle et al., 2018; Meehan et al., 2019; World Health Organization, 2021).

Here, we report the combination of a new all-in-one automated molecular diagnostic platform performing DNA extraction and PCR amplification of MTBC (GeneLEAD VIII, Diagenode, Belgium) with a PCR-NGS-based all-in-one test for species identification, genotyping, and prediction of resistance to antituberculous (antiTB) drugs (Deeplex Myc-TB, Genoscreen, France) (Feuerriegel et al., 2021; Jouet et al., 2021; Kambli et al., 2021). The GeneLEAD/Deeplex Myc-TB approach has been compared with routine genotypic and phenotypic methods. Applied to samples or cultures, the Deeplex Myc-TB assay can provide identification, genotyping, and prediction of resistance to 13 antiTB drugs with a median delay of 8 days. To our knowledge, this is the first report of this combined approach on collected clinical samples.

MATERIALS AND METHODS

Clinical Samples

One hundred twelve clinical samples of various types were prospectively included in the study between November 2018 and November 2019 (see **Table 1**). They were received from French clinical laboratories for suspicion of resistant TB in the frame of our activity as Mycobacteria National Reference Centre (Myc-NRC) or for TB diagnostic from different wards of our hospital. The samples were stored at 4°C when they could not be processed the day of reception. Each sample was submitted to auramine staining for microscopic examination and cultured on Löwenstein–Jensen medium using standard procedures and biosecurity recommendations (European Centre for Disease Prevention and Control, 2018).

Strains

In order to better evaluate the performance of the strategy in detecting mutations responsible for drug resistance, 94 MTBC strains were also included in the study. The panel included 189 unique mutations potentially involved in resistance to rifampicin

TABLE 1 | Strains and clinical samples.

Nature of clinical samples	N
Sputum	33
Gastric aspirate	6
Bronchial aspirate	37
Bronchoalveolar lavage	4
Lung biopsy	4
Pleural fluid	3
Lymph node	12
Spine	3
Abscess of the iliac fossa	1
Cerebrospinal fluid	6
Subdural hematoma	1
Skin sample	2
<i>Total</i>	112
Microscopic examination of clinical samples	
≥100 AFB/field	10
10 to 99 AFB/field	18
1 to 9 AFB/field	12
<1 AFB/field >10/slide	7
Negative	65
<i>Total</i>	112
Strains	
Liquid	39
Solid	55
<i>Total</i>	94

(RIF, $n = 19$), isoniazid (INH, $n = 10$), ethionamide (ETH, $n = 24$), pyrazinamide (PZA, $n = 39$), ethambutol (EMB, $n = 19$), fluoroquinolones (FQ, $n = 17$), injectable drugs including kanamycin (KAN), amikacin (AMK), and capreomycin (CAP) ($n = 11$), streptomycin (STR, $n = 40$), linezolid (LNZ, $n = 2$), and bedaquiline (BDQ, $n = 8$). These strains were received on solid ($n = 55$) or liquid ($n = 39$) media from French laboratories between November 2018 and November 2019, for confirmation of resistance and additional susceptibility tests. The strains were stored at room temperature when they could not be processed the day of reception. Moreover, six frozen DNA sent to the Myc-NRC for suspicion of resistant TB between November 2018 and November 2019 were tested. Three were obtained from samples and three from cultures. DNA extraction was performed in the shipper's laboratories.

DNA Extraction

DNA extraction was performed using the GeneLEAD VIII system (Diagenode, Belgium) for clinical samples. Briefly, the principle of GeneLEAD is based on the DNA adsorption to magnetic particles after cell lysis; the DNA is recovered after a washing step followed by an elution. The required sample volume is 200 μ l and the elution volume may be 50, 100, or 200 μ l. Heat shock extraction was used for positive cultures and strains, as previously described (Brossier et al., 2010).

GeneLEAD VIII Platform

The platform was used with the R-DiaMTBComplex™ real-time PCR detection kit (Diagenode, Belgium). DNA extracted by GeneLEAD VIII system from clinical samples was directly used for Deeplex Myc-TB analysis.

Deeplex Myc-TB

The 24-plex PCR (Genoscreen, France) was then carried out according to the manufacturer's recommendations and the PCR products were sent at Institut Pasteur of Paris to be sequenced on the the Mutualized Platform for Microbiology (P2M) using the Nextera XT DNA Library Preparation kit (Illumina Inc.) and the NextSeq 500 sequencing system (Illumina Inc.). The raw data were uploaded and analyzed on a secure cloud platform with an automated analysis pipeline with integrated reference databases. For each MTBC isolate, the results of 18 main gene targets known to be involved in MTBC resistance to first- and second-line drugs were generated: *rpoB*, *inhA*, *fabG1*, *katG*, *ahpC*, *pncA*, *embB*, *gidB*, *rpsL*, *rrs*, *eis*, *tlyA*, *gyrA*, *gyrB*, *ethA*, *rrl*, *rplC*, and *rv0678*. The average depth of coverage (x) and the reference coverage (%) were worked out online by the GenoScreen pipeline for each resistance gene. Based on previously observed mutations at these loci and interrogation of the available databases, the strains were ranked as susceptible, resistant, or "undetermined resistant" to each antibiotic (Miotto et al., 2014; Walker et al., 2015; Feuerriegel et al., 2015; Miotto et al., 2017). In addition to antibiotic resistance prediction, MTBC strains were characterized at the species level with the *hsp65* gene, at the genotype level with phylogenetic SNPs, and at the spoligotype level with the presence-absence pattern of 43 direct repeats at the CRISPR locus (Kamerbeek et al., 1997; Dale et al., 2001).

Routine DST Procedures

The approach evaluated in the present study was compared to routine genotypic and phenotypic DST. The genetic variations involved in drug resistance were assessed by the line probe assays (MTBDRplus v2 and MTBDRsl v1, Hain Lifescience, Germany) or in-house PCR combined with Sanger sequencing of the genes responsible for anti-TB drug resistance, as previously reported (Brossier et al., 2017). Each MTBC isolate was typed using mycobacterial interspersed repetitive unit variable-number tandem repeat (MIRU-VNTR) (Supply et al., 2006). DST was performed on Löwenstein-Jensen medium using the proportion method with the following concentrations: RIF (40 mg/L), INH (0.1, 0.2, 1, and 10 mg/L), EMB (2 mg/L), STR (4 mg/L), AMK (30 mg/L), KAN (30 mg/L), CAP (40 mg/L), OFL (2 mg/L), MOX (2 mg/L), LZD (1 mg/L), and PTH (40 mg/L) (Canetti et al., 1963; World Health Organization, 2018). PZA and BDQ were tested on 7H11 using a concentration of 300 mg/L and 0.12–0.25 mg/L, respectively, according to the proportion method (Canetti et al., 1963; World Health Organization, 2018; Heifets and Sanchez, 2000; EUCAST, 2020).

RESULTS

The nature of the 112 clinical specimens and the 94 strains is described in **Table 1**. The bacterial load determined by microscopic examination of the 112 clinical specimens ranged from ≥100 acid-fast bacilli (AFB) per field ($n = 10$), 10 to 99 AFB per field ($n = 18$), 1 to 9 AFB per field ($n = 12$), to <1 AFB per

field but >10 on the slide ($n = 7$). Sixty-five samples were smear negative.

Performance of GeneLEAD to Detect MTBC in Clinical Samples

Among the 112 clinical samples, 63 (56%) were detected as containing MTBC DNA by the GeneLEAD assay (Table 2). Fifty-eight of these positive samples grew MTBC while one grew *Mycobacterium chelonae/immunogenum* (see ^a on Table 2). Interestingly, 16 of these 58 MTBC-positive samples were smear negative. Three AFB smear-positive samples were negative by GeneLEAD and grew *Mycobacterium xenopi* (see ^b on Table 2). Finally, discrepant results were observed for four samples that yielded positive GeneLEAD results while the cultures remained negative (see ^c and ^d on Table 2). One of them (^c) was weakly smear positive (<1 >10/slide), and the three others (^d) were smear negative. These four samples were actually obtained from patients diagnosed for active TB and under treatment at time of sampling and therefore were not considered as false positive. In contrast, the sample found MTBC positive by GeneLEAD but culture positive with *M. chelonae/immunogenum* (as identified by GenoType Mycobacterium CM-AS DNA assay) was unambiguously considered as a false-positive result by GeneLEAD. Finally, it is noticeable that no inhibition of amplification was observed in the

112 clinical specimens. Taking into account all the above results, sensitivity and specificity for GeneLEAD were 100% and 98%, respectively, for the samples studied (Table 3).

Performance of GeneLEAD/Deeplex Myc-TB for Species and Spoligotype Identification

The results produced by the Deeplex Myc-TB assay performed on DNA extracts obtained by GeneLEAD (for clinical samples) or by heat shock (for strains) were interpreted as follows: a “successful” identification was defined as an unambiguous *hsp65*-based species identification with minimum reference coverage of 50% and minimum average coverage depth of 35×. SNP-based and spoligotype-based phylogenetic lineage determination was not taken into account when *hsp65*-based identification failed. Two examples of unsuccessful identifications are shown on Figures 1A, B while an unsuccessful one is shown on Figure 1C. Overall, the 140 successful Deeplex Myc-TB results obtained for 46 clinical samples and 94 strains yielded an average reference coverage of 93.5% and an average coverage depth of 10,190× (data not shown). As shown in Table 3, the Deeplex Myc-TB assay successfully identified MTBC in 46/58 (79%) of the GeneLEAD-positive samples yielding MTBC-positive cultures. On the other hand, 54 culture-negative samples remained negative by Deeplex Myc-TB. Finally, MTBC

TABLE 2 | Summary of the GeneLEAD results on clinical samples.

GeneLEAD results	Clinical samples						
	Culture positive				Culture negative		
	AFB per field		AFB per field		AFB per field		AFB per field
	≥100	10–99	1–9	<1 >10/slide	0	<1 >10/slide	0
Positive ($n = 63$)	10	17	11	5 ^a	16	1 ^c	3 ^d
Negative ($n = 49$)	0	1 ^b	1 ^b	1 ^b	0	0	46
Total ($n = 112$)	10	18	12	6	16	1	49

^aIncluding one sample that grew *M. chelonae/immunogenum*.

^bIdentified as *M. xenopi*.

^cSample from a patient under treatment for active TB.

^dThree AFB-negative samples from patients under treatment for active TB.

TABLE 3 | Performances of GeneLEAD/Deeplex Myc-TB assay and microscopic examination for the detection of *M. tuberculosis* complex in 112 specimens, in comparison with culture.

MTBC culture result	MTBC identification by GeneLEAD		MTBC identification by Deeplex Myc-TB		Microscopic examination	
	Positive (n)	Negative (n)	Positive (n)	Negative (n)	Positive (n)	Negative (n)
Positive	58	0	46	12	42	16
Negative	5 ^{a,c,d}	49 ^b	0	54 ^{a,b,c,d}	5 ^{a,b,c}	49 ^d
Sensitivity, %	100		79.3		72.4	
[95% CI]	[100–100]		[71.8–86.8]		[64.1–80.7]	
Specificity, %	98		100		90.7	
[95% CI]	[95.4–100.6]		[100–100]		[85.3–96.1]	
Cohen's kappa	0.91		0.79		0.63	
[95% CI]	[0.86–0.96]		[0.71–0.87]		[0.54–0.72]	

^aIncluding one sample growing *M. chelonae/immunogenum*.

^bIncluding three samples growing *M. xenopi*.

^cOne sample with <1 AFB/field and >10 AFB/slide from a patient under treatment for active TB: not counted as false positive by GeneLEAD.

^dThree AFB-negative samples from patients under treatment for active TB: not counted as false positive by GeneLEAD.

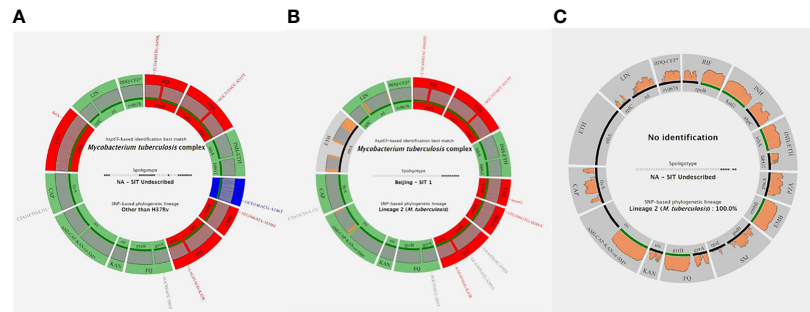


FIGURE 1 | Three examples of Deeplex Myc-TB results. **(A)** Successful Deeplex Myc-TB result. **(B)** Successful Deeplex Myc-TB result with deletion in *ethA*. **(C)** Failed Deeplex Myc-TB result. *hsp65*-based identification best match, spoligotype, and SNP-based lineage identification are shown in the center of the map. Targeted loci are displayed in groups, depending on which antibiotic(s) they impact: *rpoB* for rifampicin (RIF); *katG-ahpC* for isoniazid (INH); *inhA-fabG1* for INH and ethionamide (ETH); *pncA* for pyrazinamide (PZA); *embB* for ethambutol (EMB); *rpsL-gidB* for streptomycin (SM); *gyrA-gyrB* for fluoroquinolones (FQ); *eis* for kanamycin (KAN); *rrs* for amikacin, capreomycin, and kanamycin (AMI-CAP-KAN); *tlyA* for CAP, *ethA* for ETH, *rplC-rrl* for linezolid (LNZ); and *rv0678* for bedaquiline-clofazimine (BDQ-CFZ). Wild-type alleles are shown in green, mutant alleles with mutations linked to resistance in red, and uncharacterized variants in blue (dark blue if the SNV is fixed, light blue if the SNV is unfixed). Gray color indicates that more than 5% of the locus is missing (e.g., in *ethA* in **B**). Sequencing depths are indicated above the circle representing the amplified genes, colored in gray if the read depth is >100× on average, and in orange if the read depth is <100× on average. Filled lines shown above the loci names are colored according to the amplification efficiency of each gene: green if >95% of the locus has been sequenced, and black if <95% of the locus has been sequenced. Each variant is noted with the reference codon, codon number, and the alternate codon, followed by the reference amino acid, amino acid position, and the mutated amino acid.

was not identified by Deeplex Myc-TB in 12 GeneLEAD-positive samples yielding MTBC-positive cultures, which were considered as false negative result by this method. Almost all of these (11/12) were obtained from smear-negative samples ($n = 8$) or samples with a weak smear positivity (<1/field >10/slide, $n = 3$). No false positive was observed by Deeplex Myc-TB testing. Based on these results, sensitivity and specificity of Deeplex Myc-TB assay performed from GeneLEAD extracted DNAs to identify MTBC were 79.3% and 100%, respectively.

Compared with the culture, sensitivity and specificity of microscopic examination performed on the 112 samples were 72.4% and 90.7%, respectively (**Table 3**).

Performance of GeneLEAD/Deeplex Myc-TB to Detect AntiTB Drug Resistance in MTBC

The results produced by the Deeplex Myc-TB assay performed on DNA extract to detect antiTB drug resistance were evaluated on the 94 MTBC strains, and the 46 clinical specimens for which MTBC was detected by Deeplex Myc-TB and routine DST results were available.

The results yielded by Deeplex Myc-TB were concordant concerning rifampicin (RIF) for 119 (89.5%) of the 133 MTBC isolates tested (44/46 clinical culture-positive samples and 89/94 strains) (**Table 4**). With respect to the 44 clinical samples, concordance was 84% (24 RIF-R and 13 RIF-S), whereas non-synonymous uncharacterized variants (NSUVs) of *rpoB* were identified by Deeplex Myc-TB for six clinical samples (13.5%) and Deeplex Myc-TB failed (no amplification) in a smear-negative specimen (2%). With respect to the 89 MTBC strains, concordance was 92% (54 RIF-R and 28 RIF-S), while Deeplex Myc-TB found NSUVs in six strains (7%) and failed to yield

result in one strain cultured in liquid MGIT (1%). Among a total of 90 *rpoB* mutations detected by Deeplex Myc-TB, the assay reported 12 (13%) NSUVs with unknown association with drug susceptibility. As shown in the **Supplementary Table 1**, the result of phenotypic DST for these 12 NSUVs was susceptible in six isolates harboring mutations M387T, D435Y, and L430P, and resistant in six others showing mutations D435Y, D435Y-Q429R, D435Y-I491L, and D435Y-S441T. Of note, two RIF-R strains carrying a rare resistance-associated mutation, S450F, encoded by a double substitution TCG450TTC (results confirmed by Sanger sequencing, data not shown), were reported by Deeplex Myc-TB to carry two distinct single mutations, TCG450TTG (99.6%) coding for the Rif-R S450L substitution, and the synonymous TCG450TCC (S450S) substitution (98.8%). Finally, another noticeable result was the detection by Deeplex Myc-TB of the rare V170F amino acid substitution (confirmed by Sanger sequencing) in two RIF-R strains (data not shown). Xpert and MTBDRplus DNA assays did not identify these mutations because they are located outside the rifampicin resistance determining region (RRDR) screened by these tests.

Concerning isoniazid (INH), the concordance between Deeplex Myc-TB and phenotypic DST results was 92% (122/133) (**Table 4**) including 40/44 (91%) culture-positive samples (13 INH-S and 27 INH-R) and 82/89 (92%) strains (13 INH-S and 69 INH-R). Two (1.5%) Deeplex Myc-TB tests failed (no amplification for one smear-negative sample and one liquid culture) and nine discordant or uncharacterized mutations were identified (**Table 4**). Of the latter, seven corresponded to NSUVs that were all identified in INH-S strains and are detailed in **Supplementary Table 1**. Finally, no mutation was detected in two strains resistant to INH at concentrations of 0.1 and 0.2 mg/L, respectively (data not shown).

TABLE 4 | Overall concordance between Deeplex Myc-TB and phenotypic DST.

Drug	Total	Concordant (culture-positive clinical samples/strains)	% (culture-positive clinical samples/strains)	Negative amplification by Deeplex Myc-TB	Discordant results or uncharacterized mutations by Deeplex Myc-TB ^a
Rifampicin	133	119 (37/82)	89.5 (84/92)	2	12
Isoniazid	133	122 (40/82)	92 (90/92)	2	9
MDR	75	69 (23/46)	92 (92/92)	0	6
Ethionamide	80	44 (16/28)	55 (64/51)	1	35 ^b
Pyrazinamide	104	88 (27/61)	84.5 (93/81)	1	15
Ethambutol	130	106 (37/69)	81.5 (84/80)	1	23 ^c
Fluoroquinolones	120	112 (28/84)	93 (87.5/95)	1	7
Kanamycin/ amikacin	86	74 (25/49)	86 (86/86)	1	11 ^d
Capreomycin	83	80 (25/55)	96.5 (96/96.5)	1	2
Streptomycin	128	94 (32/62)	73 (78/72)	1	33 ^e
Linezolid	84	79 (23/56)	94 (88/96.5)	3	2 ^f
Bedaquiline	83	76 (22/54)	91.5 (88/93)	1	6 ^g

^aMutations detailed on **Supplementary Table 1**.

^bIncluding one discrepancy between a -15 c->t mutation in the *inhA* promoter and the ETH-S DST result for one strain.

^cIncluding 11 EMB-R-conferring mutations giving discrepant results (EMB-S) with DST (M306I, G406A or D, D354A, Q497R, S297A, and Y319S).

^dIncluding four discrepancies between Deeplex Myc-TB and DST at the level of the *eis* promoter positions -10g->a (*n* = 1), -14c->t (*n* = 1), and -37g->t (*n* = 2), and 5 in *rrs* at position c1402t (*n* = 1), c517t (*n* = 2), and a906g (*n* = 2).

^eIncluding 28 uncharacterized mutations.

^fTwo LNZ-R strains with no detectable mutations in *rrl* nor in *rrpC*.

^gIncluding two discrepancies observed in one BDQ-R strain with a frameshift not detected by Deeplex Myc-TB, and one BDQ-S strain harboring a E55D substitution in *Rv0678*.

Importantly, Deeplex Myc-TB unambiguously detected resistance to both RIF and INH, i.e., multidrug resistant (MDR), in 23/25 (92%) clinical samples and 46/50 (92%) strains (**Table 4**). The six discordant results corresponded to the NSUV in *rpoB* coding for D435Y, which confers a low-level resistance to RIF and was identified either alone (two RIF-S strains), or in association with S441T (*n* = 1), Q429R (*n* = 1), and I491L (*n* = 2) in MDR strains (**Supplementary Table 1**). Thus, by interpreting the D435Y mutation as associated with RIF-R, even though the level of resistance can be low when the mutation is present alone in *rpoB*, the Deeplex Myc-TB assay was able to detect 100% of the MDR *M. tuberculosis* tested in this report.

We analyzed 80 samples with validated ethionamide (ETH) phenotypes, resulting in a poor value (55%) of agreement between Deeplex Myc-TB and DST due to 18 uncharacterized mutations, 17 divergent results, and one negative Deeplex Myc-TB PCR. The 18 NSUVs are detailed in the **Supplementary Data** and **Supplementary Table 1**. Regarding the 17 divergent results, no mutation was detected in *ethA*, or in *inhA* and its promoter for 16 ETH-R isolates (**Supplementary Table 1**). Among the remaining discrepancies, a -15 c->t substitution in the *inhA* promoter (a mutation usually involved in low-level resistance to ETH) was found in a strain susceptible to ETH (**Supplementary Table 1**).

Prediction of resistance to the two other first-line drugs pyrazinamide (PZA) and ethambutol (EMB) is summarized in **Table 4**. For PZA, 104 tests were performed on 29 clinical samples and 75 strains whose PZA DST results were available. Globally, 27/29 (93%) and 61/75 (81%) Deeplex Myc-TB results were in agreement with the phenotypic DST results, giving a concordance of 84.5% between the two methods. Deeplex Myc-TB interpreted 11 single-nucleotide variants (SNVs) as NSUVs that are detailed in **Supplementary Table 1**. For EMB, 130 samples with available DST results were analyzed, indicating a concordance of 81.5% with 106 concordant results. Apart from one PCR negative Deeplex Myc-TB test, 11 of the 23 remaining

results corresponded to well-characterized EMB-R mutations giving discrepant results since they were observed in EMB-S strains: M306I (*n* = 4), G406A (*n* = 2) or D (*n* = 1), D354A (*n* = 1), Q497R (*n* = 1), S297A (*n* = 1), and Y319S (*n* = 1) (see ^c on **Table 4**). Twelve uncharacterized mutations were not interpreted by Deeplex Myc-TB (see details in **Supplementary Data** and **Supplementary Table 1**). Finally, one clinical strain resistant to EMB did not show mutation by Deeplex Myc-TB, or by other molecular approaches (**Supplementary Table 1**).

Of the 120 Deeplex Myc-TB tests done on samples with available DST results for fluoroquinolones (FQ), 112 were concordant with the phenotype of resistance, giving a concordance value of 93% (**Table 4**). The observed discrepancies were due to one ofloxacin (OFX) and moxifloxacin (MOX) susceptible strain harboring a A90V substitution in *GyrA*, which usually confers OFX-R (data not shown), six NSUVs depicted on **Supplementary Table 1**, and one Deeplex Myc-TB PCR failure.

With 94 concordant results for 128 tests, the agreement between Deeplex Myc-TB and DST for STR was 73%. Among the concordant STR-R results, RpsL substitutions K43R and K88R represented 83% of the resistance mutations. One Deeplex Myc-TB was PCR negative. Five gave rise to discrepancies with (i) two STR-S strains interpreted as STR-R by Deeplex Myc-TB because of the presence of c492t in *rrs* and a frameshift in *gidB*, respectively; (ii) one STR-R strain considered as STR-S by Deeplex Myc-TB despite the presence of a G73E substitution in *GidB*; and (iii) two strains without mutation in *rrs*, *gidB*, and *rpsL*, which appeared to be STR-R by DST (data not shown). Finally, we noted the presence of 28 uncharacterized mutations not interpreted by Deeplex Myc-TB that are summarized on **Supplementary Table 1** (see details in **Supplementary Data**).

The concordance value between Deeplex Myc-TB and DST determined from a set of 86 samples for injectable

aminoglycosides, including KAN and AMK, was 86% (74/86, **Table 4**). We had one negative Deeplex Myc-TB PCR and 11 discordant results between Deeplex Myc-TB and DST. Nine of the 11 (see ^d in **Table 4**) were due to (i) four discrepancies at the level of the *eis* promoter at positions -10g->a ($n = 1$), -14 c->t ($n = 1$), and -37g->t ($n = 2$), all found in strains appearing to be both KAN-S and AMK-S, and (ii) five mutations in *rrs* at position c1402t ($n = 1$), c517t ($n = 2$), and a906g ($n = 2$) identified in KAN-S/AMK-S isolates in our study (data not shown). As shown in **Supplementary Table 1**, we also observed two NSUVs in the *eis* promoter (**Supplementary Table 1**). Finally, with 80 concordant results of 83 tests, the agreement between Deeplex Myc-TB and DST for capreomycin (CAP) is 96.5% (**Table 4**). We noticed one negative Deeplex Myc-TB amplification and two discrepancies including one uncharacterized substitution F185L in TlyA in one CAP-R strain (**Supplementary Table 1**), and one discordant result between Deeplex Myc-TB (CAP-S) and DST (CAP-R) in one strain having no mutation in the *rrs* region 1400, or in *tlyA* (data not shown).

With 79/84 Deeplex Myc-TB results in accordance with DST, the concordance value was high for linezolid (LNZ) (94%), but we noticed three Deeplex Myc-TB failures and two LNZ-R strains with no detectable mutations in *rrl* or in *rplC* (**Table 4**). We observed no uncharacterized mutations, and the only LNZ-R strain was due to the well-known substitution C154R (data not shown) (Pi et al., 2019).

As for LNZ, the concordance value for bedaquiline (BDQ) was high, 91.5% (76/83). Among the 76 concordant results, there were two BDQ-R mutants showing two missense mutations F100C and S151P in Rv0678 (data not shown). On the other hand, Deeplex Myc-TB failed in one assay and yielded two discordant results and four uncharacterized mutations (**Supplementary Table 1**). The two discordant results were due to (i) one BDQ-S strain with an E55D mutation interpreted as BDQ-R by Deeplex Myc-TB, and (ii) a wild-type strain displaying BDQ-R at low-level (R to BDQ 0.12 mg/L but S at 0.25 mg/L) (see ^s in **Table 4**).

Performance of GeneLEAD/Deeplex Myc-TB to Identify MTBC Lineages and Possible Contacts Between Patients

The performance of the GeneLEAD/Deeplex Myc-TB assay for MTBC genotyping was compared to the MIRU-VNTR data that were available for 134 of the 140 clinical culture-positive samples and strains (**Supplementary Table 2**). Globally, MTB genotyping by the Deeplex Myc-TB assay from cultured strains identified the SIT number in 87% of the tests, and in 66% from clinical samples (data not shown). According to our results, a fairly good agreement between Deeplex Myc-TB spoligotyping and MIRU-VNTR was observed in lineages L1 (71% of agreement), L3 (75%), L4 LAM (72%), Haarlem (88%), X, Cameroon, and TUR (100% each). However, the concordance value dramatically dropped in L4 Ghana (42%) and in L2 Beijing (57%). In the latter clade, Deeplex Myc-TB spoligotyping, which is known to be a low discrimination approach as previously

reported (Liu et al., 2014), classified 33 strains as SIT 1 while MIRU-VNTR classified them into 19 distinct patterns (**Supplementary Table 2**). Similarly, five isolates of SIT 42 (LAM9) corresponded to four distinct MIRU Mtbc15-9 codes, while nine isolates of SIT 53 were linked to eight different MIRU Mtbc15-9 codes, which were related to two clades (Ghana for eight of them and NEW for one strain); this low discriminatory power was also reported in these sublineages (Wondale et al., 2020). No epidemiological link was found within six Deeplex Myc-TB clusters representing a total of 53 strains related to SIT 1 ($n = 31$), SIT 265 ($n = 5$), SIT 42 ($n = 5$), SIT 20 ($n = 2$), SIT 53 ($n = 8$), and SIT 262 ($n = 2$). By comparison, MIRU-VNTR typing suggested eight clusters of epidemiologically unrelated strains for a total of 32 strains, e.g., for Mtbc15-9 clonal complexes 100-32 ($n = 14$), 94-32 ($n = 4$), and six other clusters gathering two to three strains (**Supplementary Table 2**). Notably, MIRU-VNTR typing and spoligotyping identified the five cases of two patients with bacteriologically and epidemiologically proven transmission. A detailed description of genotype results for the other clades is available in the **Supplementary data**.

Time to Results and Cost of the GeneLEAD/Deeplex Myc-TB Approach

Median time from GeneLEAD clinical sample or strain reception to Deeplex Myc-TB and Sanger reporting was 8 days (IQR 7–13; 95 recorded) and 18.7 days (IQR 1–59; 73 recorded), respectively. Per strain, the cost of one Deeplex Myc-TB test (including DNA extraction with GeneLEAD, PCR, libraries preparation, and sequencing) was 1.5-fold cheaper than a complete Sanger sequencing.

DISCUSSION

In this prospective study, we assessed the performance of GeneLEAD combined to Deeplex Myc-TB test for identifying MTBC, predicting anti-TB drug susceptibility and MTBC genotyping. GeneLEAD platform as DNA extractor has been chosen based on its theoretical high performances to produce a DNA of high quality directly from clinical samples, and to identify automatically from the extracted DNA the presence of MTBC by real-time PCR.

Performance of GeneLEAD/Deeplex Myc-TB to Detect MTBC in Positive Samples GeneLEAD Results

To our knowledge, our report is the first evaluation of the GeneLEAD system published in the literature. With 100% of the MTBC-positive cultures detected ($n = 58$), our results confirm that GeneLEAD VIII is a very promising platform for the diagnosis of TB from clinical samples, although a study with a larger sample size is needed to determine the performance of the system more accurately. It is very interesting to note that 16 (28%) out of the 58 samples that grew MTBC were smear negative, suggesting that GeneLEAD could be sensitive enough

to yield detectable amounts of DNA from paucibacillary samples. No false-negative result and only one false-positive result (GeneLEAD positive–culture positive with *M. chelonae/immunogenum*) was detected, leading to a sensitivity of 100% and a specificity of 98% in the collection of the 112 samples tested. One has to note that the GeneLEAD false positive result was circumvented when the extracted DNA was further analyzed by Deeplex, which identified *M. chelonae/immunogenum*.

GeneLEAD/Deeplex Myc-TB Results

The Deeplex Myc-TB assay applied to GeneLEAD extracted DNA displayed performances slightly lower than the GeneLEAD alone for detecting MTBC. The sensitivity of the coupled assay was 79.3% vs. 100% for GeneLEAD (Table 3) because of 12/58 false-negative PCR carried out from MTBC culture-positive samples. All the false-negative GeneLEAD/Deeplex Myc-TB results, but one, were observed in either AFB negative samples ($n = 8$) or paucibacillary samples (<1 AFB/field and >10 AFB/slide; $n = 3$). However, one respiratory sample with 1–9 AFB/field gave a false-negative result by GeneLEAD/Deeplex Myc-TB assay. No false-positive result was obtained by coupling GeneLEAD and Deeplex Myc-TB, due to the ability of Deeplex Myc-TB to identify mycobacterial species (MTBC and >100 non-tuberculous mycobacterial species). With a sensitivity of 79.3% and a specificity of 100%, the coupled GeneLEAD/Deeplex Myc-TB assay showed encouraging performances. Compared to published results obtained with other molecular assays such as MTBDRplus and Xpert, the GeneLEAD/Deeplex Myc-TB assay could be more specific but less sensitive (Horne et al., 2019).

Performance of GeneLEAD/Deeplex Myc-TB to Detect AntiTB Drug Resistance in MTBC

The average coverage depth that can be achieved with Deeplex Myc-TB is by far greater than that reached with WGS by NGS, whether from culture or sample, due to initial PCR amplification (Dohál et al., 2020). In our study, the 140 successful Deeplex Myc-TB results obtained for 46 clinical specimens and 94 cultured strains yielded a reference coverage of 93.5% and an average coverage depth of 10,190 \times , thus ensuring the user to obtain high-confidence mutation calls, including those of minor subpopulations in the case of heteroresistance. The success rate was 97.4% (37/38) for samples displaying at least 1–9 AFB/field on microscopy examination. By contrast, considering the 63 GeneLEAD-positive samples obtained from clinical samples, Deeplex Myc-TB failed in 17 cases (27%), mostly in smear-negative samples.

Concordance

To facilitate the evaluation of Deeplex Myc-TB, we have added to the clinical samples a selection of clinical MTBC strains from the Myc-NRC representing a wide diversity of resistance traits to first- and second-line antiTB drugs. When successful, 85.4% of susceptibility predictions yielded by Deeplex Myc-TB were concordant with the results of phenotypic DST. As shown in Table 4, we observed a high degree of consistency between the

Deeplex Myc-TB results and the DST results for RIF, INH, FQ, CAP, LNZ, and BDQ, which allows to detect MDR strains and to determine the susceptibility of the three drugs that have to be prioritized for longer MDR-TB regimens, according to WHO, namely, FQ, LNZ, and BDQ (World Health Organization, 2018). Since the results obtained for RIF and INH appeared to be robust, we were expecting to have very good results for MDR identification by Deeplex Myc-TB as well. Indeed, the rough concordance value worked out from non-interpreted data was excellent (92%). After interpreting the data by assuming that a clinical isolate is MDR when RpoB-D435Y is detected, even though it is associated with a low-level resistance to RIF, we finally concluded that all MDR strains ($n = 75$) were identified by the Deeplex Myc-TB test.

The concordance values determined for PZA, EMB, and KAN/AMK were somewhat lower than those discussed above, and were poor for STR and ETH. Such differences were mostly due to two points: (i) the proportion of uncharacterized mutations detected by Deeplex Myc-TB for a given resistance mechanism and (ii) the robustness of the susceptibility/resistance determination by DST for a given antiTB drug. Considering drugs such as RIF, INH, and FQ, the mechanisms of resistance to these drugs are extensively documented and resistance is known to stem from a limited number of very well-documented SNVs located in well-defined short stretches of the resistance genes. By contrast, for drugs such as PZA, STR, and ETH, the resistance can occur by acquisition of a wide range of mutations that can affect any position on the resistance gene plus the upstream promoter regions. For this category of drugs, the interpretations of NSUVs can be a tricky process hampering the reliability of the interpreted genotypic antibiogram.

NSUVs

For RIF, the proportion of NSUVs related to the total number of mutations detected by Deeplex Myc-TB was 12.8%. Most of the discordant predictions were due to low-level resistance mutations poorly detected by phenotypic DST when only critical concentrations are tested, which are frequently identified in susceptible strains and resistant ones as well. Here, the substitution RpoB-D435Y was detected in two RIF-S and six RIF-R strains (Supplementary Table 1), and L430P was observed in two RIF-S strains even if the mutation was previously reported to be associated to low-level resistance to RIF (Deun et al., 2013; Miotto et al., 2018). From the therapeutic point of view, these two mutations decrease the RIF activity and can be associated with treatment failure using standard regimens that include 600 mg of RIF daily even if they can occur in strains detected as susceptible by DST (Williamson et al., 2012). Compared to other commercial and in-house molecular assays, Deeplex Myc-TB can detect mutations that other tests are unable to detect. With respect to RIF, molecular assays, such as the DNA strip assay MTBDRplus (Hain) or in-house PCR-sequencing of the rifampicin-resistance determining region (RRDR) of *rpoB*, cannot detect rare mutations outside the RRDR (Zaw et al., 2018). By contrast, Deeplex Myc-TB, due to its design, allows to identify any mutation outside the RRDR. In our study, we

detected M387T in two Rif-S strains, and S450F and V170F in four Rif-R strains.

For INH, NSUVs represented only 9.5% of the SNVs found in *katG*, *inhA* and promoter, and *ahpC* and promoter. A striking point when compared to RIF is that all the NSUVs detected by Deeplex Myc-TB were found in INH-S strains (**Supplementary Table 1**). However, it should be noted here that several of them were detected as minority variants. Other NSUVs were phylogenetic markers, such as -142g->a in *ahpC*, which was detected in three EAI isolates, and is a phylogenetic marker of the EAI family strains. It is very likely that it is not involved in INH-R.

By contrast to INH, all but two NSUVs implicated in ETH resistance were observed in ETH-R strains (**Supplementary Table 1**). They represented 52% of the total number of SNVs found in *ethA*. All eight missense NSUVs found in *EthA* exhibited resistance-associated mutation characteristics as they primarily affected charged or polar residues (R207C, R239L, Q246R, S266R, and N379D) or, alternatively, introduced a proline or a STOP codon into the *EthA* protein (L272P, L440P, and Q459STOP) (Meehan et al., 2019). Frameshift mutations are also frequent. In our strain series, eight insertions or deletions leading to frameshifts in *EthA* were observed in ETH-R strains. It would be tempting here to advise Deeplex Myc-TB users to take into account the nature of the amino acid substitutions to give a phenotype interpreted from NSUVs. However, the physicochemical rules driving the effect of amino acid substitutions in proteins are too complex to consider that such an approach can give reliable results. If applied, confirmation by DST of the interpreted phenotype is mandatory to validate the genotypic interpretation.

For PZA, a very similar situation is encountered. In the *pncA* gene, 24.5% of the SNVs were NSUVs. A critical point with these mutations is to correctly interpret their effects at the level of the structure/function relationships of *PncA* because of the wide range of diversity of the mutations that can confer PZA-R, and also because a significant proportion of PZA-S clinical isolates display neutral *PncA* amino acid substitutions that have no significant effect on the pyrazinamidase activity of the enzyme and, so, on PZA susceptibility (Petrella et al., 2011).

The results obtained for EMB were harder to decipher. With 18% of NSUVs among the total number of SNVs, the discrepancies between Deeplex Myc-TB and phenotypic results were not only due to the presence of 12 NSUVs (**Supplementary Table 1**) but also due to the identification of 11 well-known EMB-R-conferring mutations giving rise to discrepant results (EMB-S) with DST (**Table 4**). One explanation for these results could be the preparation of the medium causing degradation of EMB due to the heating procedure when the DST is carried out with the Löwenstein-Jensen medium. In addition, the critical concentration chosen for the DST of EMB in our study was based on the recommendations of the proportion method (European Centre for Disease Prevention and Control, 2018), i.e., 2 mg/L of EMB. One cannot exclude that this concentration is too low compared to other reference DST methods and could contribute to the obtention of false-susceptible mutants

(Schön et al., 2017). Nevertheless, four unique NSUVs not interpreted by Deeplex Myc-TB (M306L, Y334H, N296H, and Q445R) were observed in EMB-R strains. Therefore, interpreting these mutations as EMB-R, as previously suggested (Brossier et al., 2015), could significantly improve the predictiveness of EMB-R by Deeplex Myc-TB.

NSUVs represented 21% of the SNVs present in *gyrA* and *gyrB*, with only one in *gyrA* and 5 in *gyrB* (**Supplementary Table 1**). H70R in *gyrA* is an uncommon mutation previously described in a strain resistant to levofloxacin in China (Yin and Yu, 2010). With respect to the four other unique NSUVs found in *GyrB* (A403S, A423V, P450S, and frameshift) in FQ-S strains, they are located far from the *GyrB* QRDR in agreement with the susceptibility to FQ of the corresponding strains (Maruri et al., 2012). In addition, the frameshift was detected as minority mutation (7%) and might represent a yet unselected transitory event.

For the three injectable aminoglycosides, we found very few NSUVs in the genes involved in resistance to these drugs (two in the *eis* promoter and one in *tlyA*, representing 11% of all the SNVs present in the genes *rrs*, *eis*, and *tlyA*) (**Supplementary Table 1**). Since they are seemingly infrequent in clinical isolates, they should not significantly impact the Deeplex Myc-TB results. On the other hand, it is worth to mention here that Deeplex Myc-TB analysis of *rrs* and *eis* genes in our study yielded nine discrepancies between genotype and phenotype, 44% of them being located into the *eis* promoter and 56% in *rrs* (**Table 4**). The nine mutants were observed in strains KAN-S and AMK-S and represented 39% of the KAN-R and AMK-R SNVs detected in our evaluation. Such results can be put in parallel to those described above for EMB and question the reliability of the proportion method for KAN and AMK resistance evaluation, especially for mutations at positions -10, -14, and -37 of the *eis* promoter, which are assumed to confer a low-level resistance to kanamycin (Zaunbrecher et al., 2009; Pholwat et al., 2016). Another hypothesis is that other factors, not taken into account here, could modulate the effects of KAN/AMK-R SNVs, such as *whib7* previously suggested to be implicated in modifications of the activity level of KAN (Reeves et al., 2013).

Strains resistant to LNZ and BDQ have not been investigated in previous reports on Deeplex Myc-TB (Jouet et al., 2021; Kambli et al., 2021). In our study, such strains remain scarce. For LNZ, only one SNV in *rplC* determining the well-known substitution C154R was observed in a resistant strain (Pi et al., 2019), and we did not find NSUV in the other LNZ-R strains tested. For BDQ, it has been previously reported that mutations in Rv0678 are mainly responsible for low-level resistance to BDQ rather than high-level resistance (Nguyen et al., 2018). Accordingly, six strains displayed low-level resistance to BDQ in our study (7.3% of the total number of strains tested for this drug), two with frameshift mutations, two with BDQ-R conferring SNVs (F100C and S151P), one with a NSUV (R89P), and one with no detectable mutation. On the other hand, Deeplex Myc-TB found two mutations in Rv0678 in BDQ-S strains, one with a double mutation I67T-Y92STOP with a proportion of variant of 30% (**Supplementary Table 1**), and the other with the E55D substitution (**Table 4**) which is a SNV

preserving the acidic function with probably no significant impact on the efflux function of Rv0678, as previously suggested (Martinez et al., 2018). The accuracy of detection of BDQ resistance, even if it remains still scarce to date, is an important challenge for MDR patient therapeutic decision. Our results underline the importance of continuing the study of resistance mechanisms to this drug.

Detection of Minority Subpopulations

An attractive aspect of the Deeplex Myc-TB approach is its capacity to detect minority variants (up to 3%) (Jouet et al., 2021). Indeed, if minority variants can be easily detected from strains with media containing antibiotics, e.g., by using the proportion method, they could be underrepresented by phenotypic DST when starting from samples due to the fitness cost of some resistance mutations (Gygli et al., 2017). However, although treatment outcomes have been well correlated with phenotypic DST, more clinical studies are needed to evaluate the impact of minority variants that are detected by Deeplex Myc-TB from clinical samples.

Significant Number of Resistant Strains Without Mutations

A significant number of strains displayed phenotypic resistance that remained unexplained by the Deeplex Myc-TB assay. In particular, Deeplex Myc-TB detected no mutation in 16 ETH-R clinical strains, four PZA-R, two INH-R, two STR-R, two LNZ-R, one EMB-R, and one CAP-R (Supplementary Table 1). For most of the drugs, the observed resistant isolates displaying wild-type profiles can be explained by the lack of some genomic targets in the Deeplex Myc-TB assay that does not cover all the putative coding sequences previously described in drug resistance, e.g., *atpE* and *pepQ* for bedaquiline (Nguyen et al., 2018). For EMB, the PCR-sequencing spans the entire *embB* gene but not the *embB* promoter located in the *embC-embA* intergenic region. For ETH, several additional putative targets have been described in resistant strains (Vilchère and Jacobs, 2014; Zhang et al., 2017). They are not accessible to the Deeplex Myc-TB assay and could possibly explain the high number of ETH-R/wild-type genotypic results observed for this drug. Similarly, it would be useful to consider additional targets to the existing Deeplex Myc-TB panel in order to enlarge test coverage for the newest anti-TB drugs. Most importantly, *fgd1*, *fbiC*, *fbiA*, *fbiB*, and *ddn* are very interesting targets for predicting resistance to pretomanid, a very promising anti-TB drug, which would be welcome in the test (Dookie et al., 2018; Hameed et al., 2018; Conradie et al., 2020).

Performance of GeneLEAD/Deeplex Myc-TB to Identify MTBC Lineages and Possible Contacts Between Patients

Deeplex Myc-TB also provides the determination of spoligotype, which can be used to highlight potential patient-to-patient transmissions and laboratory cross-contaminations, and identify recent transmission versus reactivation (Kamerbeek et al., 1997; Dale et al., 2001; van der Zanden et al., 2002; Supply et al., 2006; Demay et al., 2012). Here, Deeplex Myc-TB failed to identify the SIT numbers in 19 of 134 (14%) MTBC strains

for which MIRU-VNTR results were available. Some of the spoligotyping patterns have not yet been reported in the SITVIT database and correspond to orphans. Non-interpretable SIT numbers were found mainly in the S (L4), West African (L5 and L6), and EAI (L1) isolates (100%, 100%, and 29%, respectively). Similar figures were reported in other literature collections (Vanhomwegen et al., 2011; Puerto et al., 2015; Shi et al., 2018).

When the spoligotype profiles obtained by Deeplex Myc-TB were compared to those obtained by MIRU-VNTR typing, a striking difference was the number of clusters identified by each typing method, with 16 clusters of two to 16 strains, plus 85 unclustered strains with unique MIRU codes for MIRU-VNTR typing, and 10 clusters of two to 33 strains, plus 52 unrelated strains with unique SIT numbers for spoligotyping (Supplementary Table 2). In previous reports, it has been noted that the specific discriminatory power of spoligotyping is lower than that of MIRU-VNTR, which overestimates the transmission of TB (Scott et al., 2005). Here, we confirm the lower specificity (defined as the percentage of isolates with unique pattern) of spoligotyping compared to MIRU-VNTR (39% versus 63.5%, respectively), in particular within the Beijing family as previously reported (Liu et al., 2014). To circumvent this low discriminatory power, the clusters determined by spoligotyping have to be further studied by MIRU-VNTR analysis or by WGS typing, as already suggested (Oelemann et al., 2007; Rasoahanimitalisoa et al., 2017; Nikolayevskyy et al., 2019). Despite these drawbacks, it is generally recognized that most newly acquired infections are not detected by traditional contact tracing (Small et al., 1994; van Deutekom et al., 1997; Pfyffer et al., 1998). Therefore, DNA typing remains potentially useful in identifying non-suspect sources of transmission. The delay between suspicion of TB and the obtention of MIRU-VNTR data (usually about 1–2 months) is a major disadvantage that could be overcome by using the spoligotyping results provided by Deeplex Myc-TB, which can be made available rapidly in the GeneLEAD/Deeplex Myc-TB strategy.

Time to Results of the GeneLEAD/Deeplex Myc-TB Approach

In the present study performed on a limited set of selected clinical samples and strains, we demonstrated at the level of a laboratory with national responsibilities that GeneLEAD/Deeplex Myc-TB can provide results on average 10 days earlier than the classical PCR-Sanger sequencing approach (data not shown). In this situation, GeneLEAD/Deeplex Myc-TB was about 1.5 less expensive than traditional routine genotyping methods if we consider that it allows the identification in a single experiment of the species, the spoligotype, and the genotypic profile of 18 resistance genes among which some genes such as *katG* would require up to 10 PCR-sequencing reactions to be fully characterized (Brossier et al., 2009). In addition, National Multidisciplinary Consultation Meetings (MCM) are held in Myc-NRC to propose the best possible cares based on microbiological, clinical, epidemiological, and molecular data (Guglielmetti et al., 2019). After our first experience limited to several clinical cases recently reviewed in MCM, it can be estimated that the GeneLEAD/Deeplex Myc-TB

approach could reduce the time to treatment optimization by approximately 5–6 weeks.

Limitations

Despite very promising performances, the capacity of the GeneLEAD/Deplex Myc-TB approach to modify the strategy for detecting MDR and XDR TB should be evaluated in local context, in particular the local prevalence of drug resistance, the availability of WGS capacities with low turnaround time for results, and the operational responsiveness of healthcare system. For instance, we used here a high-throughput sequencing platform that provides raw data in 3 days after receiving the multiplex PCR samples, a time frame that cannot be met by all platforms. However, it is expected that the recent development of compact, portable NGS instruments will also make it possible to clinically diagnose drug-resistant TB with a Deplex Myc-TB-based approach in low-resource settings (Tyler et al., 2018; Cabibbe et al., 2020; Mongan et al., 2020).

In conclusion, the high performances of the GeneLEAD/Deplex Myc-TB approach for MTBC strain diagnosis makes this combined technology very promising for routine use in TB laboratory diagnosis, surveillance, and epidemiological investigations. Deplex Myc-TB predictions of susceptibility to anti-TB drugs are highly consistent with the reference phenotypic DST, except for drugs for which determination is generally difficult, such as ETH, EMB, or STR. Although spoligotyping is not as discriminating as MIRU, particularly for lineage 2, systematic determination of genotyping allows the detection of putative cases of unsuspected transmission. The addition of targets for the most recent drugs and a better interpretation of mutations not characterized by the web application have been identified as potential sources of improvement for the Deplex Myc-TB tool. The automated web application provided with the Deplex Myc-TB assay allows easy interpretation of the sequencing data for a large set of well-characterized variants. However, the interpretation of the results can be more challenging for a less experienced audience, especially when uncharacterized mutations are detected, which was the case for 39 susceptible and 62 resistant strains in our study, globally representing ~10% of the total number of SNPs detected.

The impressive set of molecular sensors in a single tool would make the Deplex Myc-TB approach appropriate for countries with a high incidence of MDR-TB, or for centralized reference laboratories where a significant number of MDR strains are received. By contrast, the GeneLEAD/Deplex Myc-TB approach would be less useful on susceptible or mono-resistant strains that can be easily identified by a pre-screening step based on DNA strip tests such as MTBDRplus and MTBDRsl, except if an epidemiological investigation is required for documenting a patient-to-patient TB transmission.

REFERENCES

- Boehme, C. C., Nabeta, P., Hillemann, D., Nicol, M. P., Shenai, S., Krapp, F., et al. (2010). Rapid Molecular Detection of Tuberculosis and Rifampin Resistance. *N. Engl. J. Med.* 363 (11), 1005–15. doi: 10.1056/NEJMoa0907847
- Brossier, F., Guindo, D., Pham, A., Reibel, F., Sougakoff, W., Veziris, N., et al. (2016). Performance of the New Version (V2.0) of the GenoType MTBDRsl

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The original contributions presented in the study are included in the article/**Supplementary Material**. The nucleotide sequences of the NSUVs displayed in **Table 1** of the **Supplementary Material** have been deposited at GenBank under accession numbers OK562286 to OK562339. Further inquiries can be directed to the corresponding author.

ETHICS STATEMENT

Ethical review and approval was not required for the study on human participants in accordance with the local legislation and institutional requirements. Written informed consent for participation was not required for this study in accordance with the national legislation and the institutional requirements.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

WS and IB led the project and conceived and planned the tests. WS and IB took the lead in writing the manuscript. VE contributed to high-throughput sequencing, AA to resources, WS, IB, VO and FM to investigations and JR and AA to funding acquisition. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

FUNDING

This study was supported by an annual grant from Santé Publique France.

ACKNOWLEDGMENTS

We are most grateful to Gerald Millot, Sabrina Goumghar, and Lucas Gandy for their invaluable help in DNA sequencing and routine testing of clinical isolates by Deplex Myc-TB. We thank P2M Team and especially Maud Vanpeene at IntegraGen SA, 4 rue Pierre Fontaine, 91000 Evry, France.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2021.707244/full#supplementary-material>

Test for Detection of Resistance to Second-Line Drugs in Multidrug-Resistant *Mycobacterium Tuberculosis* Complex Strains. *J. Clin. Microbiol.* 54 (6), 1573–80. doi: 10.1128/JCM.00051-16

- Brossier, F., Sougakoff, W., Bernard, C., Petrou, M., Adeyema, K., Pham, A., et al. (2015). Molecular Analysis of the embCAB Locus and embR Gene Involved in Ethambutol Resistance in Clinical Isolates of *Mycobacterium Tuberculosis* in France. *Antimicrob. Agents Chemother.* 59 (8), 4800–8. doi: 10.1128/AAC.00150-15

- Brossier, F., Sougakoff, W. French National Reference Center for Mycobacteria (2017). Molecular Detection Methods of Resistance to Antituberculosis Drugs in Mycobacterium Tuberculosis. *Med. Mal. Infect.* 47 (5), 340–8. doi: 10.1016/j.medmal.2017.04.008
- Brossier, F., Veziris, N., Aubry, A., Jarlier, V., and Sougakoff, W. (2010). Detection by GenoType MTBDRsl Test of Complex Mechanisms of Resistance to Second-Line Drugs and Ethambutol in Multidrug-Resistant *Mycobacterium Tuberculosis* Complex Isolates. *J. Clin. Microbiol.* 48 (5), 1683–9. doi: 10.1128/JCM.01947-09
- Brossier, F., Veziris, N., Jarlier, V., and Sougakoff, W. (2009). Performance of MTBDR Plus for Detecting High/Low Levels of *Mycobacterium Tuberculosis* Resistance to Isoniazid. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 13 (2), 260–5.
- Cabibbe, A. M., Spitaleri, A., Battaglia, S., Colman, R. E., Suresh, A., Uplekar, S., et al. (2020). Application of Targeted Next-Generation Sequencing Assay on a Portable Sequencing Platform for Culture-Free Detection of Drug-Resistant Tuberculosis From Clinical Samples. *J. Clin. Microbiol.*, 58 (10), e00632–20. doi: 10.1128/JCM.00632-20
- Canetti, G., Rist, N., and Grosset, J. (1963). Measurement of Sensitivity of the Tuberculous Bacillus to Antibacterial Drugs by the Method of Proportions. Methodology, Resistance Criteria, Results and Interpretation. *Rev. Tuberc. Pneumol.* 27, 217–72.
- Colman, R. E., Mace, A., Seifert, M., Hetzel, J., Mshael, H., Suresh, A., et al. (2019). Whole-Genome and Targeted Sequencing of Drug-Resistant *Mycobacterium Tuberculosis* on the Iseq100 and MiSeq: A Performance, Ease-Of-Use, and Cost Evaluation. *PLoS Med.* 16 (4), e1002794. doi: 10.1371/journal.pmed.1002794
- Conradie, F., Diacon, A. H., Ngubane, N., Howell, P., Everitt, D., Crook, A. M., et al. (2020). Treatment of Highly Drug-Resistant Pulmonary Tuberculosis. *N. Engl. J. Med.* 382 (10), 893–902. doi: 10.1056/NEJMoa1901814
- Dale, J. W., Brittain, D., Cataldi, A. A., Cousins, D., Crawford, J. T., Driscoll, J., et al. (2001). Spacer Oligonucleotide Typing of Bacteria of the *Mycobacterium Tuberculosis* Complex: Recommendations for Standardised Nomenclature. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 5 (3), 216–9.
- Demay, C., Liens, B., Burguière, T., Hill, V., Couvin, D., Millet, J., et al. (2012). SITVITWEB—a Publicly Available International Multimarker Database for Studying *Mycobacterium Tuberculosis* Genetic Diversity and Molecular Epidemiology. *Infect. Genet. Evol.* 12 (4), 755–66. doi: 10.1016/j.meegid.2012.02.004
- Deun, A. V., Aung, K. J. M., Bola, V., Lebeke, R., Hossain, M. A., de Rijk, W. B., et al. (2013). Rifampin Drug Resistance Tests for Tuberculosis: Challenging the Gold Standard. *J. Clin. Microbiol.* 51 (8), 2633–40. doi: 10.1128/JCM.00553-13
- Dohál, M., Porvazník, I., Pršo, K., Rasmussen, E. M., Solovič, I., and Mokry, J. (2020). Whole-Genome Sequencing and *Mycobacterium Tuberculosis*: Challenges in Sample Preparation and Sequencing Data Analysis. *Tuberc. Edinb. Scotl.* 123, 101946. doi: 10.1016/j.tube.2020.101946
- Dookie, N., Rambaran, S., Padayatchi, N., Mahomed, S., and Naidoo, K. (2018). Evolution of Drug Resistance in *Mycobacterium Tuberculosis*: A Review on the Molecular Determinants of Resistance and Implications for Personalized Care. *J. Antimicrob. Chemother.* 73 (5), 1138–51. doi: 10.1093/jac/dkx506
- Doyle, R. M., Burgess, C., Williams, R., Gorton, R., Booth, H., Brown, J., et al. (2018). Direct Whole-Genome Sequencing of Sputum Accurately Identifies Drug-Resistant *Mycobacterium Tuberculosis* Faster Than MGIT Culture Sequencing. *J. Clin. Microbiol.* 56 (8), e00666–18. doi: 10.1128/JCM.00666-18
- EUCAST (2020) *Clinical Breakpoints and Dosing of Antibiotics*. Available at: https://www.eucast.org/clinical_breakpoints/.
- European Centre for Disease Prevention and Control (2018) *Handbook on Tuberculosis Laboratory Diagnostic Methods in the European Union - Updated 2018*. Available at: <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/handbook-tuberculosis-laboratory-diagnostic-methods-european-union-updated-2018>.
- Feuerriegel, S., Kohl, T. A., Utpatel, C., Andres, S., Maurer, F. P., Heyckendorf, J., et al. (2021). Rapid Genomic First- and Second-Line Drug Resistance Prediction From Clinical *Mycobacterium Tuberculosis* Specimens Using Deeplex®-MycTB. *Eur. Respir. J.* 57 (1), 2001796. doi: 10.1183/13993003.01796-2020
- Feuerriegel, S., Schleusener, V., Beckert, P., Kohl, T. A., Miotto, P., Cirillo, D. M., et al. (2015). PhyResSE: A Web Tool Delineating *Mycobacterium Tuberculosis* Antibiotic Resistance and Lineage From Whole-Genome Sequencing Data. *J. Clin. Microbiol.* 53 (6), 1908–1914. doi: 10.1128/JCM.00025-15
- Furin, J., Cox, H., and Pai, M. (2019). Tuberculosis. *Lancet Lond. Engl.* 393 (10181), 1642–56. doi: 10.1016/S0140-6736(19)30308-3
- Guglielmetti, L., Jaffré, J., Bernard, C., Brossier, F., El Helali, N., Chadelat, K., et al. (2019). Multidisciplinary Advisory Teams to Manage Multidrug-Resistant Tuberculosis: The Example of the French Consilium. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 23 (10), 1050–4. doi: 10.5588/ijtld.18.0779
- Gygli, S. M., Borrell, S., Trauner, A., and Gagneux, S. (2017). Antimicrobial Resistance in *Mycobacterium Tuberculosis*: Mechanistic and Evolutionary Perspectives. *FEMS Microbiol. Rev.* 41 (3), 354–73. doi: 10.1093/femsre/fux011
- Hameed, H. M. A., Islam, M. M., Chhotaray, C., Wang, C., Liu, Y., Tan, Y., et al. (2018). Molecular Targets Related Drug Resistance Mechanisms in MDR-, XDR-, and TDR-*Mycobacterium Tuberculosis* Strains. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 8, 114. doi: 10.3389/fcimb.2018.00114
- Heifets, L., and Sanchez, T. (2000). New Agar Medium for Testing Susceptibility of *Mycobacterium Tuberculosis* to Pyrazinamide. *J. Clin. Microbiol.* 38 (4), 1498–501. doi: 10.1128/JCM.38.4.1498-1501.2000
- Hofmann-Thiel, S., and Hoffmann, H. (2014). Evaluation of Fluorotype MTB for Detection of *Mycobacterium Tuberculosis* Complex DNA in Clinical Specimens From a Low-Incidence Country. *BMC Infect. Dis.* 14, 59. doi: 10.1186/1471-2334-14-59
- Horne, D. J., Kohli, M., Zifodya, J. S., Schiller, I., Dendukuri, N., Tollefson, D., et al. (2019). Xpert MTB/RIF and Xpert MTB/RIF Ultra for Pulmonary Tuberculosis and Rifampicin Resistance in Adults. *Cochrane Database Syst. Rev.* 6, CD009593. doi: 10.1002/14651858.CD009593.pub4
- Igarashi, Y., Chikamatsu, K., Aono, A., Yi, L., Yamada, H., Takaki, A., et al. (2017). Laboratory Evaluation of the Anyplex™ II MTB/MDR and MTB/XDR Tests Based on Multiplex Real-Time PCR and Melting-Temperature Analysis to Identify *Mycobacterium Tuberculosis* and Drug Resistance. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 89 (4), 276–81. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2017.08.016
- Jouet, A., Gaudin, C., Badalato, N., Allix-Béguec, C., Duthoy, S., Ferré, A., et al. (2021). Deep Amplicon Sequencing for Culture-Free Prediction of Susceptibility or Resistance to 13 Anti-Tuberculous Drugs. *Eur. Respir. J.* 57 (3), 2002338. doi: 10.1183/13993003.02338-2020
- Kambl, P., Ajbani, K., Kazi, M., Sadani, M., Naik, S., Shetty, A., et al. (2021). Targeted Next Generation Sequencing Directly From Sputum for Comprehensive Genetic Information on Drug Resistant *Mycobacterium Tuberculosis*. *Tuberc. Edinb. Scotl.* 127, 102051. doi: 10.1016/j.tube.2021.102051
- Kamerbeek, J., Schouls, L., Kolk, A., Agerterveld, M., van, Soolingen, van, D., et al. (1997). Simultaneous Detection and Strain Differentiation of *Mycobacterium Tuberculosis* for Diagnosis and Epidemiology. *J. Clin. Microbiol.* 35 (4), 907–14. doi: 10.1128/jcm.35.4.907-914.1997
- Liu, Y., Tian, M., Wang, X., Wei, R., Xing, Q., Ma, T., et al. (2014). Genotypic Diversity Analysis of *Mycobacterium Tuberculosis* Strains Collected From Beijing in 2009, Using Spoligotyping and VNTR Typing. *PLoS One* 9 (9), e106787. doi: 10.1371/journal.pone.0106787
- Martinez, E., Hennessy, D., Jelfs, P., Crichton, T., Chen, S. C.-A., and Sintchenko, V. (2018). Mutations Associated With *In Vitro* Resistance to Bedaquiline in *Mycobacterium Tuberculosis* Isolates in Australia. *Tuberc. Edinb. Scotl.* 111, 31–4. doi: 10.1016/j.tube.2018.04.007
- Maruri, F., Sterling, T. R., Kaiga, A. W., Blackman, A., van der Heijden, Y. F., Mayer, C., et al. (2012). A Systematic Review of Gyrase Mutations Associated With Fluoroquinolone-Resistant *Mycobacterium Tuberculosis* and a Proposed Gyrase Numbering System. *J. Antimicrob. Chemother.* 67 (4), 819–31. doi: 10.1093/jac/dkr566
- Meehan, C. J., Goig, G. A., Kohl, T. A., Verboven, L., Dippenaar, A., Ezewudo, M., et al. (2019). Whole Genome Sequencing of *Mycobacterium Tuberculosis*: Current Standards and Open Issues. *Nat. Rev. Microbiol.* 17 (9), 533–45. doi: 10.1038/s41579-019-0214-5
- Miotto, P., Cabibbe, A. M., Borroni, E., Degano, M., and Cirillo, D. M. (2018). Role of Disputed Mutations in the rpoB Gene in Interpretation of Automated Liquid MGIT Culture Results for Rifampin Susceptibility Testing of *Mycobacterium Tuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.* 56 (5), e01599-17. doi: 10.1128/JCM.01599-17
- Miotto, P., Cabibbe, A. M., Feuerriegel, S., Casali, N., Drobniewski, F., Rodionova, Y., et al. (2014). *Mycobacterium Tuberculosis* Pyrazinamide Resistance Determinants: A Multicenter Study. *mBio* 5 (5), e01819–e01814. doi: 10.1128/mBio.01819-14
- Miotto, P., Tessema, B., Tagliani, E., Chindelevitch, L., Starks, A. M., Emerson, C., et al. (2017). A Standardised Method for Interpreting the Association Between Mutations and Phenotypic Drug Resistance in *Mycobacterium Tuberculosis*. *Eur. Respir. J.* 50 (6), 1701354. doi: 10.1183/13993003.01354-2017

- Mongan, A. E., Tuda, J. S. B., and Runtuwene, L. R. (2020). Portable Sequencer in the Fight Against Infectious Disease. *J. Hum. Genet.* 65 (1), 35–40. doi: 10.1038/s10038-019-0675-4
- Nahid, P., Mase, S. R., Migliori, G. B., Sotgiu, G., Bothamley, G. H., Brozek, J. L., et al. (2019). Treatment of Drug-Resistant Tuberculosis. An Official ATS/CDC/ERS/IDSA Clinical Practice Guideline. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 200 (10), e93–142. doi: 10.1164/rccm.201909-1874ST
- Nguyen, T. V. A., Anthony, R. M., Bañuls, A.-L., Nguyen, T. V. A., Vu, D. H., and Alffenaar, J.-W. C. (2018). Bedaquiline Resistance: Its Emergence, Mechanism, and Prevention. *Clin. Infect. Dis.* 66 (10), 1625–30. doi: 10.1093/cid/cix992
- Nikolayevskyy, V., Niemann, S., Anthony, R., van Soolingen, D., Tagliani, E., Ködmön, C., et al. (2019). Role and Value of Whole Genome Sequencing in Studying Tuberculosis Transmission. *Clin. Microbiol. Infect.* 25 (11), 1377–82. doi: 10.1016/j.cmi.2019.03.022
- Nimmo, C., Shaw, L. P., Doyle, R., Williams, R., Brien, K., Burgess, C., et al. (2019). Whole Genome Sequencing *Mycobacterium Tuberculosis* Directly From Sputum Identifies More Genetic Diversity Than Sequencing From Culture. *BMC Genomics* 20 (1), 389. doi: 10.1186/s12864-019-5782-2
- Oelemann, M. C., Diel, R., Vatin, V., Haas, W., Rüschi-Gerdes, S., Loch, C., et al. (2007). Assessment of an Optimized Mycobacterial Interspersed Repetitive-Unit-Variable-Number Tandem-Repeat Typing System Combined With Spoligotyping for Population-Based Molecular Epidemiology Studies of Tuberculosis. *J. Clin. Microbiol.* 45 (3), 691–7. doi: 10.1128/JCM.01393-06
- Petrella, S., Gelus-Ziental, N., Maudry, A., Laurans, C., Boudjelloul, R., and Sougakoff, W. (2011). Crystal Structure of the Pyrazinamidase of *Mycobacterium Tuberculosis*: Insights Into Natural and Acquired Resistance to Pyrazinamide. *PLoS One* 6 (1), e15785. doi: 10.1371/journal.pone.0015785
- Pfytter, G. E., Strässle, A., Rose, N., Wirth, R., Brändli, O., and Shang, H. (1998). Transmission of Tuberculosis in the Metropolitan Area of Zurich: A 3 Year Survey Based on DNA Fingerprinting. *Eur. Respir. J.* 11 (4), 804–8. doi: 10.1183/09031936.98.11040804
- Pholwat, S., Stroup, S., Heysell, S., Ogarkov, O., Zhdanova, S., Ramakrishnan, G., et al. (2016). Eis Promoter C14G and C15G Mutations Do Not Confer Kanamycin Resistance in *Mycobacterium Tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 60 (12), 7522–3. doi: 10.1128/AAC.01775-16
- Pi, R., Liu, Q., Jiang, Q., and Gao, Q. (2019). Characterization of Linezolid-Resistance-Associated Mutations in *Mycobacterium Tuberculosis* Through WGS. *J. Antimicrob. Chemother.* 74 (7), 1795–8. doi: 10.1093/jac/dkz150
- Puerto, G., Erazo, L., Wintaco, M., Castro, C., Ribón, W., and Guerrero, M. I. (2015). *Mycobacterium Tuberculosis* Genotypes Determined by Spoligotyping to Be Circulating in Colombia Between 1999 and 2012 and Their Possible Associations With Transmission and Susceptibility to First-Line Drugs. *PLoS One* 10 (6), e0124308. doi: 10.1371/journal.pone.0124308
- Rasohanihtralisoa, R., Rakotosamimanana, N., Stucki, D., Sola, C., Gagneux, S., and Rasolofo Razanamparany, V. (2017). Evaluation of Spoligotyping, SNPs and Customised MIRU-VNTR Combination for Genotyping *Mycobacterium Tuberculosis* Clinical Isolates in Madagascar. *PLoS One* 12 (10), e0186088. doi: 10.1371/journal.pone.0186088
- Reeves, A. Z., Campbell, P. J., Sultana, R., Malik, S., Murray, M., Plikaytis, B. B., et al. (2013). Aminoglycoside Cross-Resistance in *Mycobacterium Tuberculosis* Due to Mutations in the 5' Untranslated Region of WhiB7. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57 (4), 1857–65. doi: 10.1128/AAC.02191-12
- Schön, T., Miotto, P., Köser, C. U., Viveiros, M., Böttger, E., and Cambau, E. (2017). *Mycobacterium Tuberculosis* Drug-Resistance Testing: Challenges, Recent Developments and Perspectives. *Clin. Microbiol. Infect.* 23 (3), 154–60. doi: 10.1016/j.cmi.2016.10.022
- Scott, A. N., Menzies, D., Tannenbaum, T.-N., Thibert, L., Kozak, R., Joseph, L., et al. (2005). Sensitivities and Specificities of Spoligotyping and Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit-Variable-Number Tandem Repeat Typing Methods for Studying Molecular Epidemiology of Tuberculosis. *J. Clin. Microbiol.* 43 (1), 89–94. doi: 10.1128/JCM.43.1.89-94.2005
- Shi, J., Zheng, D., Zhu, Y., Ma, X., Wang, S., Li, H., et al. (2018). Role of MIRU-VNTR and Spoligotyping in Assessing the Genetic Diversity of *Mycobacterium Tuberculosis* in Henan Province, China. *BMC Infect. Dis.* 18 (1), 447. doi: 10.1186/s12879-018-3351-y
- Small, P. M., Hopewell, P. C., Singh, S. P., Paz, A., Parsonnet, J., Ruston, D. C., et al. (1994). The Epidemiology of Tuberculosis in San Francisco. A Population-Based Study Using Conventional and Molecular Methods. *N. Engl. J. Med.* 330 (24), 1703–9. doi: 10.1056/NEJM199406163302402
- Supply, P., Allix, C., Lesjean, S., Cardoso-Oelemann, M., Rüschi-Gerdes, S., Willery, E., et al. (2006). Proposal for Standardization of Optimized Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit-Variable-Number Tandem Repeat Typing of *Mycobacterium Tuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.* 44 (12), 4498–510. doi: 10.1128/JCM.01392-06
- Tyler, A. D., Mataseje, L., Urfano, C. J., Schmidt, L., Antonation, K. S., Mulvey, M. R., et al. (2018). Evaluation of Oxford Nanopore's MinION Sequencing Device for Microbial Whole Genome Sequencing Applications. *Sci. Rep.* 8 (1), 10931. doi: 10.1038/s41598-018-29334-5
- van Beek, J., Haanperä, M., Smit, P. W., Mentula, S., and Soini, H. (2019). Evaluation of Whole Genome Sequencing and Software Tools for Drug Susceptibility Testing of *Mycobacterium Tuberculosis*. *Clin. Microbiol. Infect.* 25 (1), 82–6. doi: 10.1016/j.cmi.2018.03.041
- van der Zanden, A. G. M., Kremer, K., Schouls, L. M., Caimi, K., Cataldi, A., Hulleman, A., et al. (2002). Improvement of Differentiation and Interpretability of Spoligotyping for *Mycobacterium Tuberculosis* Complex Isolates by Introduction of New Spacer Oligonucleotides. *J. Clin. Microbiol.* 40 (12), 4628–39. doi: 10.1128/JCM.40.12.4628-4639.2002
- van Deutekom, H., Gerritsen, J. J., van Soolingen, D., van Ameijden, E. J., van Embden, J. D., and Coutinho, R. A. (1997). A Molecular Epidemiological Approach to Studying the Transmission of Tuberculosis in Amsterdam. *Clin. Infect. Dis.* 25 (5), 1071–7. doi: 10.1086/516072
- Vanhomwegen, J., Kwaru, A., Martin, M., Gillani, F. S., Fontanet, A., Mutungi, P., et al. (2011). Impact of Immigration on the Molecular Epidemiology of Tuberculosis in Rhode Island. *J. Clin. Microbiol.* 49 (3), 834–44. doi: 10.1128/JCM.01952-10
- Vilchèze, C., and Jacobs, W. R. (2014). Resistance to Isoniazid and Ethionamide in *Mycobacterium Tuberculosis*: Genes, Mutations, and Causalities. *Microbiol. Spectr.* 2 (4), MGM2-0014–2013. doi: 10.1128/microbiolspec.MGM2-0014-2013
- Votintseva, A. A., Bradley, P., Pankhurst, L., Del Ojo Elias, C., Loose, M., Nilgiriwala, K., et al. (2017). Same-Day Diagnostic and Surveillance Data for Tuberculosis via Whole-Genome Sequencing of Direct Respiratory Samples. *J. Clin. Microbiol.* 55 (5), 1285–98. doi: 10.1128/JCM.02483-16
- Walker, T. M., Kohl, T. A., Omar, S. V., Hedge, J., Del Ojo Elias, C., and Bradley, P. (2015). Whole-Genome Sequencing for Prediction of *Mycobacterium Tuberculosis* Drug Susceptibility and Resistance: A Retrospective Cohort Study. *Lancet Infect. Dis.* 15 (10), 1193–1202. doi: 10.1016/S1473-3099(15)00062-6
- Williamson, D. A., Roberts, S. A., Bower, J. E., Vaughan, R., Newton, S., Lowe, O., et al. (2012). Clinical Failures Associated With *rpoB* Mutations in Phenotypically Occult Multidrug-Resistant *Mycobacterium Tuberculosis*. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 16 (2), 216–20. doi: 10.5588/ijtld.11.0178
- Wondale, B., Keehwan, K., Medhin, G., Teklu, T., Mohammed, T., Tolosa, S., et al. (2020). Molecular Epidemiology of Clinical *Mycobacterium Tuberculosis* Complex Isolates in South Omo, Southern Ethiopia. *BMC Infect. Dis.* 20 (1), 750. doi: 10.1186/s12879-020-05394-9
- World Health Organization (2018a) *Rapid Communication: Key Changes to the Treatment of Drug-Resistant Tuberculosis*. Available at: <https://www.who.int/publications-detail/WHO-CDS-TB-2018.18>.
- World Health Organization (2018b) *Technical Report on Critical Concentrations for TB Drug Susceptibility Testing of Medicines Used in the Treatment of Drug-Resistant TB*. Available at: http://www.who.int/tb/publications/2018/WHO_technical_report_concentrations_TB_drug_susceptibility/en/.
- World Health Organization (2019) *WHO Consolidated Guidelines on Drug-Resistant Tuberculosis Treatment*. Available at: <http://www.who.int/tb/publications/2019/consolidated-guidelines-drug-resistant-TB-treatment/en/>.
- World Health Organization (2020) *Global Tuberculosis Report 2020*. Available at: http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/.
- World Health Organization (2021) *Catalogue of Mutations in Mycobacterium Tuberculosis Complex and Their Association With Drug Resistance*. Available at: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240028173>.
- Yin, X., and Yu, Z. (2010). Mutation Characterization of *gyrA* and *gyrB* Genes in Levofloxacin-Resistant *Mycobacterium Tuberculosis* Clinical Isolates From Guangdong Province in China. *J. Infect.* 61 (2), 150–4. doi: 10.1016/j.jinf.2010.05.001
- Zaubrecher, M. A., Sikes, R. D., Metchock, B., Shinnick, T. M., and Posey, J. E. (2009). Overexpression of the Chromosomally Encoded Aminoglycoside Acetyltransferase Eis Confers Kanamycin Resistance in *Mycobacterium*

- Tuberculosis. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106 (47), 20004–9. doi: 10.1073/pnas.0907925106
- Zaw, M. T., Emran, N. A., and Lin, Z. (2018). Mutations Inside Rifampicin-Resistance Determining Region of rpoB Gene Associated With Rifampicin-Resistance in *Mycobacterium Tuberculosis*. *J. Infect. Public Health* 11 (5), 605–10. doi: 10.1016/j.jiph.2018.04.005
- Zhang, H.-N., Xu, Z.-W., Jiang, H.-W., Wu, F.-L., He, X., Liu, Y., et al. (2017). Cyclic Di-GMP Regulates *Mycobacterium Tuberculosis* Resistance to Ethionamide. *Sci. Rep.* 7 (1), 5860. doi: 10.1038/s41598-017-06289-7

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's Note: All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Copyright © 2021 Bonnet, Enouf, Morel, Ok, Jaffré, Jarlier, Aubry, Robert and Sougakoff. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Publication n°2

Bonnet I, Brossier F, Sayes F, Frigui W, Madacki Y, Chauffour A, Veziris N, Sougakoff W, Brosch R, Tournebize R. Role of *whiB6* and *kdpDE* in the successful multidrug-resistant clone *Mycobacterium tuberculosis* B0/W148. Communication sous forme d'affiche au congrès FEMS (Hambourg, juillet 2023). Article en préparation.

Nous avons étudié les mutations spécifiques du clone 100-32 MDR, aussi appelé B0/W148 selon la méthode de génotypage RFLP. En comparaison avec la base de données du CNR MyRMA, l'analyse du génome complet de 29 souches reçues au CNR a permis d'identifier 30 mutations non synonymes et petites délétions spécifiques. Parmi elles, nous avons choisi d'étudier celles présentes dans *kdpD* et *whiB6*, car des données de la littérature semblent montrer un impact de ces gènes sur la virulence de la souche. Nous avons construit un mutant chez *M. tuberculosis* H37Rv en supprimant les deux gènes *kdpD* et *kdpE* avant de le compléter avec la forme sauvage ou mutée de *kdpDE*. Nous n'avons pas observé de différence de croissance *in vitro* des différentes souches, suggérant que KdpDE n'est pas essentiel pour le fitness de la bactérie. L'étude de l'impact de la délétion sur l'activité transcriptionnelle et la virulence est en cours. D'autre part, des travaux du laboratoire précédents ont permis d'obtenir le mutant $\Delta whiB6$ et les souches complémentées WT et mutée ; l'analyse des données brutes complétée par l'étude de modélisation structurale indique que la souche mutée T51P entraîne une production de EsxA et EsxB et de cytokines pro-inflammatoires plus faible que la souche sauvage ; nous réalisons actuellement une analyse du transcriptome et de la virulence *in vivo* dans un modèle murin. Les premiers résultats obtenus semblent indiquer que la mutation T51P dans WhiB6 entraîne moins de virulence et d'inflammation.

Role of *whiB6* and *kdpDE* in the successful multidrug-resistant clone *Mycobacterium tuberculosis* B0/W148

Isabelle Bonnet^{a,b}, Florence Brossier^{a,b}, Fadel Sayes^c, Wafa Frigui^c, Yan Madacki^c, Aurélie Chauffour^{a,b}, Nicolas Veziris^{a,b}, Wladimir Sougakoff^{a,b}, Roland Brosch^c, Régis Tournebize^{a,d}

^aCimi-Paris, INSERM, U1135, Centre d'Immunologie et des Maladies Infectieuses, Sorbonne Université, 75013 Paris, France

^bCentre National de Référence des Mycobactéries et de la Résistance des Mycobactéries aux Antituberculeux, Hôpital Pitié-Salpêtrière, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP), Sorbonne-Université, 75013 Paris, France

^cUnit for Integrated Mycobacterial Pathogenomics, Institut Pasteur, CNRS UMR 3525, Paris, France

^dInstitut Pasteur, Université Paris Cité, Photonic Bio-Imaging, Centre de Ressources et Recherches Technologiques (UTechS-PBI, C2RT), F-75015 Paris, France

Introduction.

Tuberculosis (TB) remains a global public health issue estimated to have been responsible for 1.6 million of deaths in 2021 [1]. In the last years, the COVID-19 pandemic has slowed progress made in the years up to 2019 in access to TB diagnosis and treatment and consequently increased the burden of TB disease. In 2014, the WHO issued the End TB Strategy aiming to have an 80% reduction in TB incidence and 90% reduction in TB deaths by 2030. However, the multidrug resistance (MDR) of *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), i.e. resistance to at least isoniazid and rifampicin, represents an obstacle to achieving these milestones and targets of WHO's End TB Strategy as the treatment success rate of MDR TB is 60% compared to 85% when the strain is susceptible [1]. Moreover, the burden of MDR TB is estimated to have increased between 2020 and 2021, with 450 000 new cases of rifampicin-resistant/MDR TB in 2021 [1].

Several reports have described community outbreaks of MDR TB in many areas across the world with, as likely contributing factors, variably effective control programs, the presence of comorbidities (e.g., HIV co-infection), numerous patient-related factors, including societal, immunological and genetic factors [2–4]. However, epidemiological studies have highlighted the role of bacterial genetics in the emergence of certain MDR TB strains independently of patient and environmental factors [5,6]. In particular, compensatory evolution, for instance secondary mutations in RpoA, RpoB and RpoC, encoding the alpha, beta, and beta-prime subunits of RNA polymerase, respectively, could improve the transmission fitness of some MDR TB strains and be partly responsible for the great dissemination of some strains [6].

Among the MDR clones that are epidemiologically successful, the 100-32 MDR Beijing clone, also called B0/W148 or Russian clone, has emerged since the early sixties [5]. It is the main contributor to the MDR epidemic in Russia and Eastern Europe, and since the USSR's fall, has

also propagated to Western Europe, likely driven by economic or medical migrations of TB patients.

Here, we investigate from a genetic point of view the successful 100-32 MDR clone, and try to determine some genetic advantages in the genome [5]. We identified mutations specific of the B0/W148 clone and investigated their role in two transcriptional regulators. A mutation leading to the fusion of the potassium sensor protein KdpD with the transcriptional activator KdpE does not have any effect of bacteria growth and fitness *in vitro*. On the contrary, the mutation in WhiB6 decreased the expression and secretion of the ESX-1 substrates EsxA and EsxB and the production of IL-1 β and TNF α by macrophages.

Results.

Genome analysis and deletion of *whiB6* and *kdpDE* in a Mtb H37Rv genetic background.

In order to identify single nucleotide polymorphisms (SNP) or indels specific to the clone B0/W148 clone, we made use of the sequenced Mtb strains available at the National Reference Centre of Mycobacteria. Our collection comprises 32 isolates with 24-locus mycobacterial interspersed repetitive unit-variable number tandem repeat (MIRU-VNTR) genotype MLVA Mtb 15-9 “100-32”, of which 3 are susceptible. Indeed, the Beijing B0/W148 is defined using *IS6110*-RFLP typing and 100-32 is the main MIRU-VNTR code of it [7]. To determine the genomic diversity of these 100-32 MDR strains, we built a minimum spanning tree that shows a star like pattern (Figure 1) indicative of an expanding population.

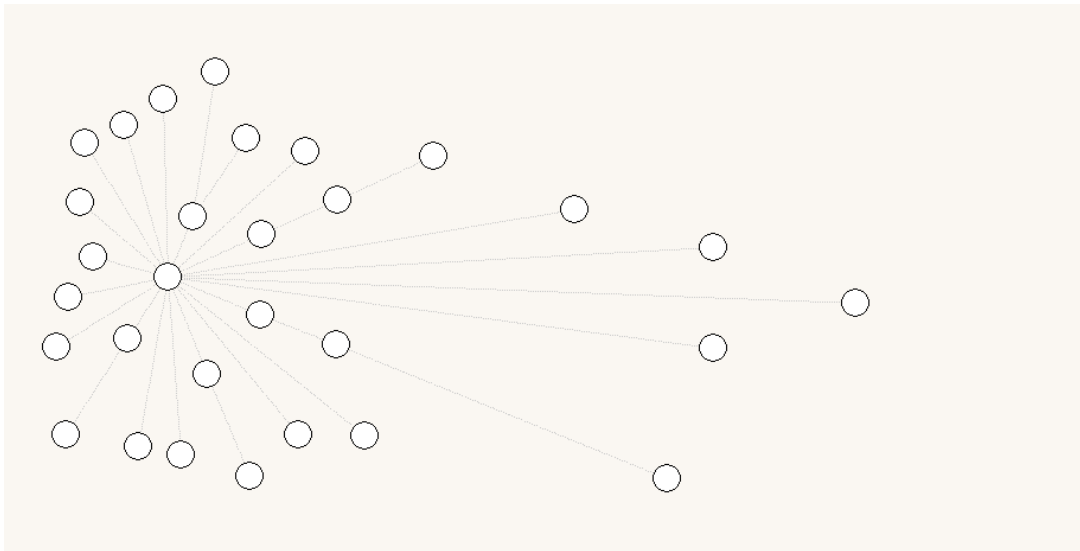


Figure 1. Minimum spanning tree of the 29 MDR 100-32 isolates

A comparison of the MDR 100-32 strains genomes with the genomes of the 3 susceptible 100-32 isolates but also 457 other isolates, mostly MDR, representing lineage 1 to lineage 4, identified 30 non synonymous mutations and small deletions that are specific to the MDR 100-32 clone (Supplementary table 1). Mutations are found in genes coding for proteins involved in metabolism and respiration, cell wall and cell processes, lipid metabolism, virulence or adaptation, regulatory proteins or of unknown function [8]. Among them, we decided to focus on *whiB6* (*rv3862c*) and *kdpD* (*rv1028c*) as they are involved in transcriptional regulation. These genes are located at two different genomic loci in *Mtb*, with *whiB6* located upstream of the ESX-1 operon, and *kdpD* upstream of the *kdpFABC* operon at genome coordinates 4338 kb and 1151-1149 kb (reverse strand) of strain H37Rv, respectively. The non synonymous mutation in *whiB6* replaces threonine with proline at position 51. We compared the structure of the crystalized WhiB6 with an AlphaFold model of the T51P mutated form. The overall structure is not altered. When looking more closely at the domain binding the Fe-S cluster, only a slight displacement of an α -helix where one of the 4 cysteines coordinating the Fe-S cluster

looks displaced, suggesting that the binding of the Fe-S cluster might be altered and consequently the protein function (Figure 2).

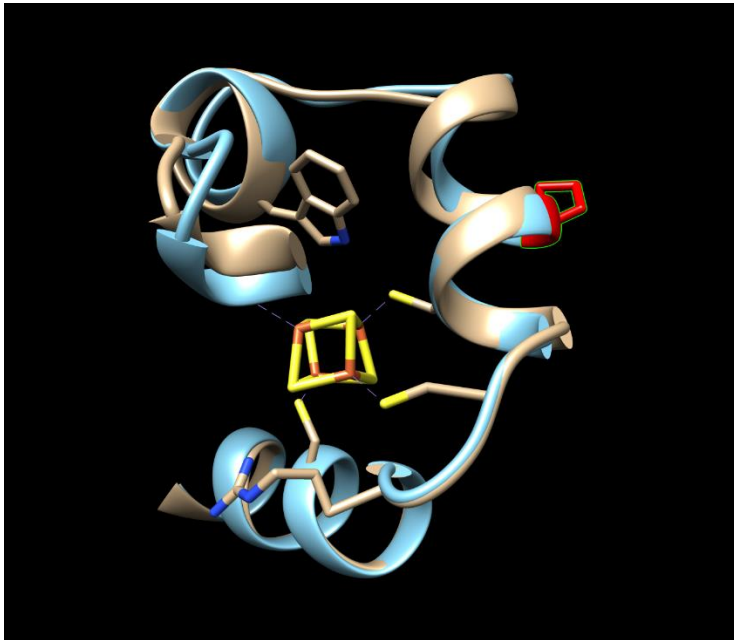


Figure 2. 3-D structures of WhiB6 (AlphaFold), close view of the Fe-S cluster region. Brown structure represents the crystalized WT form. Blue structure represents the mutated form modeled with AlphaFold. The Fe-S cluster is represented in yellow and the proline 51 in red.

The deletion of a unique single nucleotide in the promoter region of the gene in clinical strains compared to the reference strains H37Rv and H37Ra upregulates the ESX-1 system by WhiB6 as part of the PhoP regulon [9]. The deletion of two nucleotides at the end of *kdpD* leads to a fusion of the sensor KdpD to the regulator KdpE of the two-component system encoded by the *kdpDE* operon. Both genes (*whiB6* and *kdpE*) have been previously described as probable transcriptional regulatory proteins and possibly implicated in Mtb virulence [9,10].

In order to investigate the impact of those B0/W148 specific mutations in *whiB6* and *kdpDE*, we chose to construct the two specific mutants in the H37Rv reference strain (H37Rv Δ *whiB6* and H37Rv Δ *kdpDE*) (Figure 3). The *kdpDE* mutant was complemented by either the WT or B0/W148-deletion sequences. The *whiB6* mutant was complemented with 3 constructs, i) promoter WT – *whiB6* WT, ii) promoter del – *whiB6* WT, and iii) promoter del – *whiB6* T51P.

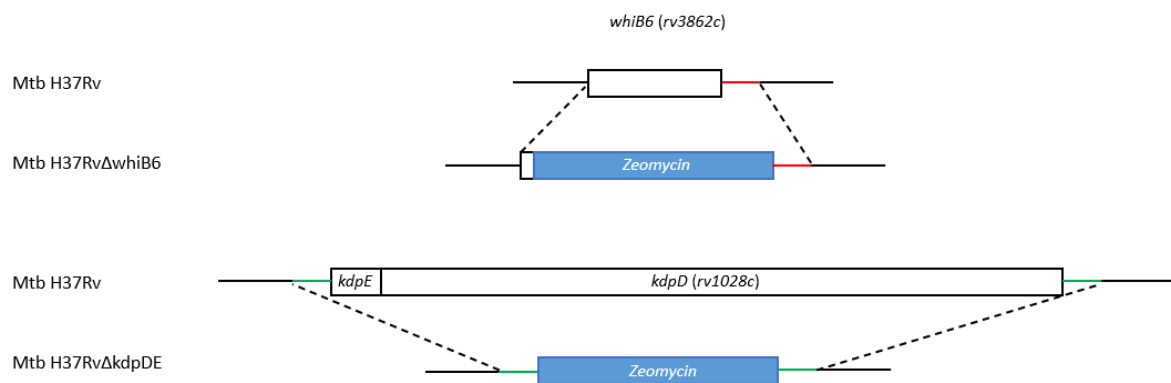


Figure 3. Schematic representation of genomic organization of *whiB6* and *kdpDE* in Mtb H37Rv, H37Rv Δ *whiB6*, and H37Rv Δ *kdpDE* strains.

The mutation T51P in WhiB6 and the deletion in KdpDE do not impact the *in vitro* growth.

To check the impact of the mutations on bacteria fitness, we measured the kinetics of *in vitro* growth of the various strains in different media. In 7H9 broth, we did not observe a significant difference between the growth of the H37Rv strain, the *whiB6* mutant and any of the mutant complemented with either WT *whiB6* or *whiB6*-T51P (Figure 4 top), indicating that the *whiB6* T51P mutation does not affect *in vitro* growth. As KdpDE are sensor and regulator of K⁺ uptake, we measured the growth rate in 7H9 containing either 7.35 mM K⁺ (normal concentration) or without K⁺. All the strains, H37Rv, Δ *kdpDE*, and complemented WT or del, grew identically

in medium with 7.35 mM K⁺ or without K⁺ (Figure 4 middle and bottom). The strains grew more slowly in medium without K⁺. These results show that the B0/W148 specific mutations in *whiB6* and *kdpDE* do not alter the normal growth rate and fitness of the bacteria *in vitro*.

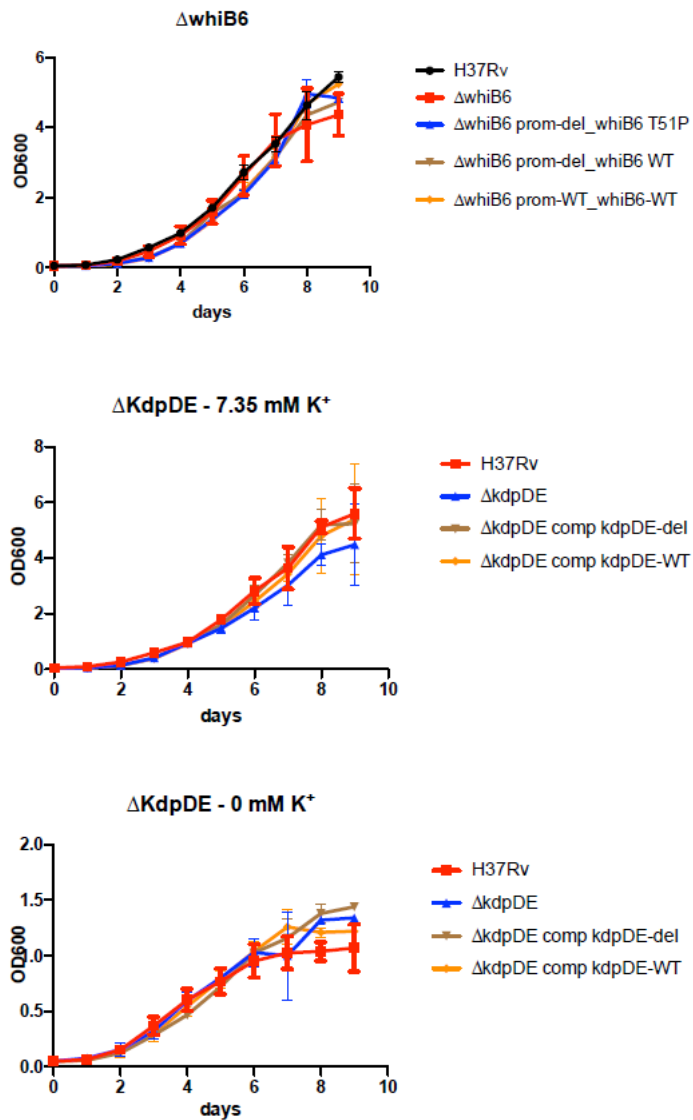


Figure 4. *In vitro* growth rates of the WT and mutant strains of Mtb measured over nine days. The results are of three different experiments and are expressed as the mean optical density (OD) +/- SD at 600 nm.

The mutation T51P in WhiB6 leads to low levels of EsxA/B in Mtb H37Rv.

To investigate the impact of the mutation T51P in WhiB6, we analyzed the expression and secretion of EsxA (ESAT-6) and EsxB (CFP-10) in Mtb H37Rv, CDC1551, Δ RD1, H37Rv Δ *whiB6*, and complemented strains. The CDC1551 strain is a highly virulent clinical isolate, known to produce and secrete high levels of EsxA and EsxB *in vitro*. The Δ RD1 strain is a H37Rv strain lacking part of the ESX-1 secretion system and shown to be avirulent. As expected, we observed a strong expression of EsxA and EsxB in whole cell lysate (WCL) of bacteria, as well as a strong secretion in the supernatant (SN) in the virulent strain CDC1551 (Figure 5). EsxA and EsxB expression and secretion were drastically reduced in both the H37Rv and Δ *whiB6* strains. Complementation of the Δ *whiB6* mutant with the WT *whiB6* under the expression of the H37Rv normal promoter (prom WT – *whiB6* WT) or with mutated T51P *whiB6* under the expression of the active del promoter (prom del – *whiB6* T51P) failed to restore or induce the expression and secretion of EsxA and EsxB. Only the complementation with the WT *whiB6* under the expression of the active del promoter (prom del – *whiB6* WT) induced a strong expression and secretion of EsxA and EsxB similar to what is observed with the CDC1551 strain. These results show that the T51P mutation drastically impairs WhiB6 transcriptional regulation function leading to the expression of EsxA and EsxB.

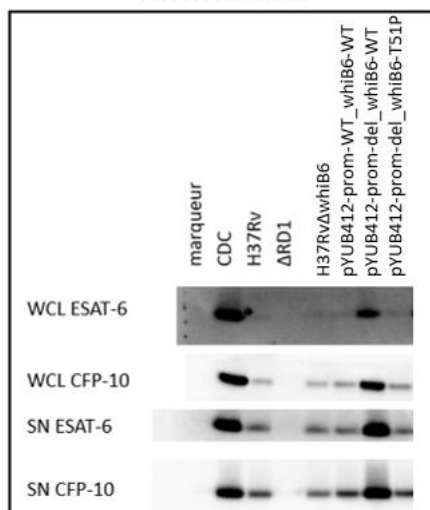


Figure 5. EsxA (ESAT-6) and EsxB (CFP-10) production (WCL, Whole Cell Lysate) and secretion of H37Rv, CDC1551, Δ RD1, *whiB6* mutant or complemented strains. This experiment has been done in triplicate per strain.

The mutation T51P in *WhiB6* reduces secretion of inflammatory cytokines in *Mtb* infected macrophages.

In order to check whether the T51P mutation affects the inflammatory response, macrophages were infected by the various *whiB6* mutant strains, and the amount of IL-1 β and TNF α quantified. THP-1 human macrophage cells were infected at a m.o.i. of 1:5 with H37Rv, the *whiB6* mutant or the complemented strains and the cytokines secreted in the supernatant quantified one day after phagocytosis (Figure 6). The strains were grown in 7H9 broth supplemented with either 10% OADC or 0.2% succinate to mimic the aerobic and hypoxic granulomatous environment respectively. IL-1 β was mildly secreted by the H37Rv, Δ *whiB6*, and complementation with the WT gene strains. The strains complemented with WT or mutated *whiB6* under the expression of the active del promoter induced a higher expression of IL-1 β . It seems that the strain complemented with WT under the expression of the active del promoter induced a higher expression of IL-1 β than the strain complemented with mutated *whiB6*. The

strain complemented with WT under the expression of the active del promoter also induced a higher secretion of TNF α than the other strains. The level of TNF α secreted by the strain with mutated *whiB6* was similar to the levels secreted by the H37Rv, Δ *whiB6*, and complementation with WT under the expression of the H37Rv normal promoter.

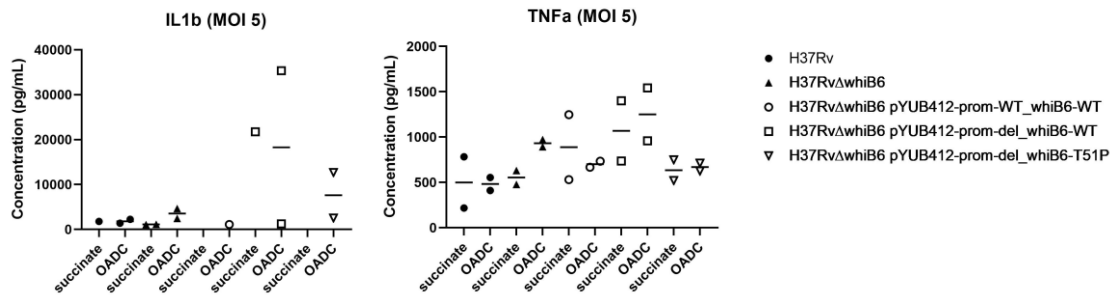


Figure 6. Secretion of inflammatory cytokines (IL-1 β and TNF α) by THP-1 human macrophage cell line infected with H37Rv, *whiB6* mutant or complemented strains. The density of cells was 2×10^5 and cells were infected at a m.o.i. of 1:5.

Discussion.

MDR TB outbreaks represents a brake on WHO's End TB Strategy. In this context, the greater diffusion of some clones is of concern. Our goal was to identify genetic variants of strains belonging to the MDR 100-32 clone that could explain its great diffusion. To gain insight into factors that favor transmission, we included 32 sequenced clinical isolates of our strains collection : 29 were MDR and 3 were susceptible. In the MS tree, the 29 MDR 100-32 strains displayed a star-like shape typical of expanding populations and already described for this clone [7]. When compared with the 3 susceptible strains but also with 457 other isolates, mostly MDR, representing lineage 1 to lineage 4, we identified 30 specific non synonymous mutations and small deletions of the MDR 100-32 clone and chose to investigate the role of two mutations

found in *whiB6* and *kdpDE*, that previously reported as specific variants of the MDR 100-32 clone in other studies [11,12], and coding for two proteins having a transcriptional activity.

First, KdpD is part of the two-component system KdpDE, which regulates the inducible, high-affinity K⁺ transporter KdpFABC [13–15]. When K⁺ concentrations are low, this transporter is activated via sensing of K⁺ by KdpD, autophosphorylation by the histidine kinase domain and activation of transcription factor KdpE. Additionally, several studies have reported that KdpDE regulates a range of virulence loci in many bacterial species, including *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium* and *Yersinia pestis*, and also promote virulence in a murine model in Mtb [10,16]. In the MDR 100-32 clone, the deletion of two nucleotides at the end of *kdpD* leads to a fusion protein KdpDE that could impact the regulatory function of KdpDE. In our study, no significant growth difference was noted between the $\Delta kdpDE$ mutant, its complemented strains, and H37Rv, suggesting that the activity of these genes are not essential for *in vitro* growth. For *kdpE*, this is not consistent with Sassetti's work where they found *kdpE* to be required for mycobacterial growth [17]. Although there is no clear explanation for this discrepancy, a notable difference with our work is that our deleted strain is a double mutant of *kdpD* and *kdpE*. Furthermore, we did not observe a significant growth difference between the complemented *kdpDE*-del strain and H37Rv even in medium without K⁺ suggesting that K⁺ sensing by KdpD and transcriptional activity by KdpE are not essential for growth. This seems to be in contrast with the growth defect of a *kdpA* mutant in *M. marinum* in medium without K⁺ [18]. Liu *et al.* also observed a growth defect of a *kdpA* mutant in low K⁺ conditions, which is surprising. If the growth defect was related to the lack of K⁺ absorption with a non-functional Kdp system, one would have expected to see no growth difference between the $\Delta kdpA$ and the WT strain when there is no K⁺ compared to low K⁺ conditions. In a study in Mtb, Cholo *et al.* demonstrated that inactivation of the KdpDE system with a knock-out construction caused attenuation of growth, even in the presence of favorable extracellular K⁺ concentrations and

near-neutral pH, both of which are conducive to exponential growth [13]. However, when taking a closer look at the growth curves during the exponential phase, the slopes were similar between the *kdpDE* mutant and the WT strain, suggesting identical growth rates. Additionally, we observed a lower growth of H37Rv Δ *kdpDE*, complemented strains and H37Rv in medium without K⁺, as described in a model of dormant state [19].

Then, WhiB6 belongs to the WhiB family of proteins, found exclusively in Actinobacteria [20]. *Mtb* has 7 WhiB proteins, which all contain four invariant cysteine residues that bind a Fe-S cluster. This Fe-S cluster allows them to react with O₂ and NO and in response regulate gene expression. WhiB6, encoded by a gene adjacent to the ESX-1 genetic locus, activates EsxA (ESAT-6) production and secretion [9]. Solans *et al.* demonstrated that WhiB6 was differentially regulated by the virulence regulator PhoP between clinical strains and the reference strain H37Rv [9]. The insertion of a nucleotide G at the -74 position relative to *whiB6* start codon in H37Rv leads to the formation of a stem-loop hindering the binding of PhoP to the DNA and as consequence, lower *whiB6* transcription leading to a reduced production and secretion of EsxA in this strain compared to clinical strains. In *M. marinum*, Chen *et al.* suggested that WhiB6 also regulates the Dos dormancy regulon, enabling to reprogram the metabolism of bacteria to a non-replicating “dormant” state [21]. In the MDR 100-32 clone, a non synonymous mutation in *whiB6* replaces threonine with proline at position 51. First, we did not observe an impact of this mutation on *in vitro* growth, suggesting that it did not impair the fitness. Likewise, no significant growth difference was observed when *whiB6* is deleted compared to H37Rv. This result is consistent with Sassetti’s work which suggested that *whiB6* is not an essential gene [17]. Growth was also not affected by the sequence of *whiB6* promoter (with or without a G at the -74 position relative to *whiB6* start codon). Interestingly, the complemented strain with T51P was not able to produce and secrete *in vitro* levels of EsxA and EsxB as high as the hypervirulent strain CDC1551, which has been involved in an outbreak of

TB [22]. Levels of EsxA and EsxB in the complemented strain with T51P were low and similar to those observed in H37Rv, but higher than in the Δ RD1 strain, suggesting sufficient levels for pathogenicity. However, the MDR 100-32 could still be hypervirulent due to other mechanisms, since Mtb, unlike some other bacterial pathogens, does not produce a single dominant factor responsible for causing disease, but rather induces pathology by a complex combination of virulence determinants and host responses [23]. Although in a different genetic background, expression of *whiB6* in a clinical strain that belongs to the B0/W148 clone has been described to be increased 40-fold, which could be a compensatory phenomenon due to the protein inactivation according to the authors [12]. Additionally, the complemented strain with T51P seems to induce less secretion of inflammatory cytokines, i.e. IL-1 β and TNF α , by THP-1 human macrophages. With a low pro-inflammatory response, the strain could be able to replicate more *in vivo*. Thus, assessing virulence *in vivo* is going to be of particular interest with, at the same time, low levels of EsxA and EsxB.

To explain why T51P WhiB6 activates less ESX-1 than the WT form, we propose 2 hypotheses. The first one may be that the presence in an α -helix of a proline, because of its fixed peptide bond, could locally modify enough the structure so that one of the nearby cysteine involved in the binding of the Fe-S cluster cannot bind anymore therefore interfering with the formation of the Fe-S cluster and alter the protein function (Figure 2). The second hypothesis is that the threonine may represent a potential site of phosphorylation that could activate the protein ; because of the mutation, WhiB6 could not be activated anymore. However, no study has so far reported a phosphorylation of WhiB6. These hypotheses would need to be tested and validated by biochemical approaches, and by determining the tridimensional structure of the mutant and its affinity for the Fe-S cluster.

Our present work studying individually B0/W148 specific mutations brings additional information of the impact of the mutations in *whiB6* and *kdpD*. To bring more information on

their role in the increased dissemination of the clone, specific experiments would need to be performed to address specifically this question in order to better understand the rapid diffusion of the B0/W148 clone.

Materials and methods.

Bacterial strains and culture conditions. *Escherichia coli* DH10B and DH5a strains, used for cloning procedures, were grown on LB agar medium and/or LB broth. Mtb strains were obtained from stock held at the French National Reference Centre for Mycobacteria or Pasteur Institute (for CDC1551 and Δ RD1 strains). Mycobacterial strains were cultured in Middlebrook 7H9 broth supplemented with 10% OADC (oleic acid, albumin, dextrose, and catalase, BD) and 0.05% Tween 80 or on Middlebrook 7H11 medium supplemented with 10% OADC. When required, antibiotics were included for selection purposes at following concentrations: ampicillin (100 μ g/mL), hygromycin (150 μ g/mL), kanamycin (20 μ g/mL), and zeocin (25 μ g/mL) for *E. coli*; hygromycin (50 μ g/mL), kanamycin (20 μ g/mL), and zeocin (25 μ g/mL) for mycobacteria.

For potassium limitation studies, Mtb strains were cultured in Middlebrook 7H9 broth supplemented with 10% OADC and 0.05% Tween 80 containing either 7.35 mM or 0 mM K⁺ in which case KH₂PO₄ was replaced by NaH₂PO₄.

Mutant generation and complementation. The Mtb H37Rv mutants were constructed by allelic replacement using the recombineering method [24]. The allelic exchange substrate *whiB6::zeo* was obtained by a three step PCR approach [25]. Briefly, two 500-bp fragments corresponding to the *whiB6* upstream and downstream regions were amplified by PCR from the Mtb H37Rv genomic DNA and linked to a third PCR fragment encoding the zeomycin

resistance cassette, to generate the 1.6 kb-fragment *whiB6::zeo*. The NEBuilder HiFi DNA Assembly Cloning Kit (Biolabs) was used to obtain the allelic exchange substrate *kdpDE::zeo*. The *whiB6::zeo* and *kdpDE::zeo* fragments were thus used to transform a Mtb H37Rv recombinant strain containing the pJV53 vector. The pJV53 plasmid encodes the recombination proteins gp60 and gp61 [26], whose expression is induced at mid-logarithmic phase by incubation with 0.2% acetamide for 24h [24]. The H37Rv-pJV53 acetamide-activated transformants were selected on solid medium for resistance to kanamycin and zeomycin. Deletion of *whiB6* and *kdpDE* was confirmed by whole genome sequencing. Spontaneous loss of the pJV53 plasmid was obtained by serial rounds of culture without kanamycin.

Five different integrative pYUB412-based plasmids (pYUB412-prom-WT_*whiB6*-WT, pYUB412-prom-del_*whiB6*-WT, pYUB412-prom-del_*whiB6*-T51P, pYUB412-*kdpDE*-WT, and pYUB412-*kdpDE*-del) harbouring the *whiB6* and the *kdpDE* genes were constructed. To obtain the *whiB6* and the *kdpDE* plasmids except for pYUB412-*kdpDE*-del, the *whiB6* and the *kdpDE* genes and their natural promoter region were amplified by PCR using modified primers (Supplementary Table 2), which allow the introduction of additional EcoRV and AseI (or XbaI for *kdpDE*) recognition sequences in the amplified fragment obtained. The resulting PCR product was digested and ligated into the EcoRV-AseI-digested pYUB412 (or XbaI-digested pYUB412 for *kdpDE*). A mutagenesis of the pYUB412-*kdpDE*-WT plasmid was performed to obtain the pYUB412-*kdpDE*-del plasmid using the QuickChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies). The pYUB412-based plasmids were used to transform the Mtb H37Rv Δ *whiB6* and H37Rv Δ *kdpDE* mutant strains. Transformed clones were selected on solid medium for resistance to zeomycin and hygromycin.

Strain collection. The study comprises Mtb strains received from French clinical laboratories most of the time for suspicion of resistant TB in the French National Reference Centre of

Mycobacteria. Ethical review and approval were not required for this study in accordance with the local legislation and institutional requirements. Overall, 489 Mtb isolates were analyzed, including 32 isolates of which 3 susceptible with MIRU-VNTR genotype MLVA Mtb 15-9 “100-32”, which has been linked with strains previously designated as “the successful Russian clone” [7]. Isolates were sampled between 2017 and 2021. All MDR 100-32 strains were resistant to isoniazid due to the well-known drug resistance mutation S315T in KatG. Rates of resistance were high for second-line drugs, i.e., fluoroquinolones (41%) and aminosides (52%).

DNA isolation, library preparation and sequencing. Mtb genomic DNA was extracted using the GeneLEAD VIII system (Diagenode). Libraries were prepared with the Nextera XT DNA Library Preparation kit (Illumina) and sequenced on the Illumina NextSeq 500 at the Mutualized Platform for Microbiology (P2M, Pasteur Institute). Raw data (fastQ files) were uploaded into BioNumerics software vx (Applied Maths), which mapped the reads against the reference sequence (Mtb H37Rv, GenBank accession no. NC_000962.3) and detected the single-nucleotide polymorphisms (SNPs). For greater accuracy, strict SNP filtering that removed positions in PE-PPE-PGRS genes was applied. The retained SNP positions had a minimum of 5x coverage and the minimum distance between SNPs was at least 12 base pairs (bp). All SNPs were manually checked by visualizing the corresponding read alignments. The fastQ files were also uploaded into Phyresse (<http://phyresse.org>) [27]. Only SNPs detected by both tools were retained.

***In vitro* growth curves.** All strains were diluted to an initial OD₆₀₀ of 0.05 in Middlebrook 7H9 medium, and the OD₆₀₀ was recorded at different time points over a period of 9 days. Data from three independent experiments were used for growth representation.

Structure modeling and comparison. The structure of the T51P WhiB6 mutant was modeled using AlphaFold and compared to the crystalized structure of WhiB6 bound to the SigmaAr4-RNP beta flip (pdb sequence 8D5V) using chimera [28].

Secretion analysis and immunoblotting. Secretion analysis of Mtb was performed as described before [29]. Briefly, bacteria were cultured until mid-logarithmic phase. Culture supernatants were recovered and proteins were precipitated with 10% (w/v) TCA. To obtain total lysates, mycobacterial pellets were washed twice and resuspended in PBS. Bacterial cells were broken by shaking with 0.1 mm silica beads (MP Biomedicals) for 8 min in a Tissue Lyser apparatus (Qiagen). Suspensions were centrifuged at 1,000 g for 3 min and the supernatant fraction obtained represented the total-cell lysate. Immunoblot analyses were performed with the anti-EsxA antibody (Hyb76-8, Antibodyshop, Statens Serum Institut), the anti-EsxB antibody, and an anti-SigA antibody.

Secretion of cytokines in THP-1 human macrophage cell line. THP-1 cells were cultured in RPMI Glutamax medium supplemented with 10% fetal calf serum. Before infection, cells were seeded in 96-well plates at a density of 2×10^5 and differentiated into macrophages by incubation with PMA for 1 day. The mutants and complemented strains as well as the control strains were pre-grown in Middlebrook 7H9 broth supplemented with 0.05% Tween 80 and 10% OADC or 0.2% succinate, and used in cell infection assays at a multiplicity of infection (m.o.i.) of 1:5 (bacteria:cells). At 1 day after phagocytosis, supernatants were recovered and the secretion of cytokines was measured.

References

1. Global Tuberculosis Report 2022. Available at: <https://www.who.int/teams/global-tuberculosis-programme/tb-reports/global-tuberculosis-report-2022>. Accessed 3 May 2023.
2. Casali N, Nikolayevskyy V, Balabanova Y, et al. Evolution and transmission of drug-resistant tuberculosis in a Russian population. *Nat Genet* **2014**; 46:279–286.
3. Beckert P, Sanchez-Padilla E, Merker M, et al. MDR M. tuberculosis outbreak clone in Eswatini missed by Xpert has elevated bedaquiline resistance dated to the pre-treatment era. *Genome Med* **2020**; 12:104.
4. Müller B, Borrell S, Rose G, Gagneux S. The heterogeneous evolution of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Trends Genet TIG* **2013**; 29:160–169.
5. Merker M, Rasigade J-P, Barbier M, et al. Transcontinental spread and evolution of *Mycobacterium tuberculosis* W148 European/Russian clade toward extensively drug resistant tuberculosis. *Nat Commun* **2022**; 13:5105.
6. Loiseau C, Windels EM, Gygli SM, et al. The relative transmission fitness of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in a drug resistance hotspot. *Nat Commun* **2023**; 14:1988.
7. Mokrousov I. Insights into the origin, emergence, and current spread of a successful Russian clone of *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Microbiol Rev* **2013**; 26:342–360.
8. Kapopoulou A, Lew JM, Cole ST. The MycoBrowser portal: a comprehensive and manually annotated resource for mycobacterial genomes. *Tuberc Edinb Scotl* **2011**; 91:8–13.
9. Solans L, Aguiló N, Samper S, et al. A specific polymorphism in *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv causes differential ESAT-6 expression and identifies WhiB6 as a novel ESX-1 component. *Infect Immun* **2014**; 82:3446–3456.
10. Parish T, Smith DA, Kendall S, Casali N, Bancroft GJ, Stoker NG. Deletion of two-component regulatory systems increases the virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* **2003**; 71:1134–1140.
11. Merker M, Blin C, Mona S, et al. Evolutionary history and global spread of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing lineage. *Nat Genet* **2015**; 47:242–249.
12. Bespyatykh J, Shitikov E, Guliaev A, et al. System OMICs analysis of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing B0/W148 cluster. *Sci Rep* **2019**; 9:19255.
13. Cholo MC, Matjokotja MT, Osman AG, Anderson R. Role of the kdpDE Regulatory Operon of *Mycobacterium tuberculosis* in Modulating Bacterial Growth in vitro. *Front Genet* **2021**; 12:698875.

14. Cholo MC, van Rensburg EJ, Anderson R. Potassium uptake systems of *Mycobacterium tuberculosis*: genomic and protein organisation and potential roles in microbial pathogenesis and chemotherapy. *South Afr J Epidemiol Infect* **2008**; 23:13–16.
15. Agrawal R, Saini DK. Rv1027c-Rv1028c encode functional KdpDE two--component system in *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochem Biophys Res Commun* **2014**; 446:1172–1178.
16. Freeman ZN, Dorus S, Waterfield NR. The KdpD/KdpE two-component system: integrating K⁺ homeostasis and virulence. *PLoS Pathog* **2013**; 9:e1003201.
17. Sasseti CM, Boyd DH, Rubin EJ. Genes required for mycobacterial growth defined by high density mutagenesis. *Mol Microbiol* **2003**; 48:77–84.
18. Liu X, Wang C, Yan B, Lyu L, Takiff HE, Gao Q. The potassium transporter KdpA affects persister formation by regulating ATP levels in *Mycobacterium marinum*. *Emerg Microbes Infect* **2020**; 9:129–139.
19. Salina EG, Waddell SJ, Hoffmann N, Rosenkrands I, Butcher PD, Kaprelyants AS. Potassium availability triggers *Mycobacterium tuberculosis* transition to, and resuscitation from, non-culturable (dormant) states. *Open Biol* **2014**; 4:140106.
20. Bush MJ. The actinobacterial WhiB-like (Wbl) family of transcription factors. *Mol Microbiol* **2018**; 110:663–676.
21. Chen Z, Hu Y, Cumming BM, et al. Mycobacterial WhiB6 Differentially Regulates ESX-1 and the Dos Regulon to Modulate Granuloma Formation and Virulence in Zebrafish. *Cell Rep* **2016**; 16:2512–2524.
22. Valway SE, Sanchez MP, Shinnick TF, et al. An outbreak involving extensive transmission of a virulent strain of *Mycobacterium tuberculosis*. *N Engl J Med* **1998**; 338:633–639.
23. Madacki J, Mas Fiol G, Brosch R. Update on the virulence factors of the obligate pathogen *Mycobacterium tuberculosis* and related tuberculosis-causing mycobacteria. *Infect Genet Evol J Mol Epidemiol Evol Genet Infect Dis* **2019**; 72:67–77.
24. van Kessel JC, Hatfull GF. Recombineering in *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat Methods* **2007**; 4:147–152.
25. Derbise A, Lesic B, Dacheux D, Ghigo JM, Carniel E. A rapid and simple method for inactivating chromosomal genes in *Yersinia*. *FEMS Immunol Med Microbiol* **2003**; 38:113–116.
26. van Kessel JC, Marinelli LJ, Hatfull GF. Recombineering mycobacteria and their phages. *Nat Rev Microbiol* **2008**; 6:851–857.
27. Feuerriegel S, Schleusener V, Beckert P, et al. PhyResSE: a Web Tool Delineating *Mycobacterium tuberculosis* Antibiotic Resistance and Lineage from Whole-Genome Sequencing Data. *J Clin Microbiol* **2015**; 53:1908–1914.

28. Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, et al. UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem* **2004**; 25:1605–1612.
29. Di Luca M, Bottai D, Batoni G, et al. The ESX-5 associated eccB-EccC locus is essential for *Mycobacterium tuberculosis* viability. *PloS One* **2012**; 7:e52059.

Supplementary table 1.

MDR 100-32 Mtb specific polymorphisms (non synonymous mutations and small deletions only). SNPs are given relative to H37Rv reference sequence. Small deletions are given in 5'-3' direction.

Gene	Name of gene	SNP position	SNP	Annotation	AA substitution
				Metabolism and respiration	
Rv0118c	oxcA	143120	c > a		Ala > Ser
Rv0338c		404130	t > c	Probable iron-sulfur-binding reductase	Glu > Gly
Rv0928	pstS3	1035426	t > g	Periplasmic phosphate-binding lipoprotein PstS3 (PBP-3) (PstS3) (PHOS1)	Phe > Cys
Rv1319c		1482185	c > t	Possible adenylate cyclase (ATP pyrophosphate-lyase) (adenylyl cyclase)	Gly > Asp
Rv1833c		2078967	c > a	Possible haloalkane dehalogenase	Asp > Tyr
Rv1850	ureC	2099129	c > t	Urease alpha UreC (urea amidohydrolase)	Ala > Val
Rv2268c	cyp128	2544135	a > c	Probable cytochrome P450 128 Cyp128	Ser > Ala
Rv2800		3109512	g > a		Trp > Stop
				Cell wall and cell processes	
Rv1031	kdpC	1155884	t > c	Probable potassium-transporting ATPase C chain KdpC	Met > Thr
Rv1877		2127011	t > g	Probable conserved integral membrane protein	Trp > Gly
Rv1972		2216720	Del GTC	Probable conserved Mce associated membrane protein	
Rv3871	eccCb1	4349982	g > t	ESX conserved component EccCb1	Ala > Ser
Rv3885c	eccE2	4367633	t > c	ESX conserved component EccE2	Thr > Ala
Rv3894c	eccC2	4379044	Del CG	ESX conserved component EccC2	
Rv2719c		3031090	g > a	Possible conserved membrane protein	Gln > Stop
Rv2333c	stp	3610335	g > t	Integral membrane drug efflux protein Stp	Arg > Ser
Rv3728		4175847	g > a	Probable conserved two-domain membrane protein	Trp > Stop
				Lipid metabolism	
Rv2243	fabD	2517129	a > g	Malonyl CoA-acyl carrier protein transacylase FabD	Thr > Ala
				Virulence/adaptation	
Rv1477	ripA	1668082	g > c	Peptidoglycan hydrolase	Ala > Pro
Rv1720c	vapC12	1947325	t > c	Possible toxin VapC12	His > Arg
Rv1967	mce3B	2210745	t > g	Mce-family protein Mce3B	Ser > Ala
				Regulatory proteins	
Rv1028c	kdpD	1149142	Del TG	Sensor protein	
Rv3862c	whiB6	4338371	t > g	Possible transcriptional regulatory protein	Thr > Pro
				Conserved hypotheticals	
Rv1518		1710601	t > a	Hypothetical protein	Stop > Lys
Rv1148c		1276392	g > a	Hypothetical protein	Pro > Ser
Rv1995		2238861	Del A	Hypothetical protein	
Rv2079		2335638	t > c	Hypothetical protein	Leu > Ser
Rv2331A		2604740	a > g	Hypothetical protein	Met > Val
Rv2638		2964454	c > t	Hypothetical protein	Pro > Leu
Rv3196		3566107	c > a	Hypothetical protein	Ala > Asp

DISCUSSION

L'objectif de notre travail de thèse était i) de détecter rapidement le génotype et la résistance chez les souches cliniques de *M. tuberculosis* MDR afin d'accélérer le choix du traitement le plus adapté, ii) d'étudier les mutations spécifiques du CC 100-32 MDR.

DISCUSSION DE LA PUBLICATION N°1

Dans un premier temps, nous avons étudié la technologie Deeplex Myc-TB pour détecter rapidement le génotype et la résistance des souches cliniques de *M. tuberculosis* MDR.

Le taux de succès, défini par une identification de l'espèce appartenant au complexe *M. tuberculosis* avec une couverture d'au moins 50% et une profondeur moyenne d'au moins 35x, était de 97,4% parmi les prélèvements présentant au moins un BAAR par champ, ce qui constitue un avantage considérable par rapport au WGS qui n'est pas encore au point à partir de prélèvements, et de 100% pour les souches. L'outil permet ainsi d'obtenir un antibiogramme génotypique étendu, à savoir la sensibilité à 13 antituberculeux, à partir du prélèvement sans attendre la culture. Les délais actuels au laboratoire pour disposer de cet antibiogramme sont une dizaine de jours, ce qui est bien inférieur au résultat de l'antibiogramme phénotypique (environ 6 semaines). Grâce à sa technologie combinant une amplification par PCR à du séquençage haut débit, l'outil Deeplex Myc-TB permet de mettre en évidence des populations hétérogènes, la limite de détection d'un variant minoritaire étant de 3%. Ces variants minoritaires qui peuvent correspondre à des processus de sélection de résistance en cours sont peu caractérisés et leurs impacts cliniques et thérapeutiques sont encore mal connus. En utilisant Deeplex Myc-TB à partir du prélèvement, la méthode permet aussi d'identifier des variants minoritaires absents en culture en raison de l'impact de la mutation sur le fitness. En pratique, l'utilisation récente du séquençage haut débit ciblé ne permet pas d'avoir le recul nécessaire pour savoir si l'on doit ou non prendre en compte ces variants minoritaires dans la prise en

charge thérapeutique. Il est donc nécessaire de poursuivre la caractérisation des données obtenues par la technologie Deeplex Myc-TB, particulièrement l'intérêt de la prise en compte des variants minoritaires, en menant des études prospectives et/ou rétrospectives pour mieux interpréter les informations et améliorer la prise en charge des patients.

Les résultats de sensibilité génotypique prédits par Deeplex Myc-TB étaient concordants avec ceux de l'antibiogramme phénotypique considérés comme la référence dans 85,4% des cas. Notamment, la concordance était élevée pour les deux principaux antituberculeux, à savoir la rifampicine et l'isoniazide, permettant la détection de la multirésistance. En effet, la détection de la multirésistance était de 100% dans notre collection de souches (n=75) une fois les mutations impliquant un bas niveau de résistance à la rifampicine et classées comme « mutation inconnue » par Deeplex Myc-TB interprétées en mutations impliquant la résistance à la rifampicine. Elle était également élevée pour les fluoroquinolones, le linézolide et la bédaquiline qui représentent trois des quatre antituberculeux du régime thérapeutique recommandé actuellement en cas de souche MDR. La concordance était plus basse pour d'autres molécules comme l'éthambutol ou le pyrazinamide, pouvant être expliqué par i) des mécanismes de résistance plus complexes et ii) une détermination de la sensibilité phénotypique plus difficile pour ces antituberculeux.

Le nombre de mutations inconnues identifiées par Deeplex Myc-TB était variable selon les antituberculeux. Dans ces situations, l'utilisateur peut être amené à prédire l'impact de la mutation sur la sensibilité à la molécule, selon le changement d'acide aminé, la localisation du changement d'acide aminé par rapport au site actif de la protéine, etc. Cependant, ce ne peut être qu'une prédiction qui doit être confrontée au résultat de l'antibiogramme phénotypique. Nous avons identifié des souches phénotypiquement résistantes à des antituberculeux pour lesquelles les résultats Deeplex Myc-TB ne mettaient pas en évidence de mutations de résistance, à savoir 16 souches résistantes à l'éthionamide, 4 souches résistantes au

pyrazinamide, 2 souches résistantes à l'isoniazide, 2 souches résistantes à la streptomycine, 2 souches résistantes au linézolide, une souche résistante à l'éthambutol et une souche résistante à la capréomycine. Cela pourrait être expliqué par l'absence de certaines cibles étudiées par l'outil, comme le promoteur du gène *embB* situé dans la région intergénique *embC/A*. Par ailleurs, il y aurait une utilité à ajouter d'autres cibles, par exemple celles impliquées dans la résistance au délamanide ou au prétomanide.

En plus d'obtenir le résistotype d'une souche, l'outil Deeplex Myc-TB permet d'établir le spoligotype et ainsi de mettre en évidence rapidement des transmissions inter-patients et des contaminations intra-laboratoires mais aussi de différencier une nouvelle infection d'une rechute. En comparant les résultats obtenus au génotypage par la technique MIRU-VNTR, nous avons constaté un plus faible pouvoir discriminant du spoligotype par rapport au MIRU-VNTR, ce qui est cohérent avec les données de la littérature. Autrement dit, on peut affirmer avec cette méthode que 2 souches sont différentes si le spoligotype est différent ; en revanche, il n'est pas possible d'affirmer que 2 souches sont semblables si le spoligotype est identique.

L'outil Deeplex Myc-TB est maintenant utilisé en routine au laboratoire en cas de suspicion de TB résistante à partir de prélèvements positifs à l'examen microscopique ou à partir de souches. Il est à noter que cela a permis d'abandonner l'ensemble des PCR Sanger qui étaient réalisées à partir de la culture et ainsi de gagner un temps technique considérable. La prise en charge du malade est optimisée puisque nous obtenons des données de sensibilité génotypique plus rapidement et nous pouvons éventuellement adapter le traitement dans des délais plus courts que ce que nous faisions avant la mise en place de l'outil, donc augmenter les chances de guérison du malade.

DISCUSSION DE LA PUBLICATION N°2

Après avoir amélioré le diagnostic de la tuberculose MDR dans le but d'adapter plus rapidement le traitement, nous avons cherché à comprendre la diffusion de certaines souches MDR, en particulier le clone Beijing B0/W148 en Europe et en Russie. En dehors de facteurs environnementaux, il a été montré que des mutations compensatoires en lien avec des mutations impliquant la résistance à des antituberculeux seraient associées à une plus grande transmission des souches [86]. Indépendamment de la résistance qui permet d'échapper aux thérapeutiques, d'autres variants génétiques pourraient représenter un avantage pouvant expliquer la diffusion de certaines souches plutôt que d'autres.

Tout d'abord, nous avons étudié 29 souches MDR correspondant au code MLVA Mtbc 15-9 100-32 de la méthode de génotypage MIRU-VNTR appartenant à la collection du CNR MyRMA. En comparant les génomes de ces souches avec ceux de la base de données du CNR MyRMA comprenant 3 souches 100-32 sensibles et 457 souches essentiellement MDR des lignées 1 à 4, nous avons mis en évidence 30 mutations non synonymes et petites délétions spécifiques du clone 100-32 MDR. Parmi elles, deux ont attiré notre attention : une mutation non synonyme T51P dans *whiB6* et une délétion de deux nucléotides à la fin de *kdpD*. Ces deux mutations ont aussi été rapportées comme spécifiques du clone B0/W148 MDR, qui est l'appellation du clone selon la méthode RFLP, dans une autre étude rassemblant 4987 souches Beijing dont 457 appartenant à ce clone, renforçant la spécificité de ces deux polymorphismes [89].

Ces deux mutations paraissaient intéressantes d'être étudiées car les deux gènes codent pour des facteurs de transcription impliqués dans la virulence. D'une part, KdpD fait partie d'un système à deux composants KdpDE qui régule l'expression de l'opéron *kdpFABC*, codant pour un transporteur inductible de potassium. KdpD est capable de détecter le signal d'une concentration basse en potassium et de transmettre l'information au régulateur KdpE qui

déclenche la transcription de l'opéron *kdpFABC* et ainsi favorise l'absorption de potassium par la bactérie. KdpDE pourrait être impliqué dans d'autres fonctions que le transport du potassium puisqu'il a été montré que la délétion de *kdpDE* diminue le délai de survie de souris SCID infectées par le mutant comparé à des souches infectées par la souche de référence H37Rv [102]. Dans le clone 100-32 MDR, une délétion de deux nucléotides à la fin du gène *kdpD* entraîne une protéine de fusion KdpDE, suggérant un impact sur le rôle transcriptionnel de KdpE. Pour étudier les conséquences de cette petite délétion, nous avons choisi de construire un mutant de délétion *kdpDE* dans la souche de référence H37Rv puis de compléter ce mutant avec la forme WT de *kdpDE* et la forme mutée à l'aide du plasmide intégratif pYUB412. Nous n'avons pas observé de différence significative de croissance *in vitro* entre les différentes souches en présence de potassium (7 mM K⁺) ou en l'absence de potassium, suggérant l'absence d'impact de la délétion sur le fitness de la bactérie. Il serait intéressant de voir s'il existe une différence avec des concentrations en potassium inférieures à 7 mM K⁺. Dans une étude menée chez *M. marinum*, Liu *et al.* ont observé une différence significative de croissance *in vitro* à la phase stationnaire pour la souche KO *kdpA* pour les concentrations 0,07 mM, 0,007 mM et 0 mM K⁺ [122]. Il est difficile d'expliquer cette différence par l'absence du transporteur KdpFABC comme le font les auteurs puisqu'en l'absence de potassium, la présence de KdpFABC ne devrait pas apporter d'avantage, ne permettant pas d'absorber plus de potassium. En revanche, nous avons observé une différence entre les deux conditions avec une meilleure croissance en milieu avec potassium. Cela est concordant avec la littérature puisque l'absence de potassium *in vitro* limite la croissance bactérienne et a d'ailleurs été proposée par certains auteurs comme modèle de dormance [110]. L'étude du transcriptome nous permettra d'étudier l'impact de la protéine de fusion KdpDE sur l'expression de *kdpFABC* mais aussi d'autres potentiels gènes qui pourraient être impliqués dans la virulence. L'étude de la virulence *in vivo* dans un modèle murin est également en cours.

D'un autre côté, WhiB6 est impliqué dans la virulence puisque ce facteur de transcription active la production et la sécrétion des substrats EsxA et EsxB du système de sécrétion de type VII ESX-1, dont la fonction principale est de permettre au bacille d'échapper à l'élimination par le phagosome en rompant la vacuole de phagocytose, puis une fois dans le cytosol d'entraîner la mort cellulaire et d'infecter ensuite une autre cellule. WhiB6 est lui-même régulé par PhoP, à des niveaux de régulation différents selon que l'on considère les souches de référence H37Rv/a ou les souches cliniques. L'insertion d'un nucléotide dans le promoteur du gène *whiB6* chez les souches H37Rv/a gênerait la fixation de PhoP, ce qui entraîne une moindre transcription de *whiB6* et *in fine* une production et une sécrétion plus faible de EsxA et EsxB. Un précédent travail au laboratoire a permis d'obtenir différentes constructions pour étudier l'impact de la mutation T51P dans WhiB6 caractéristique du clone 100-32 MDR chez *M. tuberculosis*. Le gène *whiB6* a été inactivé par insertion d'un gène marqueur de résistance à un antibiotique dans la souche H37Rv. Cette souche a d'une part été complémentée avec le gène *whiB6* WT sous le contrôle de son propre promoteur afin de restaurer le phénotype de la souche de départ, mais aussi avec la forme WT ou mutée T51P de *whiB6* sous le contrôle du promoteur comprenant une délétion et permettant l'expression et la sécrétion importante d'EsxA et EsxB. L'étude de la production et de la sécrétion *in vitro* de EsxA et EsxB a montré une plus faible production et sécrétion de EsxA et EsxB pour la souche complémentée avec la mutation T51P, suggérant une virulence atténuée. Néanmoins, les niveaux étaient équivalents à ceux dans H37Rv et l'on sait que ceux-ci permettent de conserver la virulence de la souche *in vivo*. Comment cette simple mutation entraîne un tel effet n'est pas connu. Nous émettons deux hypothèses concernant son impact sur la protéine WhiB6. La mutation est présente au sein d'une hélice α de la protéine. La modélisation de la protéine mutée par AlphaFold ne montre pas de changement majeur de structure tridimensionnelle. La présence d'une proline à la place d'une thréonine pourrait modifier la structure de cette petite protéine de 116 acides aminés. En effet, la proline étant un

acide aminé rigide, qui a été montré capable d'altérer la structure des hélices α , il est possible qu'une modification même mineure de l'hélice α contenant cette proline perturbe la liaison des quatre cystéines au cluster Fe-S, qui est essentiel à la fonction de la protéine. Une autre hypothèse serait que le remplacement d'une thréonine par la proline supprime un potentiel site de phosphorylation, qui pourrait correspondre à un signal d'activation de la protéine. Afin de mieux comprendre les mécanismes moléculaires de cette inactivation, il conviendrait d'analyser la structure tridimensionnelle de WhiB6. Les prédictions de structure par AlphaFold semblent ne pas être un outil adapté pour bien estimer l'impact du changement d'un seul acide aminé, bien qu'une étude récente suggère l'inverse [142–144]. Il serait donc plus pertinent de produire dans des bactéries et purifier les formes WT et mutées de WhiB6. Ainsi il sera possible de quantifier par spectroscopie l'affinité de liaison des protéines au cluster Fe-S et déterminer la structure par cristallographie. Ce travail faisait d'ailleurs partie de mes objectifs initiaux de thèse, mais par manque de temps, cette partie du travail a été abandonnée pour me concentrer sur l'étude de la mutation dans *kdpD*. J'ai néanmoins pu cloner, exprimer et commencer à purifier la protéine WhiB6 WT.

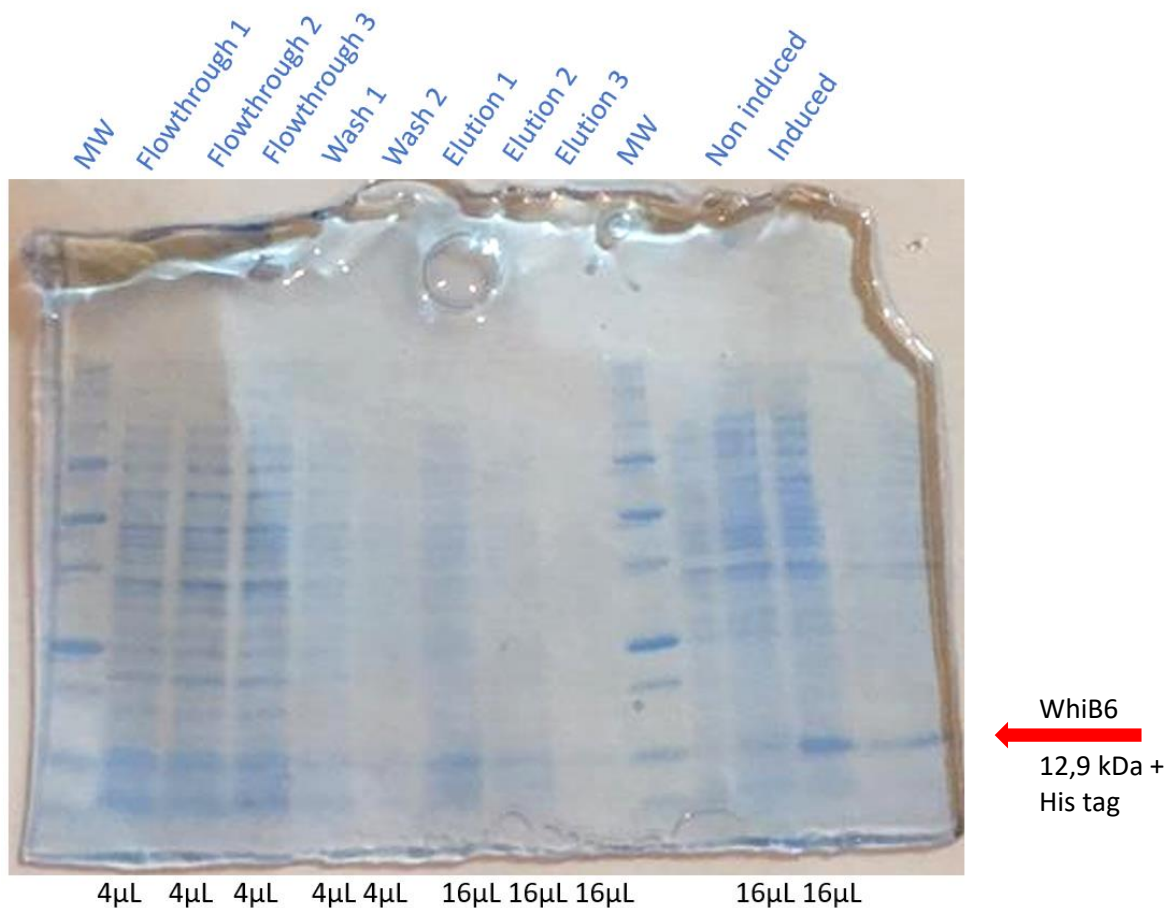


Figure 43. Gel coloré au bleu de Coomassie montrant la purification de WhiB6

Par ailleurs, nous n'avons pas observé de différence significative de croissance *in vitro* entre les différentes souches, en cohérence avec les travaux de Sassetti qui n'avaient pas retenu ce gène comme essentiel [118]. Ensuite, la production de cytokines pro-inflammatoires (IL1b et TNF α) par les macrophages humain THP-1 était plus faible pour la souche complémentée avec la mutation T51P par rapport à la souche complémentée équivalente à la souche clinique, c'est-à-dire avec la délétion d'un nucléotide dans le promoteur du gène *whiB6*. L'étude de la virulence *in vivo* en cours permettra de savoir plus précisément si cette mutation est importante pour la virulence de la bactérie et si, comme le suggèrent les travaux sur les macrophages, la réponse de l'hôte diminuée pourrait permettre au bacille de répliquer et contrebalancer un système ESX-1 moins efficace.

PERSPECTIVES

Ce travail de thèse ouvre plusieurs types de perspectives. Les perspectives immédiates de ce travail sont de compléter :

- l'étude de la croissance *in vitro* pour les souches mutée et complémentées *kdpDE* en présence de faibles concentrations de potassium

De faibles concentrations de potassium pourraient permettre de voir une différence de croissance *in vitro* lorsque *kdpDE* est absent ou lorsque la protéine de fusion KdpDE est présente.

- l'étude de la virulence *in vivo* dans un modèle murin

Des souris BALB/c ont été infectées avec les différentes souches *whiB6* et *kdpDE* et les délais de survie ainsi que la mesure des inoculums après euthanasie à différents temps sont en train d'être déterminés.

- la finalisation de l'étude du transcriptome pour l'ensemble des souches mutées et complémentées

Les deux gènes *whiB6* et *kdpE* sont des facteurs de transcription. Pour *whiB6*, l'étude du transcriptome pourrait permettre d'identifier d'autres gènes régulés par WhiB6 en dehors du système ESX-1. Pour *kdpE*, la protéine de fusion créée par la délétion des deux nucléotides à la fin de *kdpD* pourrait gêner la fonction de facteur de transcription ; l'étude du transcriptome devrait permettre d'en obtenir la réponse. Les extraits d'ARN ont été obtenus et l'analyse sera débutée prochainement. Toutes ces données vont permettre de compléter le manuscrit 2 en vue d'une soumission prochaine.

Plus largement, ce travail devrait permettre de mieux comprendre le rôle de deux mutations spécifiques du clone B0/W148 dans la virulence de la bactérie. Cependant, il est probable que ces mutations seules n'expliquent pas la dissémination et la transmission accrue du clone mais

plutôt qu'elles ont un rôle au sein d'un environnement génétique particulier. Néanmoins, il est nécessaire d'étudier l'impact de chacune des mutations de façon isolée et réductionniste avant de les combiner avec d'autres. Pour mieux aborder la question de la transmissibilité, certains modèles murins pourraient être plus intéressants que d'autres. Dans une étude récente chez la souris C3HeB/FeJ, les auteurs ont choisi deux souches cliniques appartenant à la lignée 4 issues d'une étude au Brésil selon le nombre de cas secondaires que le cas index avait entraînés [145]. Ils ont observé que, pour la souche clinique avec une transmission importante, la phagocytose de *M. tuberculosis* par les macrophages alvéolaires conduit rapidement au transfert des cellules dans l'interstitium pulmonaire selon un mécanisme IL-1R dépendant, suivi par une dissémination rapide des bactéries aux ganglions lymphatiques correspondant au territoire de drainage, une réponse Th1 et le recrutement des cellules T dans les poumons. Cela entraîne la formation d'un granulome et une limitation de la multiplication bactérienne. Le granulome peut ensuite évoluer vers un stade de nécrose centrale, libérant les bactéries dans les voies aériennes et entraînant la transmission éventuelle. A l'inverse, l'infection des souris par la souche avec une faible transmission conduit à un blocage des macrophages alvéolaires qui ont phagocyté *M. tuberculosis* dans l'interstitium pulmonaire, empêchant le transport des bactéries aux ganglions lymphatiques et la réponse Th1, ce qui retarde l'arrivée des cellules T spécifiques d'antigènes aux poumons. L'absence de réponse Th1 induit la différenciation des cellules T en réponse Th17 permettant l'infiltration par des polynucléaires neutrophiles et une atteinte disséminée. La plus grande diffusion de certaines souches pourrait ainsi être expliquée par des réponses immunitaires particulières. De plus, le modèle murin pourrait ne pas être complètement adapté à l'étude de la transmission. En effet, il a été montré que le modèle du cochon d'Inde était capable de détecter les variations de virulence en lien avec les niveaux d'EsxA, à la différence du modèle murin [135].

En ce qui concerne le diagnostic de la résistance génotypique des souches cliniques, la technologie Deeplex Myc-TB est maintenant bien validée. Dans l'idéal, il serait avantageux de pouvoir séquencer l'ensemble du génome des bactéries à partir du prélèvement pour être capable de dépister toutes les mutations présentes mais aussi de limiter les biais liés à l'étude du génome à partir de la culture. Afin d'éliminer l'ADN humain qui gêne l'assemblage des reads et augmenter la quantité d'ADN mycobactérien dans le prélèvement, des techniques d'enrichissement sont en cours de validation, par exemple de type microfluidique [146]. L'obtention du WGS à partir du prélèvement sera une aide précieuse pour le choix des thérapeutiques les mieux adaptées aux patients.

AUTRES PUBLICATIONS

Active tuberculosis screening among the displaced population fleeing Ukraine, France, February to October 2022

Jean-Paul Guthmann¹, Philippe Fraisse², Isabelle Bonnet³, Jérôme Robert³

1. Santé publique France, Saint Maurice, France

2. Réseau National des Centres de lutte antituberculeuse (CLAT), Strasbourg, and Groupe pour la recherche et l'enseignement en pneumo-infectiologie de la Société de pneumologie de langue française, Paris, France

3. Centre National de Référence des Mycobactéries, Laboratoire de Bactériologie-Hygiène, Site Pitié-Salpêtrière, Groupe hospitalo-universitaire APHP, Sorbonne Université, and CIMI-Paris, Inserm U1135, Sorbonne Université, Paris, France

Correspondence: Jean-Paul Guthmann (jean-paul.guthmann@santepubliquefrance.fr)

Citation style for this article:

Guthmann Jean-Paul, Fraisse Philippe, Bonnet Isabelle, Robert Jérôme. Active tuberculosis screening among the displaced population fleeing Ukraine, France, February to October 2022. *Euro Surveill.* 2023;28(12):pii=2300155. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2023.28.12.2300155>

Article submitted on 09 Mar 2023 / accepted on 22 Mar 2023 / published on 23 Mar 2023

Persons fleeing Ukraine since February 2022 have potentially higher risk of tuberculosis (TB) vs all European Union countries. Interest of active TB screening among this population is debated and not widely adopted. In this screening intervention by a network of TB centres in France, the number needed to screen (NNS) was 862 to find one case. This experience shows that this strategy may be relevant for TB control in situations of massive displacement, similar to that following the Russian invasion.

On 20 March 2022, the tuberculosis (TB) control network in France (Centres de lutte antituberculeuse (CLAT)) issued a warning regarding health issues, including TB, of persons arriving from Ukraine following the Russian invasion in February 2022. We sought to evaluate the results of the French active screening strategy based on an existing network of TB centres to detect TB in people coming from Ukraine to France.

Tuberculosis screening of migrants in France

Following the Russian invasion of Ukraine on 24 February 2022, the Council of the European Union (EU) adopted a decision on the temporary protection of persons fleeing Ukraine. This emergency mechanism, which aimed to provide an immediate and large protection to displaced persons [1], was implemented in France on 10 March 2022 [2]. Because Ukraine reported the second highest number of TB cases in the World Health Organization (WHO) European Region (incidence rate: 65/100,000 population) in 2019 and 27% of multidrug-resistant (MDR) TB among new cases [3], a large population movement from this country may thus challenge and put national TB programmes under

high pressure [4]. Hence, the district authorities and practitioners were reminded of the French guidelines regarding the screening and management of migrants arriving from a high TB incidence country, on 23 March 2022 [5]. These include the possibility of a systematic full health consultation within 4 months after arrival [6] and a chest X-ray (CXR) for TB screening [7].

In metropolitan France, active TB screening is usually performed by the 105 CLATs located in each of the 96 districts, and less frequently by outreach screening campaigns in schools, camps or shelters for migrant workers [8,9]. The staff of the CLAT provided active recruitment for TB screening among the displaced population either from where they lived or stayed temporarily, or in persons that on some occasions were referred for screening by the administrative authority. Active screening for TB was considered when a person had been actively referred to the TB centre and had performed a CXR.

CLAT screening activities February to October 2022

A questionnaire was administered to the CLAT network by the network coordinator to assess the number of TB cases recorded among people fleeing from Ukraine and the number of persons screened during the first 8-month period (February–October 2022) after the Russian invasion.

Data from this survey (number of persons screened, characteristics and the context of diagnosis of each TB case recorded, e.g. through active screening or other) were collected by mail or by phone call to the CLAT staff. All 105 TB centres responded to the survey. A total of 17 TB cases had been recorded in displaced persons

TABLE 1

Characteristics of tuberculosis cases in persons fleeing from Ukraine reported by CLAT network, France, February–October 2022^a (n = 17)

Screening vs other	Case	Context of diagnosis	Symptoms	Month of screening/visit	Country or region of birth	Clinical Site	Microscopy (AFB)	Culture	MDR
Screening	1	Active screening	Yes	Mar	Ukraine	Pulmonary	Negative	Positive	Yes
	2	Active screening	Yes	May	Ukraine	Pulmonary	Positive	Positive	No
	3	Active screening	No	May	Ukraine	Pulmonary	Negative	Positive	No
	4	Active screening	No	Jun	Ukraine	Pulmonary	Positive	Positive	No
	5	Active screening	No	July	Ukraine	Pulmonary	Positive	Positive	No
	6	Active screening	No	Aug	Ukraine	Pulmonary	Negative	Positive	Yes
	7	Active screening	Yes	Sep	Eastern Europe	Pulmonary	Negative	Positive	Yes
	8	Active screening	No	Aug	Ukraine	Pulmonary	Negative	Positive	Yes
	9	Active screening	No	Oct	Ukraine	Pulmonary	Negative	Positive	No
	10	Active screening	No	Oct	Ukraine	Pulmonary	Negative	Negative	No
Other	11	Presented to CLAT for continuation of treatment	No	Mar	Ukraine	Pulmonary	Positive	Negative	No
	12	Presented to CLAT for continuation of treatment	No	Mar	Ukraine	Pulmonary	Positive	Negative	No
	13	Presented to CLAT because of symptoms	Yes	Mar	West Africa	Pulmonary/ bone	Positive	Positive	No
	14	Presented to CLAT because of symptoms	Yes	Jul	Ukraine	Pulmonary	Positive	Positive	Yes
	15	Presented to CLAT because of symptoms; TB treatment discontinued in October 2021	Yes	Jun	Central Africa	Pulmonary	Negative	Positive	No
	16	Referred to CLAT by a general practitioner	Yes	Jul	Ukraine	Pulmonary	Negative	Positive	Yes
	17	Contact investigation, family member of Case 12	No	May	Ukraine	Pulmonary	Negative	Positive	No

AFB: acid-fast bacillus; CLAT: tuberculosis centre; MDR: multidrug-resistant; TB: tuberculosis.

^a All cases arrived to France in 2022.

from Ukraine during the survey period, including three persons (one adult aged ca 60 years, one 8-month-old child and a young adult from a country in central Africa residing in Ukraine) who had TB treatment interrupted after fleeing the country. The 17 cases had a median age of 42 years (range: 8 months–65 years) and the male/female sex ratio was 1.12. Six cases were confirmed as MDR by the National reference laboratory (NRL) for Mycobacteria (none were extensively drug-resistant (XDR)) (Table 1). Among the 17 TB cases, 10 were identified through active screening among a total population of 8,621 screened persons (Table 2), resulting in a TB prevalence of 116 cases per 100,000 population (i.e. 10/8,621). Consequently, the number needed to screen (NNS), i.e. the inverse of the prevalence of TB in the screened population [10], was 862 persons screened to find one TB case. Among the 10 cases identified through active screening, there were nine Ukrainians and one person from a high MDR TB burden country in the WHO European Region, seven were non-symptomatic and four were MDR (Table 1).

Of interest, the TB centre of the city of Strasbourg, close to the German border (one of the three main reception centres in France), provided additional data on persons from Ukraine. The main characteristics of the 874 persons who were contacted and offered screening from March to July 2022 were: median delay since arrival: 2.5 months; 67% were female (males, n = 286; females, n = 588); mean age: 29.5 (males) and 33.0 (females) years, p = 0.02; overall range: 8 months–88 years). Out of these, 432 (49%) accepted to be screened by CXR and no TB case was diagnosed. The complete results of this survey will be published at a later occasion.

Analysis of data provided by the tuberculosis mandatory notification system

To complement the results of the active screening performed by the CLAT network, we analysed data regarding TB among Ukrainians as recorded in the TB mandatory notification system. In this national surveillance, information on TB cases diagnosed in France is entered by physicians in an electronic database on a continuous basis and analysed yearly by Santé publique

TABLE 2

Number of tuberculosis cases in persons fleeing from Ukraine reported by the CLAT network by mainland regions and diagnosis context, France, February–October 2022 (n = 17)

Region	Cases detected through active screening by the CLAT		Cases recorded by the CLAT in a context other than active screening				Total cases
	Screened	Cases	Presented to CLAT for continuation of treatment	Presented to CLAT because of symptoms	Referred to CLAT by GP	Contact investigation	
Auvergne-Rhône-Alpes	1,467	3	0	0	0	0	3
Bourgogne-Franche-Comté	461	1	0	0	0	0	1
Bretagne	169	0	1	2	1	1	5
Centre-Val de Loire	1,117	1	0	0	0	0	1
Corse	97	0	0	0	0	0	0
Grand-Est	1,473	0	0	0	0	0	0
Hauts-de-France	50	0	0	0	0	0	0
Ile-de-France	160	0	0	0	0	0	0
Normandie	771	0	0	0	0	0	0
Nouvelle-Aquitaine	926	2	1	0	0	0	3
Occitanie	1,059	3	0	0	0	0	3
Pays de la Loire	490	0	0	0	0	0	0
Provence-Alpes-Côte d'Azur	381	0	0	1	0	0	1
TOTAL	8,621	10	2	3	1	1	17

CLAT: tuberculosis centre; GP: general practitioner.

France [11]. In 2022, 33 new TB cases born in Ukraine were notified through this surveillance system, including all nine cases born in Ukraine who were identified through active screening by the CLAT network (Table 1). Nine of these 33 cases were confirmed by the NRL as MDR-TB (Table 3). The remaining 24 TB cases (including 15 who arrived in France in 2022 after the Russian invasion) were identified through different means, mainly by standard consultation, and not by active screening. Overall, the 33 cases represented a notable increase in the number of cases reported compared with the previous years. Between 2008 and 2019, 55 cases were recorded in persons born in Ukraine (mean: 4.6 cases/year), the more recent figures being eight, four, and four cases for the years 2019, 2020, and 2021, respectively. Considering that the number of persons originating from Ukraine in 2022 in France included 19,100 permanent residents (source: Insee 2019 [12]) and 118,994 who had arrived in France because of the war [13], the incidence of TB in this population could be estimated to 24 cases per 100,000 population.

Discussion

Our data suggest that active CXR screening was an effective intervention in the French context to detect TB cases among the population displaced from Ukraine. Indeed, 10 cases were detected by the CLAT through active CXR screening, representing more than half of the cases reported by the CLAT during the same period. These 10 cases had all recently left Ukraine as consequence of the war and arrived in France in 2022. Among these 10 cases, seven were asymptomatic cases who would possibly have remained undiagnosed should the

screening not have been performed. The relevance of active screening is further reinforced by two factors: (i) three patients were smear positive and hence potentially highly contagious and (ii) four carried an MDR strain, suggesting they represented a particular risk for people living close to them, and early identification allowed a quick implementation of appropriate treatment. We therefore think that active screening was useful regarding TB control, and especially to prevent the occurrence of new and potentially severe cases, pending the effective treatment of detected cases. Our findings are in line with what was found in asylum seekers entering Germany in 2015 where TB cases identified through active screening represented 21% of all cases notified that year [14].

The prevalence of 116 cases per 100,000 population reported by the CLAT network through active screening of the displaced population fleeing Ukraine is higher than the mean prevalence reported in Ukraine [3]. It is also much higher than the figure estimated through the mandatory notification system in France, although this figure may be underestimated because of uncertainty in the denominator. This may be explained by the rather high mobility of this population that, in part, did not necessarily remain in France for a long time. In addition, among the displaced population, it is possible that those who underwent CXR screening may have been at higher risk of being affected with TB, either because they were more often symptomatic or because they more frequently had a history of TB than the general displaced population. Although data are missing in our country to confirm this hypothesis, such

TABLE 3

Characteristics of tuberculosis cases reported through mandatory notification in persons born in Ukraine, France, 2022 (n = 33)

Characteristics	Cases n = 33	%
Age		
Median in years (SD)	38 (13.5)	
Sex		
Male	19	57
Female	14	43
Context of diagnosis		
Spontaneous presentation to health structure	18	55
Contact investigation	4	12
Active screening	9	27
Other	2	6
Year of arrival		
Before 2022	5	15
2022	23	70
Unknown	5	15
Previous history of tuberculosis		
Yes	4	12
No	23	70
Unknown	6	18
Clinical site		
Pulmonary only	29	88
Extra-pulmonary	2	6
Pulmonary and other	2	6
Microscopy		
Positive	19	57
Negative	12	36
Unknown	2	7
Culture		
Positive	28	85
Negative	5	15
Multidrug-resistant tuberculosis		
Yes	9	27
No	24	73

a bias may have underestimated the NNS, which was 862 in our survey. This number is, however, lower than the mean NNS of 1,027 reported in a recent literature review when screening adult migrants with TB symptoms in low/moderate TB incidence settings [10]. Even if our screening data overestimate the true TB prevalence in this displaced population, we feel that our programmatic data show that active screening allowed the detection of additional cases that otherwise may have been overlooked.

Our experience also illustrates some difficulties faced for TB control in case of massive population displacement. Firstly, only a small number of the displaced persons were actively screened for TB. Barriers to screening may be linked to different factors such as

competing interests, perceived health or scepticism towards the programme purposes [15]. In France, displaced persons were offered accommodation in short-stay community centres (e.g. schools, gymnasiums, hotels) located near entering sites (e.g. borders, train stations, airports) before being offered a more stable accommodation and put in contact with public services and associations. Secondly, families or individuals were encouraged to offer private housing. This strategy of short-stay centres and rapid relocation makes it difficult to offer screening in a timely manner. Thirdly, few persons had TB symptoms or a previous history of TB and therefore most were hesitant to attend a health centre for CXR screening. This is supported by the data from the Strasbourg TB centre, where less than half of the persons referred for screening accepted a CXR. Finally, the priorities of this non-symptomatic population may have been centred towards emergency needs for housing, job or school seeking more than for health issues.

We focused our report on active TB disease, although diagnosis and chemoprophylactic treatment of latent TB infection is another issue in the displaced populations. Active screening for TB of displaced populations has been implemented in other European countries, where the target population was selected through different strategies such as the results of a skin test [16] or the presence of symptoms [17]. The effectiveness of different screening strategies has been evaluated, yielding varying results [18-20]. Our data, albeit from a single country, may somewhat challenge the WHO/ECDC recommendation of not recommending universal screening of refugees arriving in European countries from Ukraine [21].

Conclusions

Our results underline the interest of a pre-established well-organised network of TB centres such as the CLAT network in case of sudden mass migration from a high TB incidence country. Increasing effectiveness of the existing strategy may require further well-trained manpower and financial support, both likely not being readily available. Although screening strategies could vary in other European countries according to local settings and available resources, it appears of interest evaluating the interventions addressing TB control among displaced populations from Ukraine to adapt international recommendations on observational data.

Ethical statement

Our paper reports programmatic, anonymous and aggregated data. This analysis is based on routine surveillance data and does not need further approval, other than the usual regulations.

Acknowledgements

We would like to acknowledge the very dedicated professionals of the tuberculosis control centres (CLAT) for their contribution to this particular work and more generally for their

key role in improving control and surveillance of tuberculosis in France. We also thank health professionals and the staff of Regional Health Authorities (ARS) who participate to mandatory notification of TB cases. Special thanks to the team of the CLAT of Strasbourg for its important role in collecting information on the displaced arriving to this city. The National Reference Laboratory for Mycobacteria (Alexandra Aubry, Florence Morel, Nicolas Veziris) contributed to the surveillance and provided laboratory support. Isabelle Parent du Chatelet and Didier Che (SpFrance) provided helpful comments after reading the last version of the manuscript.

Conflict of interest

None declared.

Authors' contributions

Philippe Fraisse was responsible for coordinating initial data collection and reporting. Jean-Paul Guthmann contacted the CLATs in a second step for data assessment and completeness, and analysed mandatory notification data. Jérôme Robert and Isabelle Bonnet assessed the quality and validity of bacteriological data. All authors participated equally to the analysis of the active screening survey and to writing the manuscript.

References

1. Council of the European Union. Ukraine: Council unanimously introduces temporary protection for persons fleeing the war. Press release. 4 Mar 2022. Available from: <https://www.consilium.europa.eu/en/press/press-releases/2022/03/04/ukraine-council-introduces-temporary-protection-for-persons-fleeing-the-war/>
2. Ministère de l'Intérieur. Instruction relative à la mise en œuvre de la décision du Conseil de l'Union européenne du 5 mars 2022, prise en application de l'article 5 de la directive 2001/55/CE du Conseil du 20 juillet 2001. [Instruction on the implementation of the Decision of the Council of the European Union of 5 March 2022 pursuant to Article 5 of Council Directive 2001/55/EC of 20 July 2001]. Paris: Journal officiel de la République française; 2022. French. Available from: https://www.legifrance.gouv.fr/circulaire/id/45302?page=1&pageSize=10&query=+INTV2208085&searchField=ALL&searchType=ALL&tab_selection=all&typePagnation=DEFAULT
3. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). Tuberculosis surveillance and monitoring in Europe 2021 – 2019 data. Stockholm: ECDC; 2021. Available from: <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/tuberculosis-surveillance-and-monitoring-europe-2021-2019-data>
4. Dahl V, Migliori GB, Lange C, Wejse C. War in Ukraine: an immense threat to the fight against tuberculosis. *Eur Respir J*. 2022;59(4):2200493. <https://doi.org/10.1183/13993003.00493-2022> PMID: 35450921
5. Vignier N, Halley des Fontaines V, Billette de Villemeur A, Cazenave-Roblot F, Hoen B, Chauvin F, et al. Public health issues and health rendezvous for migrants from conflict zones in Ukraine: A French practice guideline. *Infect Dis Now*. 2022;52(4):193-201. <https://doi.org/10.1016/j.idnow.2022.04.006> PMID: 35483634
6. Haut conseil de la santé publique (HCSP). Avis relatif aux recommandations concernant la visite médicale des étrangers primo-arrivants en provenance de pays tiers. [Medical examination of newly arrived foreigners]. Paris: HCSP. [Accessed: 14 Feb 2023]. French. Available from: <https://www.hcsp.fr/Explore.cgi/avisrapportsdomaine?clefr=672>
7. Haut conseil de la santé publique (HCSP). Avis relatif à la détermination d'un seuil pratique pour définir un pays de haute endémicité tuberculeuse. May 18 2018. [Determination of a threshold of high tuberculosis endemicity]. Paris: HCSP. [Accessed: 14 Feb 2023]. French. Available from: <https://www.hcsp.fr/Explore.cgi/avisrapportsdomaine?clefr=668>
8. Lailler G, Comolet T, Riva E, Combroure JC. Les activités de maîtrise de la tuberculose menées par les Centres de lutte antituberculeuse. Bilan en 2016 et perspectives. *Bull Epidemiol Hebd (Paris)*. 2018; (6-7):121-4. Available from: http://invs.santepubliquefrance.fr/beh/2018/6-7/2018_6-7_4.htm
9. Ministère des solidarités et santé. Instruction DGS/SP2/2020/224 du 8 décembre 2020 relative à la mise en place de la réforme des centres de lutte anti tuberculeuse (CLAT). [Instruction DGS/SP2/2020/224 of 8 December 2020 on the implementation of the reform of tuberculosis control centres (CLAT)]. Paris: Journal officiel de la République française; 2021. French. Available from: https://www.legifrance.gouv.fr/circulaire/id/45119?tab_selection=circ&searchField=ALL&query=*&page=1&init=true&dateSignature
10. Naufal F, Chaisson LH, Robsky KO, Delgado-Barroso P, Alvarez-Manzo HS, Miller CR, et al. Number needed to screen for TB in clinical, structural or occupational risk groups. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2022;26(6):500-8. <https://doi.org/10.5588/ijtld.21.0749> PMID: 35650693
11. Guthmann JP, Laporal S, Lévy-Bruhl D. La tuberculose maladie en France en 2018. Faible incidence nationale, forte incidence dans certains territoires et groupes de population. *Bull Epidemiol Hebd (Paris)*. 2020; (10-11):196-203. Available from: http://beh.santepubliquefrance.fr/beh/2020/10-11/2020_10-11_1.html
12. Institut national de la statistique et des études économiques (INSEE). Étrangers par nationalité détaillée. Recensement de la population 2019. [Foreigners and immigrants in 2019. Detailed nationalities and countries of birth - Census of Population]. Paris: INSEE. [Accessed: 20 Mar 2023.] French. Available from: <https://www.insee.fr/fr/statistiques/6478065?sommaire=6478362>
13. United Nations Refugee Agency (UNHCR). Operational data portal. Ukraine refugee situation. Geneva: UNHCR. [Accessed: 14 Feb 2023]. Available from: https://data.unhcr.org/en/situations/ukraine#_ga=2.14069111.1340351102.1675866931-785840434.1675866931
14. Fiebig L, Hauer B, Andrés M, Haas W. Tuberculosis screening in asylum seekers in Germany, 2015: characteristics of cases and yield. *Eur Respir J*. 2017;50(4):1602550. <https://doi.org/10.1183/13993003.02550-2016> PMID: 29074541
15. Spruijt I, Haile DT, Erkens C, van den Hof S, Goosen S, Ten Kate A, et al. Strategies to reach and motivate migrant communities at high risk for TB to participate in a latent tuberculosis infection screening program: a community-engaged, mixed methods study among Eritreans. *BMC Public Health*. 2020;20(1):315. <https://doi.org/10.1186/s12889-020-8390-9> PMID: 32164637
16. Solomos Z, Botsi C, Georgakopoulou T, Lytras T, Tsiodras S, Puchner KP. Active case finding of pulmonary TB in a European refugee camp: lessons learnt from Oinofyta hosting site in Greece. *Trop Med Int Health*. 2021;26(9):1068-74. <https://doi.org/10.1111/tmi.13626> PMID: 33991376
17. Pampaloni A, Locatelli ME, Venanzi Rullo E, Alaimo S, Cosentino F, Marino A, et al. "Diagnosis on the Dock" project: A proactive screening program for diagnosing pulmonary tuberculosis in disembarking refugees and new SEI model. *Int J Infect Dis*. 2021;106:98-104. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2021.03.032> PMID: 33737130
18. Wahedi K, Biddle L, Bozorgmehr K. Cost-effectiveness of targeted screening for active pulmonary tuberculosis among asylum-seekers: A modelling study with screening data from a German federal state (2002-2015). *PLoS One*. 2020;15(11):e0241852. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0241852> PMID: 33151980
19. Collin SM, Wurie F, Muzyamba MC, de Vries G, Lönnroth K, Migliori GB, et al. Effectiveness of interventions for reducing TB incidence in countries with low TB incidence: a systematic review of reviews. *Eur Respir Rev*. 2019;28(152):180107. <https://doi.org/10.1183/16000617.0107-2018> PMID: 31142548
20. Heuvelings CC, de Vries SG, Greve PF, Visser BJ, Bèlard S, Janssen S, et al. Effectiveness of interventions for diagnosis and treatment of tuberculosis in hard-to-reach populations in countries of low and medium tuberculosis incidence: a systematic review. *Lancet Infect Dis*. 2017;17(5):e144-58. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)30532-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(16)30532-1) PMID: 28291722
21. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). Testing for tuberculosis infection and screening for tuberculosis disease among refugees arriving in European countries from Ukraine. Stockholm: ECDC; 2022. Available from: <https://www.ecdc.europa.eu/en/news-events/testing-tuberculosis-infection-and-screening-tuberculosis-disease-among-incoming>

License, supplementary material and copyright

This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution (CC BY 4.0) Licence. You may share and adapt the material, but must give appropriate credit to the source, provide a link to the licence and indicate if changes were made.

Any supplementary material referenced in the article can be found in the online version.

This article is copyright of the authors or their affiliated institutions, 2023.



Article

Clinical Features and Outcome of Multidrug-Resistant Osteoarticular Tuberculosis: A 12-Year Case Series from France

Isabelle Bonnet ^{1,2,3,†}, Elie Haddad ^{4,†} , Lorenzo Guglielmetti ^{1,2,3}, Pascale Bémer ⁵ , Louis Bernard ⁶, Anne Bourgoïn ⁷, Rachel Brault ⁸, Gaud Catho ⁹, Eric Caumes ⁴, Lélia Escaut ¹⁰, Eric Fourniols ¹¹, Mathilde Fréchet-Jachym ¹², Alice Gaudart ¹³, Hélène Guillot ¹⁴, Barthélémy Lafon-Desmurs ¹⁵, Jean-Philippe Lanoix ¹⁶, Philippe Lanotte ¹⁷, Adrien Lemaïgnen ⁶ , Bénédicte Lemaire ¹², Nadine Lemaitre ¹⁸, Christophe Michau ¹⁹, Philippe Morand ²⁰, Faiza Mougari ²¹, Dhiba Marigot-Outtandy ¹², Solène Patrat-Delon ²², Thomas Perpoint ⁹, Caroline Piau ²³, Valérie Pourcher ⁴, Virginie Zarrouk ²⁴, Valérie Zeller ²⁵, Nicolas Veziris ^{1,2,3,26}, Stéphane Jauréguiberry ^{4,10,27,†} and Alexandra Aubry ^{1,2,3,27,*} on behalf of the CRIOAC Pitié-Salpêtrière and the TB Consilium of the National Reference Center for Mycobacteria



Citation: Bonnet, I.; Haddad, E.; Guglielmetti, L.; Bémer, P.; Bernard, L.; Bourgoïn, A.; Brault, R.; Catho, G.; Caumes, E.; Escaut, L.; et al. Clinical Features and Outcome of Multidrug-Resistant Osteoarticular Tuberculosis: A 12-Year Case Series from France. *Microorganisms* **2022**, *10*, 1215. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10061215>

Academic Editor: Véronique Fontaine

Received: 26 May 2022

Accepted: 9 June 2022

Published: 14 June 2022

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



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

- ¹ Cimi-Paris, INSERM, U1135, Centre d'Immunologie et des Maladies Infectieuses, Sorbonne Université, 75013 Paris, France; isabelle.bonnet2@aphp.fr (I.B.); lorenzo.guglielmetti@aphp.fr (L.G.); nicolas.veziris@sorbonne-universite.fr (N.V.)
- ² Centre National de Référence des Mycobactéries et de la Résistance des Mycobactéries aux Antituberculeux, Hôpital Pitié-Salpêtrière, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP), Sorbonne-Université, 75013 Paris, France
- ³ TB Consilium of the National Reference Center for Mycobacteria, 75013 Paris, France
- ⁴ Service de Maladies Infectieuses et Tropicales, Hôpital Pitié-Salpêtrière, AP-HP, INSERM 1136, Sorbonne-Université, 75013 Paris, France; ehaddad@live.com (E.H.); eric.caumes@aphp.fr (E.C.); valerie.martinez@aphp.fr (V.P.); stephane.jaureguiberry@aphp.fr (S.J.)
- ⁵ Department of Bacteriology, University Hospital, CHU Nantes, 44000 Nantes, France; pascale.bemer@chu-nantes.fr
- ⁶ Service de Médecine Interne et Maladies Infectieuses, Centre Hospitalier Régional Universitaire de Tours, 37000 Tours, France; prlbernard@orange.fr (L.B.); adrien.lemaïgnen@chu-tours.fr (A.L.)
- ⁷ Service de Virologie et Mycobactériologie, Centre Hospitalier Universitaire de Poitiers, 86000 Poitiers, France; anne.bourgoïn@chu-poitiers.fr
- ⁸ Service de Rhumatologie, Centre Hospitalier Universitaire de Poitiers, 86000 Poitiers, France; rachel.brault@chu-poitiers.fr
- ⁹ Service de Maladies Infectieuses et Tropicales, Hospices Civils de Lyon, 69002 Lyon, France; gaud.catho@hcuge.ch (G.C.); thomas.perpoint@chu-lyon.fr (T.P.)
- ¹⁰ Service de Maladies Infectieuses et Tropicales, Hôpital Bicêtre, AP-HP, Université Paris Saclay, 94270 Le Kremlin-Bicêtre, France; lelia.escaut@aphp.fr
- ¹¹ Service de Chirurgie Orthopédique, Hôpital Pitié-Salpêtrière, AP-HP, Sorbonne-Université, 75013 Paris, France; eric.fourniols@aphp.fr
- ¹² Sanatorium, Centre Hospitalier de Bligny, 91640 Briis-sous-Forges, France; m.jachym@chbligny.fr (M.F.-J.); b.lemaire@chbligny.fr (B.L.); d.marigotouttandy@chbligny.fr (D.M.-O.)
- ¹³ Service de Bactériologie, Centre Hospitalier Universitaire de Nice, 06000 Nice, France; gaudart.a@chu-nice.fr
- ¹⁴ Service de Médecine Interne, Hôpital Robert Ballanger, 93600 Aulnay-sous-Bois, France; heleneguillot@hotmail.com
- ¹⁵ Service de Maladies Infectieuses et Tropicales, Centre Hospitalier de Tourcoing, 59200 Tourcoing, France; blafondesmurs@ch-tourcoing.fr
- ¹⁶ Service de Maladies Infectieuses et Tropicales, Centre Hospitalier Universitaire d'Amiens-Picardie, 80054 Amiens, France; lanoix.jean-philippe@chu-amiens.fr
- ¹⁷ Service de Bactériologie, Centre Hospitalier Universitaire de Tours, 37000 Tours, France; philippe.lanotte@univ-tours.fr
- ¹⁸ Service de Bactériologie, Centre Hospitalier Universitaire d'Amiens-Picardie, 59200 Tourcoing, France; lemaitre.nadine@chu-amiens.fr
- ¹⁹ Service de Maladies Infectieuses et Tropicales, Centre Hospitalier de Saint-Nazaire, 44606 Saint-Nazaire, France; c.michau@ch-saintnazaire.fr
- ²⁰ Service de Bactériologie, Hôpital Cochin, AP-HP, Centre-Université de Paris, 75014 Paris, France; philippe.morand@aphp.fr
- ²¹ Service de Bactériologie, Hôpital Lariboisière, AP-HP, Nord-Université de Paris, 75018 Paris, France; faiza.mougari@aphp.fr
- ²² Service de Maladies Infectieuses et Tropicales, Centre Hospitalier Universitaire de Rennes, 35033 Rennes, France; solene.patrat-delon@chu-rennes.fr

- ²³ Service de Bactériologie, Centre Hospitalier Universitaire de Rennes, 35033 Rennes, France; caroline.piau@chu-rennes.fr
- ²⁴ Service de Médecine Interne, Hôpital Beaujon, AP-HP, Nord-Université de Paris, 92110 Clichy, France; virginie.zarrouk@aphp.fr
- ²⁵ Centre de Référence des Infections Ostéo-Articulaires Complexes, Groupe Hospitalier Diaconesses Croix Saint-Simon, 75020 Paris, France; vzeller@hopital-dcss.org
- ²⁶ Service de Bactériologie, Hôpitaux Saint-Antoine, Tenon, Trousseau, Rothschild, AP-HP, 75012 Paris, France
- ²⁷ Centre de Référence des Infections Ostéo-Articulaires Complexes, Hôpital Pitié-Salpêtrière, AP-HP, 75013 Paris, France
- * Correspondence: alexandra.aubry@sorbonne-universite.fr
- † These authors contributed equally to this work.
- ‡ Collaborators/Membership of the Group/Team Name is provided in the Acknowledgments.

Abstract: The optimal treatment for osteoarticular infection due to multidrug-resistant tuberculosis strains (MDR-OATB) remains unclear. This study aims to evaluate the diagnosis, management and outcome of MDR-OATB in France. We present a case series of MDR-OATB patients reviewed at the French National Reference Center for Mycobacteria between 2007 and 2018. Medical history and clinical, microbiological, treatment and outcome data were collected. Twenty-three MDR-OATB cases were reported, representing 3% of all concurrent MDR-TB cases in France. Overall, 17 were male, and the median age was 32 years. Six patients were previously treated for TB, including four with first-line drugs. The most frequently affected site was the spine ($n = 16$). Bone and joint surgery were required in 12 patients. Twenty-one patients (91%) successfully completed the treatment with a regimen containing a mean of four drugs (range, 2–6) for a mean duration of 20 months (range, 13–27). Overall, high rates of treatment success were achieved following WHO MDR-TB treatment guidelines and individualized patient management recommendations by the French National TB Consilium. However, the optimal combination of drugs, duration of treatment and role of surgery in the management of MDR-OATB remains to be determined.

Keywords: MDR-TB; XDR-TB; bone; spinal

1. Introduction

Tuberculosis (TB) remains a major public health concern worldwide [1]. Extrapulmonary TB accounts for about one quarter of the TB cases, whereas osteoarticular TB (OATB) represents 10 to 15% of all extrapulmonary TB cases in Europe and the USA [2]. Sadly, there are no specific data for France. OATB onset is usually insidious and a long delay in diagnosis is common [2]. Spinal TB, which accounts for about 50% of OATB patients in most series, may lead to neurologic deficits and spinal deformity in up to 50% of cases [2,3]. In spinal TB, the thoracic and lumbar vertebrae are mostly involved, and multifocal non-contiguous bone destruction with relative disc preservation and paravertebral abscesses are common [3]. Extraspinal TB localizations are diverse, and prosthetic joint infections can also occur [4]. Overall, microbiologic confirmation of the diagnosis is rare, as samples are difficult to obtain [2].

According to the World Health Organization (WHO), in 2020, 150,000 people developed rifampin-resistant TB or multidrug-resistant TB (MDR-TB), defined as resistant to rifampin and isoniazid [1]. Due to disruptions in TB diagnosis and treatment during the COVID-19 outbreak, TB and MDR-TB cases are expected to increase globally [1]. Overall, MDR-TB-causing strains are estimated to be implicated in approximately 2% of all OATB cases [1,5].

Guidelines for the treatment of MDR-TB are based on those for pulmonary TB, as no specific recommendations for osteoarticular forms are available [6,7]. In this study, we present a 12-year national case series of MDR-OATB with the aim of describing the diagnosis, treatment, and outcome of these rare forms.

2. Materials and Methods

2.1. Study Population

We retrospectively included all consecutive bacteriologically-confirmed MDR-OATB cases reported to the French National Reference Center for Mycobacteria (NRC) from 1 January 2007 to 31 December 2018. The following data were retrieved from medical files, anonymized and collated in a database at the NRC: demographics, history of previous TB treatment, comorbidities, clinical presentation, TB localization, drug susceptibility testing results, treatment, adverse events, surgery and treatment outcome.

2.2. Definitions

Standard definitions of MDR- and XDR-TB were used (MDR-TB is a TB resistant to rifampin and isoniazid; XDR-TB is a MDR-TB also resistant to any fluoroquinolone and to at least one of three second-line injectable drugs (capreomycin, kanamycin and amikacin) [8]. The revised definition of XDR-TB released in 2021 was not used since the study includes cases of TB occurring before 2021 [9]. MDR-OATB cases refers to bacteriologically-confirmed cases of MDR-TB involving joints, bones or soft tissue adjacent to the affected bone or joint [8]. A bacteriologically-confirmed TB case is one from whom a biological specimen is positive by smear microscopy, culture or WHO-approved rapid diagnostics, i.e., genotypic methods.

Treatment outcome was assigned according to WHO definitions [8] and the proposal of Schwoebel et al. [10] in cases of treatment failure (Supplementary Table S1).

2.3. Drug Susceptibility Testing

Phenotypic drug susceptibility testing was performed using the proportion method [11]. Mutations involved in resistance to anti-TB drugs were identified by line probe assays (Genotype MTBDRplus and MTBDRsl, Hain Lifescience, Nehren, Germany) or in-house PCR combined with Sanger sequencing [12].

2.4. Statistical Analysis

Continuous variables are presented as mean (range) or median (interquartile range, IQR), and categorical variables as proportion. The rate of drug resistance was compared between MDR-OATB and overall MDR-TB strains using Fisher's exact test. Statistical analysis was performed with Stata version 11.0 (StataCorp, College Station, TX, USA). Significance was determined as $p < 0.05$.

2.5. Ethical Considerations

The study protocol was approved by the Comité d'Ethique de la Recherche de Sorbonne Université (Approval Number: CER-2021-005) and registered on [ClinicalTrials.gov](https://clinicaltrials.gov) (ID: APHP210051).

3. Results

3.1. Patient Characteristics

Overall, 863 MDR-TB cases were reported to the NRC between 2007 and 2018; among these, 329 were extrapulmonary (alone or associated with pulmonary TB) and 23 were MDR-OATB cases (2.7% and 7.0% of all MDR-TB and of extrapulmonary MDR-TB cases, respectively) (Figure 1).

Among the 23 patients, the male/female sex ratio was 2.8/1 and the median age was 32 years (IQR, 25–40) (Tables 1 and 2). Overall, six patients were previously treated for TB: four with first-line drugs, one with second-line drugs and one with an unknown treatment regimen. For the 23 patients, the median time from symptom onset to diagnosis was 3.5 months (IQR, 2–6). The most common clinical presentation was local pain (78.3%) and weight loss (52.2%). In most cases ($n = 16$), OATB affected the spine. In 14 patients, evidence of active TB was also found elsewhere, predominantly in the lung and lymph nodes (Tables 1 and 2).

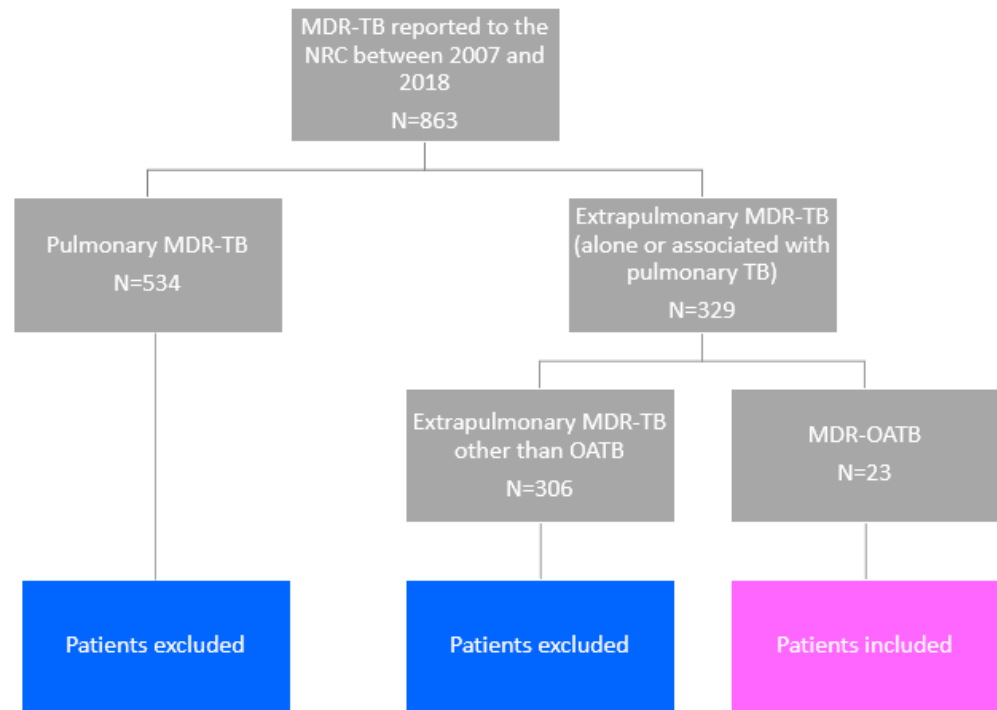


Figure 1. Flowchart for the study.

Table 1. Characteristics of 23 patients with multidrug-resistant osteoarticular TB in France from 2007 to 2018.

	<i>n</i>	%
Sex		
Female	6	26.1
Male	17	73.9
Age (years)		
0–14	1	4.3
15–24	4	17.4
25–44	16	69.7
45–64	1	4.3
≥65	1	4.3
Country of birth		
Western Europe	3	13.1
Africa	11	47.8
Eastern Europe	4	17.4
Asia	5	21.7
Duration of stay in France for foreign-born patients (years)		
<5	16	
5–10	4	
>10	1	
Previous TB treatment [8]		
New patients	17	73.9
Previously treated patients	6	26.1
Relapse	4	
Treatment after failure	1	
Other previously treated patients	1	

Table 1. Cont.

	<i>n</i>	%
Comorbidities ¹		
HIV infection	4	17.4
Hepatitis B infection	1	4.3
Hepatitis C infection	1	4.3
Chronic renal failure	1	4.3
Immunosuppressive therapy	1	4.3
Body mass index < 18.5	7	30.4
Clinical signs/symptoms		
Pain	18	78.3
Weight loss	12	52.2
Cough	6	26.1
Neurological deficit	5	21.7
Fever	5	21.7
Median (IQR) C-reactive protein at diagnosis (mg/L)	66 (21.4–114.3)	
Median (IQR) serum vitamin D at diagnosis (ng/L)	6 (5–14.5)	
Delay between first symptoms and TB diagnosis (months)		
<6	15	65.2
6–12	5	21.7
≥12	2	8.8
Unknown	1	4.3
Tuberculin skin test		
Positive (>10 mm)	7	30.4
Not done	16	69.6
Interferon-gamma release assay		
Positive	2	8.8
Undetermined	1	4.3
Not done	20	86.9
Osteoarticular localization ²		
Spine	16	69.6
Hip joint	4	17.4
Knee joint	2	8.8
Ribs	2	8.8
Sacro-iliac joint	3	13.1
Calcaneum	1	4.3
Pulmonary TB associated	9	39.1

¹ Diabetes mellitus was not added to the table since no patient had diabetes. ² Six patients had TB with multiple localizations.

3.2. Methods Used for the Diagnosis of OATB

All TB cases were bacteriologically-confirmed. OATB diagnosis was proven microbiologically for 19 patients and based on radiologic findings in four patients (Table 2). Positive cultures were obtained from bone or joint samples in 19 cases, and from other samples in four cases (Table 2). Histology was performed in less than half of the cases, even in cases of spinal TB, and was suggestive of TB (giant cell epithelioid granuloma with caseous necrosis) in eight out of nine patients (Table 2).

3.3. Drug Susceptibility Testing

Overall, resistance to antibiotics was significantly lower ($p < 0.05$) among MDR-OATB patients than among all MDR-TB patients diagnosed in France during the same period for streptomycin, ethambutol, pyrazinamide, kanamycin, cycloserine, fluoroquinolones, capreomycin and PAS (Table 3).

Table 2. Clinical features of multidrug-resistant osteoarticular tuberculosis in France from 2007 to 2018.

Patient	Sex, Age (Years)	Comorbidities	Previous TB Treatment	Year of TB Diagnosis	Bone/Joint Localization	Other TB Localizations	Sample Used for Diagnosis	Histology of the Sample Used for Diagnosis	Treatment *	Surgical Treatment	Outcome (Post-Treatment Follow-Up) [8] §
1	M, 42	None	None	2009	Left hip joint	-	Joint aspirate	ND	¹⁻² [Am-Emb [†] -Lzd [†] -Mfx-PAS [†]]/ ³ [Am-Mfx-PAS [†]]/ ⁴⁻⁶ [Am [†] -Cs-Mfx-PAS [†]]/ ⁷⁻²⁷ [Cs-Mfx-PAS [†]]	Debridement	Success § (5 years)
2	F, 65	HIV and chronic renal failure	Isoniazid-mono-resistant TB 4 years previously	2009	Right knee joint	-	Joint aspirate	Inflammatory joint fluid	¹⁻¹⁶ [Emb-Mfx-Pza]	No surgery	Success (no post-treatment follow-up)
3	M, 41	None	None	2010	C5–C6, prevertebral abscess	Lymph nodes, liver, spleen, lung	Prevertebral abscess	ND	¹⁻² [Am-Emb-Eto-Lzd-Mfx-Pza]/ ³ [Am-Emb-Lzd-Mfx-Pza]/ ⁴⁻⁵ [Emb-Lzd [†] -Mfx-Pza]/ ⁶⁻²⁰ [Emb-Mfx-Pza]	Anterior vertebrectomy	Success (no post-treatment follow-up)
4	M, 48	None	None	2011	T2 until the conus of spinal cord, left iliac bone	Kidneys, meningitis, lung	Urine	ND	¹⁻³ [Am-Emb-Lzd [†] -Mfx-Pza]/ ⁴⁻⁶ [Am-Emb-Mfx-PAS [†] -Pza]/ ⁷⁻¹⁹ [Emb-Cs-Mfx-Pza]	No surgery	Success § (no post-treatment follow-up)
5	F, 21	None	None	2012	T3–T5	Lymph nodes	Lymph node	Epithelioid granuloma with caseous necrosis	¹ [Am-Lzd [†] -Mfx]/ ²⁻⁴ [Am-Bdq-Mfx [†] -PAS]/ ⁵ [Am-Lfx-PAS]/ ⁶⁻⁸ [Am-Lfx-PAS [†]]/ ⁹⁻¹¹ [Am-Lfx]/ ¹²⁻¹⁹ [Cfx-Lfx]	No surgery	Success § (no post-treatment follow-up)
6	F, 40	Hepatitis C infection	Several episodes of TB the last 20 years	2013	Ribs at T5–T6 level	Lymph nodes, lung	Pulmonary sample	ND	¹ [Bdq-Cs-Emb-Lzd-Mpm/Clv-PAS]/ ²⁻⁷ [Bdq [†] -Cs-Emb-Lzd-Mpm/Clv]/ ⁸⁻¹⁰ [Cs-Emb-Lzd-Mpm/Clv-Pza]/ ¹¹⁻²⁵ [Cs-Emb-Lzd-Pza]	Lobectomy	Success (3 months)
7	M, 27	None	None	2013	C6, T8, L3, S1	Lung	Bone tissue	ND	¹ [Am-Cs-Lzd-Mpm/Clv-Mfx-PAS]/ ²⁻⁶ [Am-Cs-Lzd-Mfx-PAS [†]]/ ⁷⁻²⁵ [Cs-Lzd-Mfx-Pza]	Laminectomy	Success (2 years)
8	M, 30	None	Isoniazid-mono-resistant TB 2 years previously	2013	T9–T12, prevertebral abscesses	-	Prevertebral abscess	ND	¹⁻⁴ [Am-Cs-Emb-Lzd-Mfx-Pza]/ ⁵⁻¹⁰ [Cs-Emb-Lzd-Mfx-Pza [†]]/ ¹¹⁻²⁰ [Cs-Emb-Lzd-Mfx]	No surgery	Success (no post-treatment follow-up)
9	M, 29	None	None	2014	T12–L4, paravertebral abscess	-	Bone tissue	ND	¹⁻³ [Am-Lzd-Mfx-PAS]/ ⁴⁻⁷ [Lzd-Mfx-PAS] (duration not known due to loss of follow-up)	Abscess drainage, stabilization	Not evaluated (loss of follow-up after 9 months of treatment)
10	F, 39	None	None	2014	Left hip prosthetic joint, psoas abscess	-	Synovial tissue	Epithelioid granuloma with giant cells and necrosis	¹⁻² [Am-Cs-Lzd-Mfx-PAS]/ ³⁻⁷ [Am-Lzd [†] -Mfx-Pza-Rif]/ ⁸⁻²⁴ [Lzd [†] -Mfx-Pza-Rif]	Revision arthroplasty (two-stage exchange)	Success (2 years)

Table 2. Cont.

Patient	Sex, Age (Years)	Comorbidities	Previous TB Treatment	Year of TB Diagnosis	Bone/Joint Localization	Other TB Localizations	Sample Used for Diagnosis	Histology of the Sample Used for Diagnosis	Treatment *	Surgical Treatment	Outcome (Post-Treatment Follow-Up) [8] §
11	M, 32	None	None	2014	L4–L5, L5–S1, right sacro-iliac joint	Lymph nodes, lung	Bone tissue	Granuloma and necrosis	¹⁻² [Am-Lfx-Lzd-Pza]/ ³⁻⁶ [Am-Lzd-Mfx-Pza-Rif]/ ⁷⁻¹⁸ [Lzd-Mfx-Pza-Rif]	Vertebral cementoplasty	Success (6 years)
12	F, 39	None	Isoniazid-mono-resistant TB 2 years before	2014	Right calcaneum	-	Bone tissue	ND	¹ [Am-Emb-Lzd-Mfx-Pza]/ ² [Am-Emb-Lzd-Mfx-Pza-Rif [†]]/ ³⁻⁶ [Am-Emb-Lzd-Mfx-Pza]/ ⁷⁻¹² [Emb [†] Lzd [†] -Mfx-Pza]/ ¹³⁻¹⁹ [Cs-Mfx-PAS-Pza]	Resection then bone graft (after 1 year of antibiotic therapy)	Success § (3 years)
13	M, 15	None	None	2014	T10–L1, pre- and paravertebral abscesses	-	Paravertebral abscess	ND	¹⁻⁵ [Am-Bdq-Cs-Lfx-Lzd-Pza]/ ⁶⁻⁷ [Bdq-Cs-Lfx-Lzd-Pza]/ ⁸⁻⁹ [Cs-Lfx-Lzd-Pza]/ ¹⁰⁻²⁰ [Cs-Lfx-Lzd-Pza-Rif]/ ²¹⁻²⁴ [Lfx-Lzd-Pza]	No surgery	Success (no post-treatment follow-up)
14	M, 27	None	None	2015	T5, dorsal abscess	Lung	Paravertebral abscess	ND	¹⁻¹² [Emb [†] -Mfx-Pza-Rif]/ ¹³⁻¹⁵ [Mfx-Pza-Rif]	No surgery	Success despite diffuse arthralgia (2 years)
15	M, 20	Rheumatoid arthritis (corticosteroids and methotrexate)	None	2015	L3–L4, paravertebral abscess	Lymph nodes	Bone tissue	Epithelioid granuloma with giant cells and necrosis	¹⁻⁶ [Am-Cs-Lzd-Mfx-PAS-Pza [†]]/ ⁷ [Am-Cs-Lzd-Mfx-PAS]/ ⁸⁻¹⁹ [Cs-Lzd-Mfx-PAS]	No surgery	Success despite back pain (2 months)
16	F, 39	HIV	Drug-susceptible TB 3 years previously	2015	T11–T12, paravertebral abscess, left knee joint	-	Bone tissue	ND	¹⁻⁷ [Am-Emb-Lzd-Mfx-Pza]/ ⁸⁻²⁶ [Emb-Lzd-Mfx-Pza]	Resection arthroplasty	Success despite knee pain (3 years)
17	M, 31	None	None	2017	C6–C7, paravertebral abscess	Spleen	Bone tissue	Epithelioid granuloma with giant cells and caseous necrosis	¹⁻⁴ [Am-Cfx-Emb-Lzd-Mfx-Pza]/ ⁵⁻¹⁹ [Cfx-Emb-Lzd-Mfx-Pza]	No surgery	Success despite left sciatica S1, cervical paresthesia (1 year)
18	M, 40	None	None	2018	C5, T10, T11, L1–L4, S1, pre- and paravertebral abscesses	Lung, lymph nodes, pleura, liver, spleen, small intestine	Bone tissue	Granuloma	¹ [Am-Emb-Eto-Lzd-Mfx-Pza]/ ²⁻³ [Am [†] -Bdq-Cfz-Lzd-Mfx-Pza]/ ⁴⁻¹⁹ [Bdq-Cfz-Lzd-Mfx-Pza]	Corpectomy and anterior cervical arthrodesis	Success (6 months)
19	M, 25	None	None	2018	T4, T5, L1, L4, paravertebral and psoas abscesses	Lung, pleura	Bone tissue	Epithelioid granuloma with giant cells without necrosis	¹⁻² [Am-Bdq-Cfz-Cs-Lzd-Mfx]/ ³ [Bdq-Cfz-Cs-Lzd-Mfx]/ ⁴⁻⁶ [Bdq-Cfz-Dlm-Lzd-Mfx]/ ⁷⁻¹³ [Bdq-Cfz-Dlm-Mfx]	No surgery	Success (3 months)
20	M, 16	Hepatitis B infection	None	2018	L3, S3, right hip joint	Lymph nodes, pleura, liver, peritoneum	Joint aspirate	Epithelioid granuloma with giant cells without necrosis	¹⁻² [Am-Eto-Lzd-Mfx-Pza]/ ³ [Am-Emb-Eto-Lzd-Mfx-Pza]/ ⁴⁻⁵ [Am [†] -Bdq-Emb-Eto [†] -Lzd-Mfx-Pza]/ ⁶⁻²³ [Bdq-Cfx-Emb [†] -Lzd-Mfx-Pza]	Joint washing	Success § (1 year)

Table 2. Cont.

Patient	Sex, Age (Years)	Comorbidities	Previous TB Treatment	Year of TB Diagnosis	Bone/Joint Localization	Other TB Localizations	Sample Used for Diagnosis	Histology of the Sample Used for Diagnosis	Treatment *	Surgical Treatment	Outcome (Post-Treatment Follow-Up) [8] §
21	M, 35	HIV	Ongoing pulmonary MDRTB treatment for two years	2018	L2-S1, psoas abscess	-	Psoas abscess	ND	¹⁻⁵ [Bdq-Cfz-Lzd-PAS]/ ⁶⁻⁷ [Bdq-Cfz-Dlm-Lzd-Mpm/Clv]/ ⁸⁻¹⁴ [Bdq-Cfz-Cm-Dlm-Lzd-Mpm/Clv] ^{15-?} [Bdq-Cm-Dlm-Lzd]-(duration not known due to loss of follow-up)	Laminectomy	Not evaluated (loss of follow-up after 15 months of treatment)
22	M, 8	None	None	2018	Right hip joint, gluteus abscess	Lymph nodes	Peri-joint abscess	ND	¹⁻¹⁸ [Cs-Dlm-Eto-Lfx-Lzd]	Peri-joint and gluteus abscess drainage	Success (no post-treatment follow-up)
23	M, 39	HIV	None	2018	Left seventh rib, both iliac bones	Lung, lymph nodes, pleura, liver, spleen	Pulmonary sample	ND	¹ [Am-Emb-Lzd-Mfx-Pza]/ ²⁻³ [Am-Dlm-Emb-Lzd [†] -Mfx-Pza]/ ⁴⁻¹⁹ [Dlm-Mfx-Pza]	No surgery	Success (6 months)

F, female; M, male; TB, TB; Am, amikacin; Bdq, bedaquiline; Cfz, clofazimine; Cm, capreomycin; Cs, cycloserine; Dlm, delamanid; Emb, ethambutol; Eto, ethionamide; Inh, isoniazid; Km, kanamycin; Lfx, levofloxacin; Lzd, linezolid; Mpm/Clv, meropenem/clavulanate; Mfx, moxifloxacin; Ofx, ofloxacin; PAS, para-aminosalicylic acid; Pto, protionamide; Rif, rifampin; Pza, pyrazinamide. * Treatments are shown as number of months followed by drugs administered in each phase. Different phases are divided by "/". † Discontinued due to toxicity. Myelosuppression led to the withdrawal of linezolid ($n = 2$) and PAS ($n = 1$). Peripheral neuropathy was observed with linezolid in 2 cases. Gastro-intestinal symptoms were encountered with PAS ($n = 2$), ethionamide ($n = 1$) and pyrazinamide ($n = 1$). Ethambutol was withdrawn after retrobulbar optic neuritis in 2 cases, and both ethambutol and linezolid were withdrawn for the same reason in 2 cases. Two cases of renal insufficiency and one of ototoxicity occurred with amikacin. Bedaquiline was discontinued because of QT prolongation ($n = 1$). Hepatic disorders occurred with pyrazinamide, rifampin and moxifloxacin ($n = 1$ in each case). ‡ Toxicity without discontinuation. § Patients who would have been classified as treatment failure if we had applied the fourth criterion (discontinuation of ≥ 2 drugs) during the consolidation phase (Table S1).

Table 3. Resistance to anti-TB drugs (%) among strains isolated from patients with multidrug-resistant osteoarticular TB in France ($n = 23$) and among all strains isolated from MDR-TB patients ($n = 863$), from 2007 to 2018.

Drug	MDR-OATB ¹ <i>n</i> (%)	MDR-TB <i>n</i> (%)	<i>p</i> -Value
Rifampin	18 (78) high level/5 (22) low level ²	837 (97) high level/26 (3) low level	<0.01
Protionamide	15 (65)	673 (78)	0.06
Streptomycin	15 (65)	811 (94)	<0.01
Ethambutol	12 (52)	681 (79)	<0.01
Pyrazinamide	6 (26)	379 (44)	0.01
Kanamycin	3 (13)	267 (31)	<0.01
Cycloserine	2 (9)	215 (25)	<0.01
Amikacin	2 (9)	121 (14)	0.38
Ofloxacin	2 (9)	259 (30)	<0.01
Moxifloxacin	2 (9)	259 (30)	<0.01
Bedaquiline ³	1 (4)	34 (4)	1
Capreomycin	1 (4)	138 (16)	<0.01
PAS	1 (4)	155 (18)	<0.01
Linezolid	0 (0)	0 (0)	1

¹ Two strains were XDR according to the definition before 2021 [8]. ² Mutations in *rpoB* were: L452P, D435Y, L430P, H445L and M433I [13]. ³ Bedaquiline DST was not implemented before 2014, therefore the available DST results did not include all the MDR-RT strains isolated during the study period.

3.4. Medical and Surgical Treatment

Seventeen patients were presented in the frame of the French TB Consilium [14]; the initial treatment regimen was based on genotypic resistance results, and then adapted according to phenotypic drug susceptibility testing results. For the last six patients, treatment was initiated in their setting and also based on genotypic and phenotypic resistance results. Patients received an average of four drugs in the intensive (range, 3–6) and the continuation phase of treatment (range, 2–5). All except two patients received two of the three drugs belonging to group A (fluoroquinolones ($n = 21$), linezolid ($n = 21$) and bedaquiline ($n = 7$)). Twenty-one patients completed the treatment with a mean duration of 20 months (range, 13–27 months), whereas two patients were not evaluated as they were lost to follow-up after 9 and 15 months of treatment, respectively. In 22 cases, a drug was withdrawn because of toxicity (Table 2).

Bone and joint surgery were performed for six patients with spinal TB and for six patients with other osteoarticular localizations. Surgical procedures were performed at the time of MDR-OATB diagnosis, except for the bone graft, the vertebral cementoplasty and one laminectomy that were performed 6 months after the initiation of treatment.

3.5. Patient Follow-Up and Treatment Outcome

Overall, 21 out of 23 (91%) patients achieved treatment success. As previously proposed [10], we did not take into account the WHO criterion concerning discontinuation of ≥ 2 drugs in the case of adverse events. Interestingly, the five patients in whose case ≥ 2 drugs were discontinued because of adverse events achieved treatment success (Table S1). Post-treatment follow-up was available for 14 patients, none of whom experienced failure or relapse. Sequelae, namely arthralgia, pain, sciatica and paresthesia, were reported in four patients during post-treatment follow-up. Fifteen patients performed imaging at the end of treatment: in 12 cases, persisting osteoarticular abnormalities were observed (Table 2).

4. Discussion

In our study, we report high rates of treatment success in MDR-OATB cases treated with individualized regimens in France. To date, our knowledge about the epidemiology and treatment outcome of MDR-OATB is limited, and mostly based on case reports and small retrospective series lacking comprehensive data on drug regimen and treatment outcome [15–17]. Moreover, WHO guidelines for the treatment of MDR-TB do not distinguish among different localizations of TB [6,7].

In our study, we have shown that MDR-OATB is rare among all MDR-TB cases (2.7%) and that overall high treatment success rates can be achieved by using individualized treatment following international recommendations and with the support of the French national TB Consilium [6,7,14]. Between 2007 and 2018, 2.7% and 7.0% of the MDR-TB patients diagnosed in France had an OATB among all MDR-TB cases and among the extrapulmonary cases, respectively. These proportions are similar to those previously reported [2,5]. Among our patients, the spine was affected in about 70% of all cases, while, at the time of MDR-OATB diagnosis, 61% of patients had active TB in at least one other localization, predominantly the lungs and lymph nodes. Similar findings have been reported in the literature [2,3,18].

Diagnosing OATB is challenging for several reasons: (i) the detection relies on specific tests, (ii) it is clinically indistinguishable from other chronic infections caused by more common bacterial pathogens, and (iii) the expertise in diagnosing TB has decreased in low-burden countries [18,19]. In the present study, the median time from symptom onset to OATB diagnosis was 3.5 months, which is longer than for overall TB cases in France (2 months) [19] but similar to what was reported recently for bone and joint TB in France [18].

The diagnosis of MDR-OATB was based mainly on microbiological findings. However, imaging was shown to be indispensable to establish the diagnosis of OATB in 17% of patients, highlighting the necessity of imaging for diagnosing extrapulmonary TB (Table 2). At the end of treatment, persisting osteoarticular abnormalities are usual; therefore, systematic imaging should be avoided. Indeed, using imaging to define treatment duration could lead clinicians to unnecessarily prolonged treatment with a higher risk of toxicity [20].

In our study, the rates of drug resistance in MDR-OATB strains were much lower than those of other MDR-TB strains in France (Table 3). An explanation might be that the majority of the 30% of patients with MDR-OATB with a previous active or latent TB were treated with the standard first-line TB regimen, whereas the majority of the 40% of the MDR-TB patients with a previous active TB were treated with second-line drugs (NRC data, not presented). As previously described, in the former cases, drug susceptibility profiles could be related to acquired drug resistance when patients were treated with first- or second-line drug regimens [7,21].

A daunting question concerning all osteoarticular infections is whether surgery is required, especially in cases of prosthetic infections. Although some evidence suggests that *M. tuberculosis* can develop biofilms [22], there are studies that document favorable outcomes of OATB without prosthesis removal [23–25]. MDR-TB guidelines are only available for lung surgery [6,7]. According to ATS/CDC/IDSA guidelines, surgery may be indicated in the case of failure to respond to chemotherapy with evidence of ongoing infection, relief of cord compression in patients with persistence or recurrence of neurologic deficits, or instability of the spine [20]. Such criteria could be reasonably applied to MDR-OATB cases. In our series, bone and joint surgery was performed for six patients with spinal TB, of whom four had neurological impairment, in accordance with the above indications [20], and for six patients with another osteoarticular localization, including one with a prosthesis and one with articular damage requiring a knee joint prosthesis.

Treatment regimens used in our study followed WHO MDR-TB treatment recommendations used before 2018, namely, the use of injectables as part of longer (18–20 months) individualized regimens [6,7]. Regimen design was supported by the national TB Consilium for 74% of patients [14]. Since 2016, WHO guidelines have recommended a shorter (9–11 months) regimen for patients with MDR-TB without resistance to drugs included

in the regimen [6]; subsequently, the second-line injectable in the shorter regimen was replaced by bedaquiline, resulting in an all-oral regimen [26]. Retrospectively, five patients among our cohort would have been eligible for this shorter regimen. However, more studies are needed before applying the shorter regimen to MDR-OATB since (i) there is limited evidence on the activity of the shorter regimen in extrapulmonary TB in general, and in OATB in particular, and (ii) overall, while it is well-known that some drugs such as rifampin, fluoroquinolones and linezolid penetrate well into bone tissue [27], there is a lack of information regarding concentrations of new anti-TB drugs, such as bedaquiline.

Strong points of this study are the bacteriological confirmation of all cases and representative number of national MDR-TB patients included through the French National Reference Center [28]. This study also has some limitations. First, although one of the largest reported case series of MDR-OATB, the number of cases remains small. Second, post-treatment follow-up was not available for many patients, which makes it difficult to draw conclusions regarding patient management.

Overall, however, our study provides promising results in the treatment of MDR-OATB with longer, individualized regimens.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/microorganisms10061215/s1>, Table S1: Outcomes definitions for RR-TB/MDR-TB/XDR-TB patients treated with second-line treatment used in the study, according to the WHO guidelines.

Author Contributions: Conceptualization, A.A. and S.J.; investigation, I.B., E.H., P.B., L.B., A.B., R.B., G.C., E.C., L.E., E.F., M.F.-J., A.G., H.G., B.L.-D., J.-P.L., P.L., A.L., B.L., N.L., C.M., D.M.-O., P.M., F.M., S.P.-D., T.P., C.P., V.P., V.Z. (Virginie Zarrouk) and V.Z. (Valérie Zeller); writing—original draft preparation, I.B. and E.H.; writing—review and editing, A.A., I.B., L.G., E.H., S.J. and N.V. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by annual grants from Santé Publique France (Paris, France).

Institutional Review Board Statement: The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki, and approved by the Ethics Committee “Comité d’éthique de la Recherche de Sorbonne Université” of Sorbonne Université (CER-2021-005X approved the 14/05/2021).

Informed Consent Statement: Not applicable.

Acknowledgments: The authors thank the physicians, Marie Garnotel, Anne-Laure Herisse, Anne Joubert, Nicole Le Flour and Tamar Togonidze, and the technicians working at the National Reference Center for Mycobacteria. The authors also thank Ekkehard Collatz for English editing. Members of the CRIOAC Pitié-Salpêtrière: Alexandre Bleibtreu, Nicolas Barrut, Nicolas Bocahut, Ruxandra Calin, Frédéric Clarençon, Georges Daas, Bruno Fautrel, Anne Fustier, Frédérique Gandjbakhch, Nagisa Godefroy, Helga Junot, Frédéric Khiami, Sandra Kossi, Emilie Lafeuille, Jean-Yves Lazennec, Maxime Marchant, Cyril Meloni, Guillaume Mercy, Carole Metz, Mihaela Miu, Stéphane Mitrovic, Yann Mohsinaly, Gentiane Monsel, Quentin Monzani, Olivier Paccoud, Rachid Redjati, Vanessa Reubrecht, Jérôme Robert, Nicolas Rosine, Julie Smati, Pauline Vidal, Sylvain Viltard, Noël Zahr. Members of the TB Consilium of the National Reference Center for Mycobacteria: Claire Andrejak, Christine Bernard, Katarina Chadelat, Bertrand Dautzenberg, Najoua Helali, Benoît Henry, Jérémy Jaffré, Vincent Jarlier, Marie Jaspard, Damien Le Dù, Bénédicte Rivoire, Jérôme Robert, Guillaume Thouvenin.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funder had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

References

1. WHO. *Global TB Report 2021*; World Health Organization: Geneva, Switzerland, 2021; Available online: http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/ (accessed on 14 October 2021).
2. Pigrau-Serrallach, C.; Rodríguez-Pardo, D. Bone and joint TB. *Eur. Spine J.* **2013**, *22*, 556–566. [CrossRef]
3. Johansen, I.S.; Nielsen, S.L.; Hove, M.; Kehrer, M.; Shakar, S.; Woyen, A.V.T.; Andersen, P.H.; Bjerrum, S.; Wejse, C.; Andersen, A.B. Characteristics and Clinical Outcome of Bone and Joint TB from 1994 to 2011: A Retrospective Register-based Study in Denmark. *Clin. Infect. Dis.* **2015**, *61*, 554–562. [CrossRef]
4. Meyssonnier, V.; Zeller, V.; Malbos, S.; Heym, B.; Lhotellier, L.; Desplaces, N.; Marmor, S.; Ziza, J.-M. Prosthetic joint infections due to *Mycobacterium TB*: A retrospective study. *Jt. Bone Spine* **2019**, *86*, 239–243. [CrossRef]
5. Tuli, S.M. General principles of osteoarticular TB. *Clin. Orthop. Relat. Res.* **2002**, *398*, 11–19. [CrossRef]
6. WHO. *WHO Consolidated Guidelines on Drug-Resistant TB Treatment*; WHO: Geneva, Switzerland; Available online: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/311389> (accessed on 20 March 2019).
7. Nahid, P.; Mase, S.R.; Migliori, G.B.; Sotgiu, G.; Bothamley, G.H.; Brozek, J.L.; Cattamanchi, A.; Cegielski, J.P.; Chen, L.; Daley, C.L. Treatment of Drug-Resistant TB. An Official ATS/CDC/ERS/IDSA Clinical Practice Guideline. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2019**, *200*, e93–e142. [CrossRef]
8. WHO. *Definitions and Reporting Framework for TB*; World Health Organization: Geneva, Switzerland; Available online: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/79199> (accessed on 30 December 2020).
9. WHO. *WHO Announces Updated Definitions of Extensively Drug-Resistant Tuberculosis*; WHO: Geneva, Switzerland, 2021; Available online: www.who.int/news/item/27-01-2021-who-announces-updated-definitions-of-extensively-drug-resistant-tuberculosis (accessed on 27 January 2021).
10. Schwoebel, V.; Chiang, C.-Y.; Trébucq, A.; Piubello, A.; Ait-Khaled, N.; Koura, K.G.; Heldal, E.; Van Deun, A.; Rieder, H.L. Outcome definitions for multidrug-resistant TB treated with shorter treatment regimens. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* **2019**, *23*, 619–624. [CrossRef]
11. Canetti, G.; Rist, N.; Grosset, J. Measurement of sensitivity of the tuberculous bacillus to antibacillary drugs by the method of proportions. Methodology, resistance criteria, results and interpretation. *Rev. Tuberc. Pneumol.* **1963**, *27*, 217–272.
12. Brossier, F.; Sougakoff, W.; French National Reference Center for Mycobacteria. Molecular detection methods of resistance to antiTB drugs in *Mycobacterium tuberculosis*. *Med. Mal. Infect.* **2017**, *47*, 340–348. [CrossRef]
13. Andre, E.; Goeminne, L.; Cabibbe, A.; Beckert, P.; Kabamba Mukadi, B.; Mathys, V.; Gagneux, S.; Niemann, S.; Van Ingen, J.; Cambau, E. Consensus numbering system for the rifampicin resistance-associated *rpoB* gene mutations in pathogenic mycobacteria. *Clin. Microbiol. Infect.* **2017**, *23*, 167–172. [CrossRef]
14. Guglielmetti, L.; Jaffré, J.; Bernard, C.; Brossier, F.; El Helali, N.; Chadelat, K.; Thouvenin, G.; Dautzenberg, B.; Henry, B.; Jaspard, M. Multidisciplinary advisory teams to manage multidrug-resistant TB: The example of the French Consilium. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* **2019**, *23*, 1050–1054. [CrossRef]
15. Suárez-García, I.; Noguerado, A. Drug treatment of multidrug-resistant osteoarticular TB: A systematic literature review. *Int. J. Infect. Dis.* **2012**, *16*, e774–e778. [CrossRef]
16. Seddon, J.A.; Donald, P.R.; Vlok, G.J.; Schaaf, H.S. Multidrug-resistant TB of the spine in children—characteristics from a high burden setting. *J. Trop. Pediatr.* **2012**, *58*, 341–347. [CrossRef]
17. Kumar, V.; Neradi, D.; Sherry, B.; Gaurav, A.; Dhath, S.S. Tuberculosis of the spine and drug resistance: A review article. *Neurosurg. Rev.* **2022**, *45*, 217–219. [CrossRef]
18. Guillouzoic, A.; Andrejak, C.; Peuchant, O.; Hery-Arnaud, G.; Hamdad, F.; Lanotte, P.; Gaborit, B.; Bernard, L.; Bémer, P. Treatment of Bone and Joint TB in France: A Multicentre Retrospective Study. *J. Clin. Med.* **2020**, *9*, 2529. [CrossRef]
19. Tattevin, P.; Che, D.; Fraisse, P.; Gatey, C.; Guichard, C.; Antoine, D.; Paty, M.C.; Bouvet, E. Factors associated with patient and health care system delay in the diagnosis of TB in France. *Int. J. Tuberc Lung Dis.* **2012**, *16*, 510–515. [CrossRef]
20. American Thoracic Society. CDC, Infectious Diseases Society of America. Treatment of TB. *MMWR Recomm. Rep.* **2003**, *52*, 1–77. [CrossRef]
21. Gegia, M.; Winters, N.; Benedetti, A.; van Soolingen, D.; Menzies, D. Treatment of isoniazid-resistant TB with first-line drugs: A systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect. Dis.* **2017**, *17*, 223–234. [CrossRef]
22. Kulka, K.; Hatfull, G.; Ojha, A.K. Growth of *Mycobacterium TB* biofilms. *J. Vis. Exp.* **2012**, *15*, 3820. [CrossRef]
23. Uhel, F.; Corvaisier, G.; Poinsignon, Y.; Chirouze, C.; Beraud, G.; Grossi, O.; Varache, N.; Arvieux, C.; Le Berre, R.; Tattevin, P. *Mycobacterium TB* prosthetic joint infections: A case series and literature review. *J. Infect.* **2019**, *78*, 27–34. [CrossRef]
24. Veloci, S.; Mencarini, J.; Lagi, F.; Beltrami, G.; Campanacci, D.A.; Bartoloni, A.; Bartalesi, F. Tubercular prosthetic joint infection: Two case reports and literature review. *Infection* **2018**, *46*, 55–68. [CrossRef]
25. Shanbhag, V.; Kotwal, R.; Gaitonde, A.; Singhal, K. Total hip replacement infected with *Mycobacterium TB*. A case report with review of literature. *Acta Orthop. Belg.* **2007**, *73*, 268–274. [PubMed]
26. WHO. *WHO Consolidated Guidelines on Tuberculosis, Module 4: Treatment—Drug-Resistant Tuberculosis Treatment*; WHO: Geneva, Switzerland, 2020; Available online: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240007048> (accessed on 15 January 2020).

27. Fitzgerald, D.W.; Sterling, T.R.; Haas, D.W. Mycobacterium tuberculosis. In *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*, 8th ed.; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2015. [[CrossRef](#)]
28. Guerrin-Iran, E.; Thiolet, J.M.; Rousseau, C.; Henry, S.; Poirier, C.; Che, D.; Vinas, J.-M.; Jarlier, V.; Robert, J. An evaluation of data quality in a network for surveillance of Mycobacterium TB resistance to antiTB drugs in Ile-de-France region-2001–2002. *Eur. J. Epidemiol.* **2006**, *21*, 783–785. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



Article

Rapid Molecular Diagnosis of Tuberculosis and Its Resistance to Rifampicin and Isoniazid with Automated MDR/MTB ELITE MGB[®] Assay

Vichita Ok ^{1,2}, Alexandra Aubry ^{1,2}, Florence Morel ^{1,2}, Isabelle Bonnet ^{1,2}, Jérôme Robert ^{1,2} and Wladimir Sougakoff ^{1,2,*}

¹ Centre d'Immunologie et des Maladies Infectieuses, Sorbonne Université, INSERM, U1135, Cimi-Paris, F-75013 Paris, France; vichita.ok@aphp.fr (V.O.); alexandra.aubry@sorbonne-universite.fr (A.A.); florence.morel2@aphp.fr (F.M.); isabelle.bonnet2@aphp.fr (I.B.); jerome.robert@aphp.fr (J.R.)

² AP-HP (Assistance Publique Hôpitaux de Paris), Centre National de Référence des Mycobactéries et de la Résistance des Mycobactéries aux Antituberculeux, Laboratoire de Bactériologie-Hygiène, Groupe Hospitalier Universitaire Sorbonne Université, Hôpital Pitié-Salpêtrière, F-75013 Paris, France

* Correspondence: wladimir.sougakoff@aphp.fr; Tel.: +33-1-42-16-20-97

Abstract: The MDR/MTB ELITE MGB[®] kit (ELITEch) carried on the ELITE InGenius[®] platform is a new real-time PCR assay allowing automated extraction and detection of DNA of the *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTB) and mutations in the *rpoB* and *katG* genes and *inhA* promoter region (*pro-inhA*) associated to resistance to rifampicin and isoniazid, the two markers of multidrug-resistant TB (MDR). We assessed the performances of the test on a collection of strains ($n = 54$) and a set of clinical samples ($n = 242$) from routine practice, comparatively to TB diagnosis and genotypic drug susceptibility testing (gDST) as references. Regarding the 242 clinical samples, the sensitivity and specificity of MTB detection by ELITE were 90.9% and 97.5%, respectively. For the detection of resistance-conferring mutations on positive clinical samples, we observed perfect agreement with gDST for *katG* and *pro-inhA* ($\kappa = 1.0$) and two discordant results for *rpoB* ($\kappa = 0.82$). Considering the 54 cultured strains, very good agreement with gDST was observed for the detection of the 25 distinct mutations in *rpoB*, *katG*, and *pro-inhA*, ($\kappa = 0.95$, 0.88, and 0.95, respectively). In conclusion, the automated MDR/MTB ELITE MGB[®] assay shows great promise and appears to be a valuable tool for rapid detection of pre-MDR- and MDR-TB directly from clinical specimens.

Keywords: tuberculosis; multi-drug resistance; rapid molecular diagnosis



Citation: Ok, V.; Aubry, A.; Morel, F.; Bonnet, I.; Robert, J.; Sougakoff, W. Rapid Molecular Diagnosis of Tuberculosis and Its Resistance to Rifampicin and Isoniazid with Automated MDR/MTB ELITE MGB[®] Assay. *Antibiotics* **2021**, *10*, 797. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10070797>

Academic Editor: Danila V. Zimenkov

Received: 26 May 2021

Accepted: 24 June 2021

Published: 30 June 2021

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



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Antibiotic resistance is a major threat to tuberculosis (TB) control. Efficient patient care needs early and accurate detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTB) and identification of resistance to rifampicin (RIF-R) and isoniazid (INH-R) [1]. The World Health Organization (WHO)-endorsed Xpert[®] MTB/RIF assay (Cepheid, Sunnyvale, CA, USA) has the advantage of being fully automated but provides limited information as it can only detect *rpoB* mutations involved in RIF-R but not INH-R, which can significantly impact first-line regimen success. Molecular-based assays have been developed to detect specific drug resistance-encoding mutations in MTB [2–4]. For instance, GenoType MTBDRplus (Hain Lifescience, Nehren, Germany) assay is recommended by the WHO for direct testing of smear-positive specimens and MTB isolates. It permits the detection within 48 h of the most frequent mutations in *rpoB* and in *katG* genes, and *inhA* promoter (*pro-inhA*), which cause RIF-R and INH-R, respectively [5–7]. This line-probe assay is not automated and is time-consuming. Other “real-time” PCR-based assays detecting resistance to both RIF and INH have been developed, such as Fluorotype[®] MTBDR VER 2.0 (Hain Lifescience, Nehren, Germany), which detects mutations in the same three targets as GenoType MTBDRplus

for both RIF and INH resistance, and is additionally automated with a testing capacity of 95 samples per run. However, automation does not comprise DNA extraction [8].

MDR/MTB ELITE MGB[®] Kit on the ELITE InGenius[®] platform (ELITechGroup Molecular Diagnostics, Bothell, WA, USA) is the first multiplex real-time PCR assay designed for automated DNA extraction and simultaneous detection of the DNA of MTB and of the main mutations responsible for resistance to RIF and INH in clinical specimens. Automation has the advantage of obtaining results in 3 h, with all steps included from sample to results, thus reducing time-to-result and making it possible to initiate early adapted treatment, especially in case of MDR-TB. The assay was first evaluated by Bisognin et al. but on frozen samples spiked with mutated strains [9]. Recently, a second study by Hodille et al. was performed retrospectively on clinical samples ($n = 54$) and strains ($n = 25$) [10]. The present evaluation of the assay aims to provide its diagnostic accuracy directly on 242 specimens collected in prospective clinical routine practice and, in a second part, retrospectively on 54 previously characterized strains from our French National Reference Centre of Mycobacteria (NRC MyRMA, Paris, France) collection, representing a wide range of mutations (25 distinct mutations in total).

2. Results

2.1. Performances of MDR/MTB ELITE MGB[®] Assay on Routine Clinical Specimens

The first part of the study aimed to assess the performances of MDR/MTB ELITE MGB[®] assay as a routine diagnostic test. The assay was performed prospectively on 247 consecutive clinical specimens sent to our laboratory for diagnosis of TB. DNA extraction and amplification were performed directly from the clinical sample on the automated ELITE InGenius[®] system. Five smear-negative bronchial aspirates were excluded because their results on the ELITE assay were invalid owing to the presence of inhibitors, leaving 242 samples included for comparison in our study.

Out of the 242 specimens, TB diagnosis was confirmed for 44 of them and was excluded for the remaining 198 samples. Among the 44 positives, 40 were ELITE positive for MTB while 4 remained negative (Table 1). The 4 latter, for which the culture was positive, were negative on smear examination and also using another molecular assay (Fluorotype[®] MTB, Hain). Among the 198 TB negatives, 193 were detected as negative by ELITE while 5 were discordant ELITE positives. Apparent sensitivity and specificity were respectively 90.9% and 97.5% (Table 1).

Table 1. Performances of MDR/MTB ELITE MGB[®] assay and microscopic examination for the detection of *M. tuberculosis* complex in specimens in comparison to TB diagnosis.

TB Diagnosis	ELITE MTB ($n = 242$)		Microscopic Examination ($n = 238$)	
	Positive (n)	Negative (n)	Positive (n)	Negative (n)
Positive	40 ¹	4	29	13
Negative	5 ¹	193 ²	15	182
Sensitivity, % (95% CI)	90.9 (78.3–97.5)		69.0 (52.9–82.4)	
Specificity, % (95% CI)	97.5 (94.2–99.2)		92.3 (87.6–95.7)	
Cohen's Kappa (95% CI)	0.88 (0.80–0.96)		0.60 (0.47–0.74)	

¹ Including 14 smear-negative (9 TB diagnosis positive and 5 TB diagnosis negative). ² Including 15 smear-positive ELITE negative with 13 NTM and 2 contaminated samples.

For the detection of resistance mutations in *rpoB*, *katG*, and *pro-inhA*, ELITE InGenius[®] software is set up to interpret results only if $Ct \leq 31$. Among the 40 concordant ELITE positives displayed on Table 1, ELITE InGenius[®] was able to interpret resistance results for 26 specimens of $Ct \leq 31$, while no valid result was proposed by the InGenius[®] system

for the other 14 specimens for which Ct > 31. Nevertheless, for such low positives, ELITE InGenius® offers the possibility of manual analysis of the curves by the operator. In our study, 6 out of the 14 InGenius®-uninterpretable results (all RIF-S and INH-S) could thus be interpreted based on direct analysis of the curves (see ⁶ in Table 2).

Table 2. Performances of MDR/MTB ELITE MGB® assay in detecting resistance mutations in *rpoB*, *katG*, and *pro-inhA* on 40 ELITE MTB-positive specimens in comparison with gDST.

gDST	MDR/MTB ELITE					
	Resistant (<i>n</i>)	Susceptible (<i>n</i>)	Uninterpretable (InGenius® and Operator)	Sensitivity (Interpreted) % (95% CI)	Specificity (Interpreted) % (95% CI)	Cohen's Kappa (Interpreted) (95% CI)
<i>rpoB</i>						
Mutated	6 ¹	1 ²	2	85.7 (85.7)	96.0 (100.0)	0.82 (0.90)
Wild-type	1 ³	24 ⁶	6	(42.1–99.7)	(79.6–99.9)	(0.57–1.0)
<i>katG</i>						
Mutated	5 ⁴	0	2	100 (100)	100 (100)	1.0 (1.0)
Wild-type	0	27 ⁶	6	(47.8–100)	(87.2–100)	(1.0–1.0)
<i>pro-inhA</i>						
Mutated	5 ⁵	0	0	100 (100)	100 (100)	1.0 (1.0)
Wild-type	0	27 ⁶	8	(47.8–100)	(87.2–100)	(1.0–1.0)

¹ detected mutations: Ser450Leu, His445Asp. ² mutation Asn438Asp on *rpoB* gene, not covered by MDR/MTB ELITE MGB®, and not conferring resistance to RIF, finally considered as “true negative/susceptible” result. ³ absence of detection of a probe, interpreted as resistant by ELITE InGenius®. ⁴ detected mutation: Ser315Thr. ⁵ detected mutation: –15C > T. ⁶ including 6 with Ct > 31 (not interpretable by ELITE InGenius®) finally interpreted by manual analysis of the curves by the operator.

For each of these six assays, 100% concordance was observed with gDST for the three targets *rpoB*, *katG*, and *inhA* promoter. It has to be noted that the smear examination was negative for three of them, showed <1 acid-fast bacteria (AFB) for two samples, and 1–9 AFB for the last one. The eight remaining InGenius®-uninterpretable results (including two MDR-TB and six RIF-S and INH-S, Table 2) could not be analyzed by the operator either. Six of them were smear negative and one displayed <1 AFB (no smear microscopy was performed for the last one owing to insufficient quantity). Considering the thirty-two results which could be interpreted by either InGenius® (*n* = 26) or the operator (*n* = 6), predictions of resistance by ELITE assay and by gDST perfectly matched for *katG* and *pro-inhA*, with kappa values of 1.0 for both targets (Table 2). Regarding the detection of resistance-conferring mutations in *rpoB*, two discrepancies were observed. First, a rare mutation Asn438Asp was detected by Sanger sequencing, which is not covered by MDR/MTB ELITE MGB® (see ² on Table 2). As this mutation was finally proven not to be linked to RIF resistance (the corresponding strain was RIF-S by phenotypic DST), the non-detection of Asn438Asp by ELITE was finally regarded as a true negative/susceptible result. In another sample (see ³ on Table 2), the ELITE resistant/gDST wild-type result was due to the detection of a very weak signal yet below the threshold in the amplification curve of a probe by ELITE, considered as an absence of amplification, hence initially interpreted as resistant by ELITE InGenius®. The result was finally considered a false positive. Before interpreting the data, the sensitivity and specificity values found for *rpoB* were 85.7% and 96%, respectively, with a kappa value of 0.82 (Table 2). After interpretation, we determined for *rpoB* sensitivity and specificity values of 85.7 and 100%, respectively, and agreement of ELITE assay with gDST was very good, with a kappa value of 0.90 (Table 2). Because the resistant cases in our set of clinical isolates were due to only two distinct mutations in *rpoB* (Ser450Leu (*n* = 5), His445Asp (*n* = 1)), one in *katG* (Ser315Thr, *n* = 5), and one in *pro-inhA* (–15C > T, *n* = 5), we undertook an evaluation of the ELITE assay on a second set of previously characterized isolates in order to widen the range of mutations tested in these three targets.

2.2. Retrospective Study: Performances of MDR/MTB ELITE MGB[®] Assay in Detecting Resistance Mutations in *rpoB*, *katG*, and Pro-*inhA* on Well-Defined Isolates

In this second part of the study, we aimed to assess the performances of MDR/MTB ELITE MGB[®] assay in detecting resistance mutations in *rpoB*, *katG*, and pro-*inhA* from 54 isolates from our NRC MyRMA collection. The DNAs extracted by thermal lysis from these isolates were tested with MDR/MTB ELITE MGB[®] assay using the “only PCR” function of the ELITE InGenius[®] platform. The DNAs were from 40 MDR strains, 2 mono-RIF resistant strains, 2 mono-INH resistant strains, and 10 strains susceptible to both INH and RIF. The 44 resistant strains represented in total 17 distinct amino acid substitutions in *rpoB*, 5 in *katG*, and 3 mutations in the *inhA* promoter region (Table 3).

Table 3. Mutations detected in *rpoB* gene, *katG* gene, and *inhA* promoter on clinical specimens and on isolates from our NRC MyRMA collection and tested by MDR/MTB ELITE MGB[®] assay, according to resistance patterns.

Resistance Phenotype	Mutation in		
	<i>rpoB</i>	<i>katG</i>	<i>inhA</i> Promoter
MDR	Val251Phe; Gln432Pro; Asp435Val; Asp435Tyr; Asp435Tyr + Ser441Thr; Asp435Tyr + Gln429Arg; Asp435Tyr + Met433Ile; Asp435Glu + His445Asn; His445Cys; His445Asp; His445Leu; His445Arg; His445Tyr; Ser450Leu; Leu452Pro	Ser315Thr Trp689Gly	−15C > T −8T > A
Mono RIF-R	Ser450Leu, His445Tyr	Ser140Gly ¹	
Mono INH-R	Asn438Asp ²	Arg249Pro	−60C > G
Susceptible	Leu430Pro	Ser315Gly ³	

¹ Ser140Gly in *katG*: not conferring resistance to isoniazid. ² Asn438Asp in *rpoB*: not conferring resistance to rifampicin. ³ Ser315Gly in *katG*: not conferring resistance to isoniazid.

The performances in detecting resistance mutations in comparison with gDST are presented in Table 4. None of the 12 strains wild-type for *rpoB* had any *rpoB* mutation detected by ELITE (Table 4). Among the 42 strains mutated in *rpoB*, 41 resistance mutations were detected in *rpoB* by ELITE. The single discordant result was due to an infrequent *rpoB* genetic variant, Val251Phe (Table 3 and ¹ on Table 4), which was not detected by ELITE since the region covered by the assay is limited to the mutations affecting codons 429 to 452 (the mutation Val251Phe was actually detected after *rpoB* sequencing). Sensitivity and specificity were 97.6% and 100.0%, respectively. Excellent concordance with gDST was observed with a kappa value of 0.95 (Table 4).

Table 4. Performances of MDR/MTB ELITE MGB[®] assay in detecting resistance mutations in *rpoB*, *katG*, and *pro-inhA* on strains ($n = 54$) from our NRCMyRMA collection, in comparison with gDST.

gDST	MDR/MTB ELITE Results				
	Resistant (n)	Susceptible (n)	Sensitivity (Interpreted), % (95% CI)	Specificity (Interpreted), % (95% CI)	Cohen's Kappa (Interpreted), (95% CI)
<i>rpoB</i>					
Mutated	41	1 ¹	97.6 (97.6)	100.0 (100)	0.95 (0.95)
Wild-type	0	12	(87.4–100)	(73.5–100.0)	(0.85–1.0)
<i>katG</i>					
Mutated	34 ²	3 ³	91.8 (94.3)	100.0 (94.7)	0.88 (0.88)
Wild-type	0	17	(78.0–98.3)	(80.4–100.0)	(0.74–1.0)
<i>pro-inhA</i>					
Mutated	14	1 ⁴	93.3 (93.3)	100.0 (100.0)	0.95 (0.95)
Wild-type	0	39	(68.0–99.9)	(90.9–100.0)	(0.86–1.0)

¹ mutation Val251Phe on *rpoB* gene, not covered by MDR/MTB ELITE MGB[®]. ² including mutation Ser315Gly in an isolate phenotypically susceptible to INH. ³ mutations Ser140Gly, Arg249Pro, and Trp689Gly on *katG* gene, not covered by MDR/MTB ELITE MGB[®]. ⁴ mutation –60C > G on *inhA* promoter region, not covered by MDR/MTB ELITE MGB[®].

Regarding the *katG* gene, the 17 wild-type isolates were well-detected as susceptible by ELITE assay (Table 4). Among the 37 mutant strains, ELITE detected all the mutations appearing at codon 315, namely the frequent Ser315Thr ($n = 33$) but also Ser315Gly ($n = 1$, Table 3 and see ² on Table 4). The latter was detected on a strain which was INH-S on phenotypical DST and was finally considered as a false positive ELITE result. The three remaining discordant ELITE susceptible/gDST mutated results (see ³ in Table 4) were due to infrequent mutations located outside the codon 315 region screened by the assay. The first one was Ser140Gly which was not associated to resistance (phenotypically INH-S, Table 3). Therefore, it was interpreted as a true negative result. The other two mutations, Arg249Pro and Trp689Gly, identified on resistant strains, were regarded as two false negative ELITE results. Sensitivity and specificity of ELITE in detecting resistance mutations in *katG* gene were 91.8% and 100% before interpretation, and 94.3% and 94.7% after interpretation, respectively, with a $\kappa = 0.88$ showing very good agreement.

Finally, considering the *inhA* promoter region, the single discordant result between ELITE assay and gDST was due to the mutation –60C > G (Table 3 and see ⁴ on Table 4), which is not covered by the ELITE assay. This mutation was identified by Sanger sequencing on an INH-R strain, which presents no other identified mutation. The assay showed a sensitivity and a specificity of 93.3% and 100%, respectively. Total agreement for the detection of resistance mutations in *pro-inhA* was excellent, with a kappa coefficient of 0.95.

3. Discussion

In this study performed on 242 routinely collected specimens, MDR/MTB ELITE MGB[®] assay yielded very good results in diagnosing TB, with a sensitivity and a specificity of 90.9% and 97.5%, respectively. The performance parameters of ELITE assay were significantly higher than those of microscopic examination (sensitivity of 69.0% and specificity of 92.3%), as shown in Table 1. Among the ELITE positives, 14 were smear negatives, with 9 confirmed TB (see ¹ on Table 1). Interestingly, the ELITE assay seems sensitive enough to detect pauci-bacillary TB. Sensitivity was comparable to that published by Bisognin et al. [9], and higher than that observed by Hodille et al, in routine clinical context in our study. Considering the ELITE negatives, 15 were smear-positive, among which 13 were due to the non-tuberculosis mycobacteria *M. intracellulare* ($n = 3$), *M. avium* ($n = 5$), *M. fortuitum* ($n = 1$), *M. chimaera* ($n = 2$), *M. abscessus* susp. *bolletii* ($n = 1$), and *M. genavense* ($n = 1$), and 2 were false-positive microscopic examinations likely due to *Corynebacterium* spp., indicating very high specificity of ELITE assay, which was also observed by Bisognin et al. (99.23%) and Hodille et al. (100%) [9,10]. Among the nine

discordant results, four were false-negative ELITE results obtained from four culture-diagnosed TB with negative microscopic examinations owing to their low bacillary load in the specimens. Notably, these four negative specimens were also negative by Hain FluoroType[®] MTB, suggesting that molecular diagnostics seem to not be sensitive enough in such smear-negative specimens. On the other hand, five out of the nine discordant results were discordant ELITE positive ones. The five false-positive results, for which no diagnosis of TB had been established, corresponded to ELITE amplification curves showing very late positive and doubtful signals, for which either artefacts or contamination could not be excluded. These observations should warn about InGenius[®] interpretation issues for very weak positives.

Recently, new rapid tests have been developed, such as Xpert[®] MTB/RIF Ultra, for which a gain in sensitivity has been reported (88–95.7%), yet raising a specificity issue (58.6–96.7%) [11,12]. Comparatively, the ELITE assay has the advantage of offering high sensitivity while keeping the highest specificity, as it was also recently reported by Bisognin et al. [9]. Hodille et al. found a lower sensitivity on their 54 selected samples, when compared to culture. It has to be noted that clinical specimen processing makes it inappropriate to declare a sensitivity of 100% in detecting RIF and INH resistance, while it was calculated based on only six samples for both molecules [10]. In our study, we tested prospectively as in routine diagnosis 242 samples, among which 44 were confirmed diagnosed TB.

Another advantage of the ELITE assay is that the ELITE InGenius[®] apparatus allows the recovery of the extracted DNAs for further molecular tests, such as the identification of associated resistance markers (in particular to second-line drugs) and the phylogenotyping allowing to trace rapidly possible routes of transmission of MDR-TB.

Regarding the detection of resistance mutations, MDR/MTB ELITE MGB[®] assay has been designed to provide results similar to the GenoType MTBDR*plus* assay which targets the same regions in *rpoB*, *katG*, and *pro-inhA*. With respect to the five discordant ELITE susceptible/gDST-mutated results shown on Table 4, the mutations Val251Phe on *rpoB* and Ser140Gly, Arg249Pro, and Trp689Gly on *katG* are not covered by ELITE. Like MTBDR*plus*, the MDR/MTB ELITE assay misses about 7% of the *katG* mutations outside the “315” target [13]. Notably, ELITE was able to detect the mutation Ser315Gly, to which no resistance was associated. It is important to note here that in comparison with the MTBDR*plus* line probe assay, ELITE cannot specify the most frequent mutations but only predicts if a mutation is present in each of the three targets. Therefore, one could wonder about the consequences of silent mutations on the ELITE performances. Even if they could in practice impact the results of the ELITE analysis, silent mutations are scarcely observed, and none was detected in our study. Nevertheless, this point should be assessed with larger sampling in the future. ELITE assay is robust regarding *rpoB* and *pro-inhA* since most associated resistance mutations are located in the regions targeted by the assay. It appeared less robust for *katG* owing to the more diversified mutations outside the tested region, of which the impact on resistance to INH is less predictable.

Our study has two limitations: (i), the size of our samples which has to be enlarged to confirm our results, and (ii) the limited diversity in tested specimens. In fact, our study was performed mostly on pulmonary samples but included only few extra-pulmonary specimens. However, in our study, the assay was evaluated in laboratory routine conditions, unlike the first evaluations of the ELITE assay recently published by Bisognin et al. and Hodille et al. [9,10], which were performed on frozen specimens. In the first evaluation, all the positive specimens were drug-susceptible and wild-type for the three molecular targets *rpoB*, *katG*, and *inhA* promoter, and detection of resistance was assessed on samples spiked with three mutated strains containing only mutations Ser450Leu on *rpoB*, Ser315Thr on *katG*, and $-15C > G$ on *inhA* promoter. As for the second study by Hodille et al., only the mutations on the strains were described. Considering the three targets, only nine mutations were tested, namely Ser450Leu, His445Tyr, and Leu452Pro on *rpoB* gene, Ser315Thr, $\Delta 1-492$, Gln88Pro, and Leu343STOP on *katG*, and $-15fabG1$ and $-17fabG1$ on

pro-*inhA* [10]. The large range of mutations tested in our study (25 distinct mutations from clinical isolates, representing frequently observed resistance patterns) provides sufficient diversity to reinforce our confidence in the potential of the ELITE assay to be an efficient routine tool for diagnosing MDR-TB.

4. Materials and Methods

4.1. Clinical Specimen Processing

Two hundred and forty-seven consecutive routine clinical specimens were collected from 5 November 2019 to 28 August 2020 from liquefied sputa ($n = 41$), bronchial aspirates ($n = 148$), bronchoalveolar lavages ($n = 12$), gastric aspirations ($n = 5$), biopsies ($n = 18$), cerebrospinal fluid ($n = 7$), lymph nodes ($n = 5$), abscesses/pus ($n = 6$), urine ($n = 1$), and other cavitory fluids ($n = 4$), from patients for which TB was suspected. Samples were processed inside a level-III biosafety cabinet. For every specimen, culture on Löwenstein-Jensen (LJ) medium was performed and a slide was prepared and stained with auramine for microscopic examination, following routine procedure in our laboratory [14].

4.2. DNAs Extracted from Strains

Fifty-four DNAs from our NRC MyRMA collection were tested. These DNAs were selected in order to cover a wide set of mutations in genes conferring resistance to RIF and INH. These strains belong to the lineages Beijing ($n = 17$), Delhi-CAS ($n = 2$), Ghana ($n = 3$), Haarlem ($n = 3$), H1 ($n = 1$), LAM ($n = 8$), NEW-1 ($n = 1$), S ($n = 3$), Uganda-1/T2 ($n = 1$), T1 ($n = 2$), Ural ($n = 1$), and uncharacterized strains ($n = 12$). DNAs were extracted from isolated strains by thermal lysis, as previously described [15].

4.3. Genotypic DST

Detection of resistance mutations in the three targets (*rpoB*, *katG*, and pro-*inhA*) by the new assay was compared with genotypic DST (gDST) as reference, which included identification of mutations in the three targets using GenoType MTBDR*plus* and Sanger sequencing [15] plus Deeplex[®] Myc-TB (GenoScreen, Lille, France) when required, following the manufacturers' instructions.

4.4. MDR/MTB ELITE MGB[®] Kit on ELITE InGenius[®] System (ELITechGroup Molecular Diagnostics, Bothell, WA, USA)

The MDR/MTB ELITE MGB[®] assay consists of a fully automated multiplex real-time PCR assay designed for the simultaneous detection of the DNA of *M. tuberculosis* and of resistance to rifampicin and isoniazid. Based on the use of ELITE MGB[®] probes, MTB Complex is detected by targeting the repeated sequence IS6110, rifampicin resistance by analyzing the so-called Rifampicin Resistance Determining Region (RRDR) in *rpoB*, and isoniazid resistance by analyzing *katG* at the level of codon 315 and *inhA* at the level of its promoter region. The entire ELITE assay is performed on the ELITE InGenius platform, an automated integrated system for extraction, amplification, detection, and results interpretation.

Specimens were first decontaminated using NAC-PAC[®] decontamination and digestion system (AlphaTec[™]), following the manufacturer's instructions and inactivated using thermal shock (25 min at 95 °C, 1 h at −20 °C, 10 min at 95 °C, and 10 min at −20 °C). Two hundred microliters of decontaminated and inactivated specimens were processed on the ELITE InGenius[®] System, following the manufacturer's instructions. Briefly, DNA extractions were performed from 200 µL of sample in ready-to-use, unitary, cassette-based format extraction cartridges, while real-time multiplexed PCR amplifications were performed in independent unit cartridges for Elite-controlled thermal cyclers. An internal control was included at the extraction step in order to control the absence of PCR inhibitors. Results interpretation and analysis were automatically done by the system. The raw data for the Ct values are given as Supplementary Information (Table S1). The cutoff value used by the InGenius[®] system to differentiate between positive and negative samples is 45.

4.5. Statistical Analysis

Apparent sensitivity and specificity of the new assay were calculated in comparison with confirmed diagnosis of TB following the international guidelines [16] for MTB detection and gDST for the detection of resistance mutations as references. Agreements between MDR/MTB ELITE MGB[®] assay and reference tests were assessed with Kappa statistics since it is more robust for evaluation of agreement between categorical variables. Cohen's kappa (κ) values from 0.00 to 0.20 show slight agreement, those from 0.21 to 0.40 indicate fair agreement, those from 0.41 to 0.6 suggest moderate agreement, those from 0.61 to 0.80 show substantial agreement, and those above 0.8 indicate excellent agreement [17]. Statistical analyses were performed using R packages *epiR* [18] and *irr* [19] on R software [20].

5. Conclusions

As a conclusion, MDR/MTB ELITE MGB[®] assay combines the abilities to yield early diagnostic results directly from specimens, like Xpert[®] technology, and to properly detect RIF and INH resistance like GenoType MTBDR^{plus} DNA strips. The automation on the ELITE InGenius[®] Instrument, which integrates DNA extraction, amplification, and result interpretation makes it possible to get results in about 3 h, a feature which not only can bring about early results and early adapted treatment for the patients but is also time-sparing for technicians. However, this technique needs appropriate and dedicated premises, which makes it difficult to use as point-of-care testing. In the present report, we have shown that the ELITE assay has proven to be a reliable test to detect MTB and resistance to first-line drugs RIF and INH in clinical routine practice. Its use directly on primary specimens could be very helpful as an early guide for treatment if the assay is combined with a new next-generation sequencing (NGS)-based targeted deep-sequencing approach such as the Deeplex[®] Myc-TB assay which allows the detection of resistance to 13 anti-TB drugs [21,22]. Such a strategy represents a very promising breakthrough for early optimal treatment of MDR-TB and XDR-TB patients and is currently under evaluation in our laboratory.

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/antibiotics10070797/s1>, Table S1: Raw Ct values measured by ELITE assay for MTB detection.

Author Contributions: Conceptualization, W.S.; methodology, W.S. and V.O.; software, V.O.; validation, W.S. and J.R.; investigation, V.O., W.S., F.M. and I.B.; resources, A.A.; writing—original draft preparation, W.S. and V.O.; writing—review and editing, A.A., F.M., I.B. and J.R.; project administration, J.R.; funding acquisition, J.R., A.A. and W.S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This study was supported by an annual grant from Santé Publique France.

Institutional Review Board Statement: Because this study assessed new methods which could not disadvantage patient clinical management, research ethics committee approval was not required.

Informed Consent Statement: Patient consent was waived due to the following reason: in accordance with French legislation, no written informed consent from patients was required for this study assessing a new diagnostic test which could not disadvantage patient clinical management.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from Vichita Ok (vichita.ok@aphp.fr).

Acknowledgments: We would like to thank Olivia Soulier, Lucas Gandy, Sabrina Goumghar, and Gérald Millot for their invaluable technical assistance.

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

References

1. World Health Organization. *WHO Consolidated Guidelines on Drug-Resistant Tuberculosis Treatment*; World Health Organization: Geneva, Switzerland, 2019.
2. Laurenzo, D.; Mousa, S.A. Mechanisms of Drug Resistance in *Mycobacterium tuberculosis* and Current Status of Rapid Molecular Diagnostic Testing. *Acta Trop.* **2011**, *119*, 5–10. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

3. McGrath, M.; Gey van Pittius, N.C.; van Helden, P.D.; Warren, R.M.; Warner, D.F. Mutation Rate and the Emergence of Drug Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Antimicrob. Chemother.* **2014**, *69*, 292–302. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Zhang, Y.; Yew, W.-W. Mechanisms of Drug Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: Update 2015. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* **2015**, *19*, 1276–1289. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Banerjee, A.; Dubnau, E.; Quemard, A.; Balasubramanian, V.; Um, K.S.; Wilson, T.; Collins, D.; de Lisle, G.; Jacobs, W.R. InhA, a Gene Encoding a Target for Isoniazid and Ethionamide in *Mycobacterium tuberculosis*. *Science* **1994**, *263*, 227–230. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Telenti, A.; Imboden, P.; Marchesi, F.; Matter, L.; Schopfer, K.; Bodmer, T.; Lowrie, D.; Colston, M.J.; Cole, S. Detection of Rifampicin-Resistance Mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *Lancet* **1993**, *341*, 647–651. [[CrossRef](#)]
7. Zhang, Y.; Heym, B.; Allen, B.; Young, D.; Cole, S. The Catalase—Peroxidase Gene and Isoniazid Resistance of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nature* **1992**, *358*, 591–593. [[CrossRef](#)]
8. Hillemann, D.; Haasis, C.; Andres, S.; Behn, T.; Kranzer, K. Validation of the FluoroType MTBDR Assay for Detection of Rifampin and Isoniazid Resistance in *Mycobacterium tuberculosis* Complex Isolates. *J. Clin. Microbiol.* **2018**, *56*. [[CrossRef](#)]
9. Bisognin, F.; Lombardi, G.; Finelli, C.; Re, M.C.; Dal Monte, P. Simultaneous Detection of *Mycobacterium tuberculosis* Complex and Resistance to Rifampicin and Isoniazid by MDR/MTB ELITE MGB[®] Kit for the Diagnosis of Tuberculosis. *PLoS ONE* **2020**, *15*, e0232632. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Hodille, E.; Genestet, C.; Delque, T.; Ruffel, L.; Benito, Y.; Fredenucci, I.; Rasigade, J.-P.; Lina, G.; Dumitrescu, O. The MTB/MDR ELITE MGB[®] Kit: Performance Assessment for Pulmonary, Extra-Pulmonary, and Resistant Tuberculosis Diagnosis, and Integration in the Laboratory Workflow of a French Center. *Pathogens* **2021**, *10*, 176. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Opota, O.; Mazza-Stalder, J.; Greub, G.; Jatou, K. The Rapid Molecular Test Xpert MTB/RIF Ultra: Towards Improved Tuberculosis Diagnosis and Rifampicin Resistance Detection. *Clin. Microbiol. Infect.* **2019**, *25*, 1370–1376. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Sekyere, J.O.; Maphalala, N.; Malinga, L.A.; Mbelle, N.M.; Maningi, N.E. A Comparative Evaluation of the New Genexpert MTB/RIF Ultra and Other Rapid Diagnostic Assays for Detecting Tuberculosis in Pulmonary and Extra Pulmonary Specimens. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 16587. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Brossier, F.; Veziris, N.; Truffot-Pernot, C.; Jarlier, V.; Sougakoff, W. Performance of the Genotype MTBDR Line Probe Assay for Detection of Resistance to Rifampin and Isoniazid in Strains of *Mycobacterium tuberculosis* with Low- and High-Level Resistance. *J. Clin. Microbiol.* **2006**, *44*, 3659–3664. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Brossier, F.; Veziris, N.; Jarlier, V.; Sougakoff, W. Performance of MTBDR plus for Detecting High/Low Levels of *Mycobacterium tuberculosis* Resistance to Isoniazid. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* **2009**, *13*, 260–265. [[PubMed](#)]
15. Brossier, F.; Sougakoff, W.; Aubry, A.; Bernard, C.; Cambau, E.; Jarlier, V.; Mougari, F.; Raskine, L.; Robert, J.; Veziris, N. Molecular Detection Methods of Resistance to Antituberculosis Drugs in *Mycobacterium tuberculosis*. *Med. Mal. Infect.* **2017**, *47*, 340–348. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Lewinsohn, D.M.; Leonard, M.K.; LoBue, P.A.; Cohn, D.L.; Daley, C.L.; Desmond, E.; Keane, J.; Lewinsohn, D.A.; Loeffler, A.M.; Mazurek, G.H.; et al. Official American Thoracic Society/Infectious Diseases Society of America/Centers for Disease Control and Prevention Clinical Practice Guidelines: Diagnosis of Tuberculosis in Adults and Children. *Clin. Infect. Dis.* **2017**, *64*, 111–115. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Landis, J.R.; Koch, G.G. The Measurement of Observer Agreement for Categorical Data. *Biometrics* **1977**, *33*, 159–174. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Stevenson, M.; Sergeant, E. EpiR: Tools for the Analysis of Epidemiological Data, v 1.0.4. 2019. Available online: <https://CRAN.R-project.org/package=epiR> (accessed on 23 August 2019).
19. Gamer, M. Irr: Various Coefficients of Interrater Reliability and Agreement, v. 0.84.1. 2019. Available online: <https://CRAN.R-project.org/package=irr> (accessed on 16 July 2012).
20. R Core Team. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*; R Foundation for Statistical Computing: Vienna, Austria, 2019; Available online: <https://www.R-project.org/> (accessed on 5 July 2019).
21. Makhado, N.A.; Matabane, E.; Faccin, M.; Pinçon, C.; Jouet, A.; Boutachkourt, F.; Goeminne, L.; Gaudin, C.; Maphalala, G.; Beckert, P.; et al. Outbreak of Multidrug-Resistant Tuberculosis in South Africa Undetected by WHO-Endorsed Commercial Tests: An Observational Study. *Lancet Infect. Dis.* **2018**, *18*, 1350–1359. [[CrossRef](#)]
22. Ng, K.C.S.; Supply, P.; Cobelens, F.G.J.; Gaudin, C.; Gonzalez-Martin, J.; de Jong, B.C.; Rigouts, L. How Well Do Routine Molecular Diagnostics Detect Rifampin Heteroresistance in *Mycobacterium tuberculosis*? *J. Clin. Microbiol.* **2019**, *57*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



Available online at
ScienceDirect
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France
EM|consulte
www.em-consulte.com



Original article

Sampling strategy for bacteriological diagnosis of intrathoracic tuberculosis



T. Maitre^{a,b,*}, V. Ok^{a,b}, F. Morel^{a,b}, I. Bonnet^{a,b}, W. Sougakoff^{a,b}, J. Robert^{a,b}, V. Trosini^c, E. Caumes^d, A. Aubry^{a,b}, N. Veziris^{a,b,e}

^a Laboratoire de bactériologie-hygiène, centre national de référence des mycobactéries et de la résistance des mycobactéries aux antituberculeux, groupe hospitalier, Sorbonne Université, Site Pitié-Salpêtrière, AP-HP, Paris, France

^b Inserm U1135, Sorbonne université, centre d'immunologie et des maladies infectieuses (CIMI-Paris), Paris, France

^c Service de pneumologie, médecine intensive et réanimation, département R3S, groupe hospitalier, Sorbonne université, Site Pitié-Salpêtrière, AP-HP, Paris, France

^d Service de maladies infectieuses et tropicales, groupe hospitalier, Sorbonne université, Site Pitié Salpêtrière, AP-HP, Paris, France

^e Département de bactériologie, groupe hospitalier, Sorbonne université, site Saint-Antoine, AP-HP, Paris, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 2 November 2020

Accepted 31 March 2021

Available online 27 April 2021

ABSTRACT

Background. – Pulmonary tuberculosis (TB) is the most frequent site of TB and the one leading its spread worldwide. Multiple specimens are commonly collected for TB diagnosis including those requiring invasive procedures. This study aimed to review the sampling strategy for the microbiological diagnosis of pulmonary TB.

Methods. – A retrospective analysis of collected samples from September 1st 2014 to May 1st 2016 in the Bacteriology laboratory of Pitié-Salpêtrière Hospital (Paris, France) was performed. All the samples collected in patients aged over 18 years for the bacteriological diagnosis of pulmonary TB were included.

Results. – A total of 6267 samples were collected in 2187 patients. One hundred and twenty-six patients (6%) had a culture confirmed pulmonary TB. Among them, multiple sputum collections were sufficient for TB diagnosis in 63.5%, gastric lavages permitted to avoid bronchoscopy in only 7.1%, and bronchoscopy was necessary in 29.4%. The culture positivity of sputa (8.6%) was higher than that of bronchial aspirations (3.1%), bronchiolo-alveolar lavages (BAL) (2.3%) or gastric lavages (4.8%) ($P < 0.001$). From its 70.0% theoretical PPV value, the 46.1% selection in bronchial aspirations allocated to molecular test increased PPV up to 88.9%.

Conclusions. – Based on our data, we suggest to collect sputum consistently. If smear negative a bronchoscopy should be performed and molecular diagnosis be performed on a subset of bronchial aspirations based on expertise of the bronchoscopist.

1. Introduction

The global threat of tuberculosis (TB) remains undiminished with the WHO estimating there were 10 million incident cases worldwide in 2018 [1]. In 2020, France is a low TB incidence country [2] but TB remains a significant public health problem, particularly in some geographic areas [3–7] and susceptible populations [4,6,8]. Pulmonary TB includes pulmonary, and mediastinal lymphadenopathy involvements [9]. It constitutes about 80% of total TB cases [1] and is the main cause of bacilli spread in the environment [10–12]; thus driving TB epidemic worldwide. The definite diagnosis of active pulmonary TB requires the culture isolation of *Mycobacterium tuberculosis* complex (M. tb) from respiratory

sample [13]. Molecular tests are increasingly used in TB diagnosis, allowing a significant reduction of its delay compared to culture [14–16] and early treatment initiation. The positive predictive value (PPV) of molecular tests directly performed on a specimen is correlated to its expected culture positivity, depending on the local epidemiology of TB [17]. Significant attention must be paid in the choice of the specimen allocated to molecular tests among the multiple ones which are sampled for the diagnosis of pulmonary TB, particularly in a low TB incidence setting such as France since PPV's specimens are expected to be lower than in high TB incidence countries. Multiple sampling [18–20] are provided by a non-invasive procedure like sputum collection eventually after induction [21] or, if necessary, by an invasive procedure such as bronchoscopy or gastric lavages. Post-bronchoscopy sputum specimens have to be collected from all adults with suspected pulmonary TB who undergo bronchoscopy [21,22]. Among per-bronchoscopy sampling procedures, endobronchial ultrasound transbronchial

* Corresponding author.

E-mail address: thomas.maitre5@gmail.com (T. Maitre).

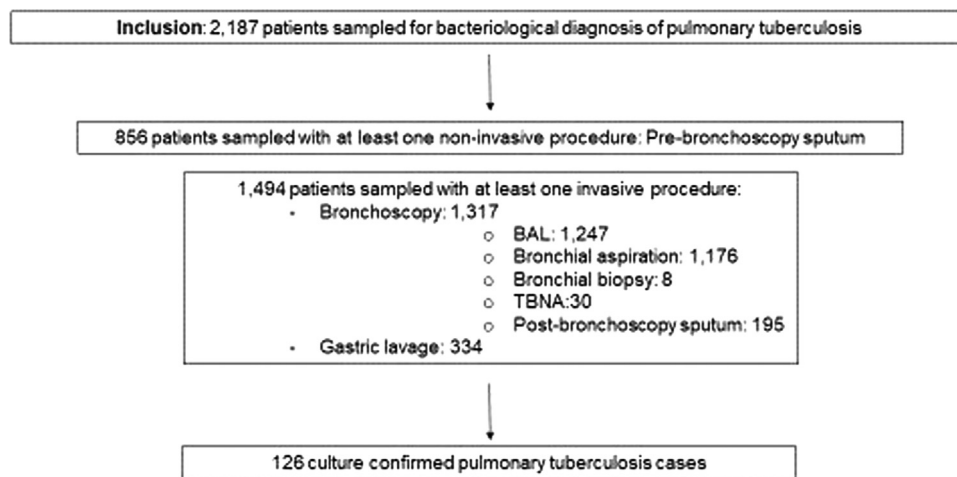


Fig. 1. Flow chart of the study design.

needle aspiration (TBNA) has recently demonstrated interesting safety and sensitivity in *M. tb* isolation in hilar and mediastinal lymphadenopathy [23–29]. A reasoned use of invasive procedures requires knowing the individual profitability of their relative sample in the microbiological diagnosis of TB, compared to non-invasive, inexpensive, and rapid sampling such as sputum with or without induction.

This study aimed to review the bacteriological diagnosis of pulmonary TB and to assess the contribution of invasive procedure to diagnosis, in a real life context.

2. Materials and methods

2.1. Study population

We performed a retrospective cohort study including all patients over 18 years of age who were sampled for bacteriological diagnosis of TB, hospitalized in Pitié-Salpêtrière Hospital (Paris, France), between September 1st, 2014 and May 1st, 2016.

2.2. Specimen

Microbiological results from sputum, gastric lavages, bronchial aspirations, bronchiolo-alveolar lavage (BAL), bronchial biopsies and TBNA were extracted from the laboratory management software GLIMS. Post-bronchoscopy sputum was defined as sputum collected during the three days following a bronchoscopy.

In the pulmonary TB diagnosis approach, multiple sputa were collected in first line. In sputum scarce or when 3 sputa were smear negative, an invasive procedure was performed i.e. bronchoscopy or gastric lavages. When gastric lavage was considered, its place in the local approach was always in first line, i.e. before bronchoscopy. All specimens were categorized as invasive except pre-bronchoscopy sputa which were not collected within the 3 days following bronchoscopy, named pre-bronchoscopy sputa.

2.3. Statistics

The proportions were compared with the bilateral Fisher exact test calculated using GraphPad prism software. All hypotheses were tested at alpha risk of 0.05.

2.4. Molecular test's PPV

The molecular test used was the DX MTB ASSAY (PCR) during the study period. According to local diagnostic strategy set up with the bronchoscopy ward, this test was preferentially done on bronchoscopy specimens. This strategy was supported by the fact that patients undergoing bronchoscopy have by definition smear negative specimens and are at high risk of TB and are evaluated by a small number of doctors that usually have a computed tomography (CT) scan to help them. As a consequence, the doctor performing the bronchoscopy was considered as the best for deciding if a PCR needed to be performed for TB diagnosis. We compared the actual PPV in our population to the theoretical PPV if the PCR had been performed on all bronchial specimens. According to the literature the sensitivity of the DX MTB ASSAY is 58% on smear negative specimens and specificity 99% [30]. The prevalence corresponding to the proportion of culture positivity, the specimens PPV were calculated by the following formula: $PPV = Se \times Prevalence / [Se \times Prevalence + (1 - Prevalence) \times (1 - Sp)]$.

3. Results

3.1. Study population and diagnostic procedure

From September 1st, 2014 to May 1st, 2016, a total of 2187 patients benefited from at least one microbiological sampling for pulmonary TB suspicion and were retrospectively included (Fig. 1). Among invasive procedures, bronchoscopy was performed in 1,317 patients (60.2%). A total of 126 patients (5.8%) had a culture confirmed pulmonary TB. Among them, pre-bronchoscopy sputum was sufficient to diagnose their TB in 80 patients (63.5%), whereas the diagnosis required specimens collected after an invasive procedure for the remaining 46 patients (36.5%), (gastric lavage in 9/46 patients [19.5%], bronchoscopy in 37/46 patients [80.4%]) (Fig. 2). Among these 37 TB patients benefiting from bronchoscopy, the majority had culture positivity from bronchial aspirations 24/37 (64.9%), followed by BAL 6/37 (16.2%), post-bronchoscopy sputum 5/37 (13.5%) and TBNA 2/37 (5.4%).

Among patients who had *M. tb* positive culture from bronchial ($n=1$) or TBNA ($n=4$) biopsies, these invasive samples were the only ones allowing the diagnosis in 0.0% and 50.0% of patients, respectively.

In the 99 patients with at least one culture positive sputum, more than one sputum collection was necessary to diagnose TB in 28.3% and more than 3 in 10.1% (Table 1).

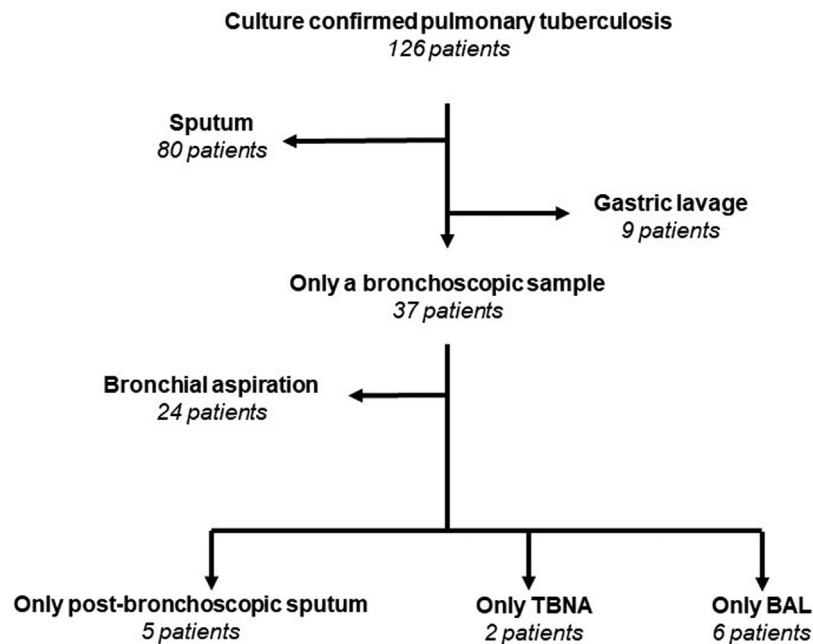


Fig. 2. Distribution of *M. tuberculosis* complex positive culture specimens leading to 126 pulmonary tuberculosis diagnoses: BAL: bronchiolo-alveolar lavage; TBNA: transbronchial needle aspiration.

Table 1
Individual sputum contribution in the microbiological diagnosis of tuberculosis.

Sputum	Patients with at least one culture positive sputum	The first is sufficient	The second is necessary	The third is necessary	More than 3 are necessary
All	99	71 (71.7%)	12 (12.1%)	6 (6.1%)	10 (10.1%)
Pre-bronchoscopy	81	61 (75.3%)	6 (7.4%)	5 (6.2%)	9 (11.1%)
Post-bronchoscopy	18	10 (55.6%)	6 (33.1%)	1 (5.6%)	1 (5.6%)

Table 2
Bacteriological results of the 6,267 specimens collected from September 1st, 2014 to May 1st, 2016 in patients with suspicion of pulmonary TB.

Type of specimens	n	<i>M. tuberculosis</i> culture-positive samples n (%) ^a	Smear-positive samples n (%) ^a
All sputum	2591	222 (8.6%)	136 (5.2%)
Pre-bronchoscopy sputum	2018	169 (8.4%)	104 (5.1%)
Post-bronchoscopy sputum	573	53 (9.2%)	32 (5.6%)
Gastric lavage	848	41 (4.8%)	24 (2.8%)
Bronchial aspiration	1358	42 (3.1%)	4 (0.3%)
BAL	1433	33 (2.3%)	7 (0.5%)
TBNA	30	4 (13.3%)	1 (3.3%)
Bronchial biopsy	7	1 (14.3%)	0 (0.0%)
Total	6267	343	172

BAL: bronchiolo-alveolar lavage; TBNA: transbronchial needle aspiration.

^a Percentage among the type of sample

3.2. Specimen's smear and culture positivity for *Mycobacterium tuberculosis*

A total of 6267 specimens were collected and analysed. Among them, those exhibiting the highest proportion of *M. tb* culture positivity were in decreasing order, bronchial biopsies, TBNA, sputa, gastric lavages, bronchial aspirations, and finally BAL, which exhibited the lowest proportion of culture positivity. The proportion of culture positivity in sputum was higher than (Table 2) in bronchial aspirations (8.6% vs. 3.1% $P < 0.0001$), BAL (8.6% vs. 2.3% $P < 0.0001$) or gastric lavages (8.6% vs. 4.8% $P = 0.0004$). The proportion of culture positivity in TBNA was higher than in bronchial aspirations (13.3% vs. 3.1% $P < 0.0001$) and BAL (13.3% vs. 2.3% $P < 0.0001$), but not compared to sputum (13.3% vs. 8.6% $P = 0.09$).

Specimens exhibiting the highest proportion of smear positivity were in decreasing order, sputa, TBNA, gastric lavage, BAL, bronchial aspiration and finally bronchial biopsies (Table 2). The smear positivity was higher in sputum than in gastric lavage (5.2% vs. 2.8% $P = 0.007$), bronchial aspirations (5.2% vs. 0.3% $P < 0.0001$) and BAL (5.2% vs. 0.5% $P < 0.0001$). The smear positivity in TBNA was higher than in bronchial aspirations (3.3% vs. 0.3% $P < 0.0001$), and BAL (3.3% vs. 0.5% $P < 0.0001$).

3.3. Theoretical and actual PPV values of molecular test directly performed on smear negative bronchial aspirations

PCR was proposed on smear negative bronchial aspirations of patients with a high suspicion of pulmonary tuberculosis as

Table 3
Proportion of culture positivity theoretical and actual PPV of molecular tests directly performed on smear negative bronchial aspirations.

Smear negative bronchial aspirations	
Specimens: n	1,354
Culture positivity: n (%)	38 (2.8%)
Expected PPV ^a : %	70.0%
PCR performed: n (%)	624 (46.1%)
Observed PPV: %	88.9%

PPV: positive predictive value.

^a According to [30].

assessed by the bronchoscopist based on the analysis of the clinical file and the CT-scan of the patient. This selection retained 46% of all bronchial aspirations for PCR (627/1354). Among those, the proportion of culture positivity was significantly higher than among those not retained for molecular testing (4.62% vs 1.64%, $P=0.002$). Consequently, the positive predictive value (PPV) of molecular testing was high (88.9%) to be compared with a 70% theoretical PPV if molecular testing had been performed on all bronchial aspirations without the selection performed by the bronchoscopist (Table 3).

4. Discussion

We present a large overview of the global interest of the different type of specimens in the bacteriological diagnosis of pulmonary TB. This study was performed in a reference hospital located in a TB hot spot region of France [3–7], permitting an overview of more than 6000 specimens collected in a low TB incidence country. Globally, the specimen showing the main utility in pulmonary TB diagnosis is sputum in both culture and smear positivity; the multiple collection of this specimen appeared sufficient to confirm the diagnosis in two-thirds of patients. As in other studies [18,19], we showed a particular interest to collect multiple sputum to increase diagnosis accuracy. In the last third, only 20% obtained their diagnosis by gastric lavages whereas the others required specimens sampled during or after bronchoscopy. Among the different samples categorized as invasive in this study, post-bronchoscopy sputum which is the easiest to sample should be systematically realized just after or the day after the bronchoscopy and simply repeated, showed, in this study, a particular interest with a high proportion of culture and smear positivity.

These excellent diagnostic performances of sputa were obtained in our centre without having optimized the pre-analytical procedures. Some interventions have demonstrated that the sensitivity of sputa can be further increased. A particular attention should be paid to the sputum quality and quantity [21,31]. Notably, a sputum volume over 4 [32] or 5 mL [33] increases significantly smear positivity. In a recent study, Datta et al. showed that two simple interventions increased the diagnosis performance of microbiological testing. Pooling of sputum samples collected over a period of several hours increased the diagnosis performance of smear microscopy 1.6 times and of culture 1.7 times, compared with collection of a single time point or spot samples and the delivery of standardized instruction before the provision of sputum samples increased the performance of smear microscopy 1.4 times compared to the standard of care [34].

We suggest that gastric lavage should be avoided in practice since: (i) this invasive procedure is particularly uncomfortable; (ii) it has to be repeated on several mornings; and (iii) it rarely permits to avoid bronchoscopy [35] (only 20% of our TB patients). Moreover, whereas bronchoscopy allows diagnosing several different diseases, gastric lavages are limited to TB. Since the

superiority of bronchoscopy compared to multiple gastric lavages is also supported by other studies [35,36], we suggest to perform bronchoscopy immediately after three smear negative sputa. In this relatively infrequent situation when bronchoscopy is necessary, we advise to collect widely all available specimens in order to benefit the most from invasive procedure utility in pulmonary TB diagnosis. Neither TBNA nor BAL collections worsen respiratory failure compared to patients receiving bronchoscopy without these samplings [24,37]. Nonetheless, contrary to BAL, TBNA procedure should be limited to patients with mediastinal or hilar lymphadenopathy visible in thoracic CT-scan and accessible to endo-bronchial ultrasound-guided (EBUS) TBNA. In this last situation, TBNA provides valuable support in the diagnosis of pulmonary TB [23–29], particularly in necrotic lymph nodes [29,38] and when ultrasound findings reveal clear boundaries and calcifications [28]. Above all, post-bronchoscopy sputum should be systematically collected after bronchoscopy each time BAL is performed, in view of its utility highlighted in our study and in others [39,40], to benefit to the full extent of the bronchoscopy.

Molecular tests are increasingly used in TB diagnosis, allowing a significant reduction of delay compared to culture [14–16]. Their main utility is in smear negative specimens which correspond to the most difficult to diagnose TB cases. However, the PPV of molecular testing is limited in this situation by the very small proportion of true positives, i.e. culture positive specimens. To help physician pre-test scores would be useful. Such scores have mainly been assessed in extra-pulmonary TB since molecular diagnosis accuracy is particularly affected by their low bacillary load. The utility of this type of score was confirmed repeatedly in TB meningitis (TBM) [41,42], and was recently included in a consensual TBM diagnosis classification [43]. An equivalent score would also be helpful for pulmonary TB; it could be based on those validated to determine the need of early respiratory isolation before *M. tb* isolation [44,45]. In this study rather than using a score, we decided to rely on a small team of trained clinicians, the bronchoscopy team. The advantage of this organization is that this small team it is trained for difficult diagnoses and that they usually have extensive imaging. This organization reduced by approximately 50% the number of bronchial aspirations to be submitted for molecular testing and increased its PPV from 70 to 89%. On the other hand, this reduction missed 29% of culture positive bronchial aspirations (12/41) that could have been diagnosed earlier if they had been subjected to molecular testing. In conclusion, regarding molecular test's contribution to TB diagnosis, we propose that until a validated score is available, the indication of molecular testing relies on a small team having expertise and complete medical and radiological information such as the bronchoscopy team in our hospital.

Our study was limited by the lack of clinical and radiological detailed information, which did not allow us to grade the pre-test probability of pulmonary TB. Notably, the diagnosis accuracy of biopsies was hard to assess since, contrary to BAL or bronchial aspirations, which were systematically performed during bronchoscopy, they were sampled only in specific patients with radiologic or macroscopic arguments for accessible lymphadenopathy or bronchial TB involvements. This real life study is naturally limited by the fact that diagnosis procedure was not prospectively controlled even if included patient's diagnosis followed the same approach. An explanation of the sputum highest accuracy in TB diagnosis could be that sputum was used for the easiest to diagnose cases that harbour the highest bacillary loads. Nonetheless, we confirmed the importance of post-bronchoscopy sputa whereas in our study those patients had pauci-bacillary TB.

5. Conclusion

This study confirms the higher accuracy of sputum in the microbiological diagnosis of pulmonary TB compared to invasive specimens in our context of low TB incidence. Based on our data, we suggest collecting sputum consistently, and then if both smear and molecular test remain negative, bronchoscopy should be proposed not forgetting post-bronchoscopy sputa. Molecular testing can be performed following indication by the bronchoscopist.

Funding

Thomas Maitre received financial support by INSERM under the programme « *poste accueil INSERM* » and from Fondation du Souffle under the programme « *Formation pour la recherche 2020* ».

Disclosure of interest

The authors declare that they have no competing interest.

References

- [1] World Health Organization. Global tuberculosis report. Geneva; 2019. p. 27–73.
- [2] Story A, Antoine D. Éditorial. Tuberculose et inégalités de santé. *Bull Epidemiol Hebd* 2020;194–5.
- [3] Pierre-Audigier C, Talla C, Alame-Emane A-K, Audigier B, Grall N, Ruimy R, et al. Tuberculosis trends in a hot-spot region in Paris, France. *Int J Tuberc Lung Dis* 2020;24:428–35. <http://dx.doi.org/10.5588/ijtld.19.0305>.
- [4] Nienhaus A, Garipey P-K, Trouve C, Lhaumet C, Toureau J, Peters C. Tuberculosis screening at the Sainte-Anne Hospital in Paris – results of first and second IGRA. *J Occup Med Toxicol* 2014;9:1–5. <http://dx.doi.org/10.1186/1745-6673-9-24>.
- [5] Lanoix J-P, Gaudry S, Flicoteaux R, Ruimy R, Wolff M. Tuberculosis in the intensive care unit: a descriptive analysis in a low-burden country. *Int J Tuberc Lung Dis* 2014;18:581–7. <http://dx.doi.org/10.5588/ijtld.13.0901>.
- [6] Bernard C, Sougakoff W, Fournier A, Larnaudie S, Antoun F, Robert J, et al. Impact of a 14-year screening programme on tuberculosis transmission among the homeless in Paris. *Int J Tuberc Lung Dis* 2012;16:649–55. <http://dx.doi.org/10.5588/ijtld.11.0241>.
- [7] Valade S, Raskine L, Aout M, Malissin I, Brun P, Deye N, et al. Tuberculosis in the intensive care unit: a retrospective descriptive cohort study with determination of a predictive fatality score. *Can J Infect Dis Med Microbiol* 2012;23:173–8.
- [8] Gehanno J-F, Abiteboul D, Rollin L. Incidence of tuberculosis among nurses and healthcare assistants in France. *Occup Med Oxf Engl* 2017;67:58–60. <http://dx.doi.org/10.1093/occmed/kqw138>.
- [9] Kang W, Yu J, Du J, Yang S, Chen H, Liu J, et al. The epidemiology of extrapulmonary tuberculosis in China: a large-scale multi-center observational study. *PloS One* 2020;15:e0237753. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0237753>.
- [10] Urbanowski ME, Ordonez AA, Ruiz-Bedoya CA, Jain SK, Bishai WR. Cavitary tuberculosis: the gateway of disease transmission. *Lancet Infect Dis* 2020;20:e117–28. [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30148-1](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30148-1).
- [11] Martinez L, Verma R, Croda J, Horsburgh CR, Walter KS, Degner N, et al. Detection, survival and infectious potential of Mycobacterium tuberculosis in the environment: a review of the evidence and epidemiological implications. *Eur Respir J* 2019;53. <http://dx.doi.org/10.1183/13993003.02302-2018>.
- [12] Donald PR, Diacon AH, Lange C, Demers A-M, von Groote-Bidlingmaier F, Nardell E. Droplets, dust and guinea pigs: an historical review of tuberculosis transmission research, 1878–1940. *Int J Tuberc Lung Dis* 2018;22:972–82. <http://dx.doi.org/10.5588/ijtld.18.0173>.
- [13] Schoch OD, Rieder P, Tueller C, Altpeter E, Zellweger J-P, Rieder HL, et al. Diagnostic yield of sputum, induced sputum, and bronchoscopy after radiologic tuberculosis screening. *Am J Respir Crit Care Med* 2007;175:80–6. <http://dx.doi.org/10.1164/rccm.200608-1092OC>.
- [14] Boehme CC, Nabeta P, Hillemann D, Nicol MP, Shenai S, Krapp F, et al. Rapid molecular detection of tuberculosis and rifampin resistance. *N Engl J Med* 2010;363:1005–15. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa0907847>.
- [15] Seki M, Kim C-K, Hayakawa S, Mitarai S. Recent advances in tuberculosis diagnostics in resource-limited settings. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2018;37:1405–10. <http://dx.doi.org/10.1007/s10096-018-3258-y>.
- [16] McNerney R, Zumla A. Impact of the Xpert MTB/RIF diagnostic test for tuberculosis in countries with a high burden of disease. *Curr Opin Pulm Med* 2015;21:304–8. <http://dx.doi.org/10.1097/MCP.000000000000161>.
- [17] Pham T-T, Schrenzel J, Janssens J-P, Emonet S. Performances and usefulness of Xpert MTB/RIF assay in low-incidence settings: not that bad? *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2020. <http://dx.doi.org/10.1007/s10096-020-03887-8>.
- [18] Nelson SM, Deike MA, Cartwright CP. Value of examining multiple sputum specimens in the diagnosis of pulmonary tuberculosis. *J Clin Microbiol* 1998;36:467–9.
- [19] Mase SR, Ramsay A, Ng V, Henry M, Hopewell PC, Cunningham J, et al. Yield of serial sputum specimen examinations in the diagnosis of pulmonary tuberculosis: a systematic review. *Int J Tuberc Lung Dis* 2007;11:485–95.
- [20] Yoo H, Song J-U, Koh W-J, Jeon K, Um S-W, Suh GY, et al. Additional role of second washing specimen obtained during single bronchoscopy session in diagnosis of pulmonary tuberculosis. *BMC Infect Dis* 2013;13:404. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2334-13-404>.
- [21] Lewinsohn DM, Leonard MK, LoBue PA, Cohn DL, Daley CL, Desmond E, et al. Official American Thoracic Society/Infectious Diseases Society of America/Centers for Disease Control and Prevention Clinical Practice Guidelines: diagnosis of tuberculosis in adults and children. *Clin Infect Dis* 2017;64:e1–33. <http://dx.doi.org/10.1093/cid/ciw694>.
- [22] Forbes BA, Hall GS, Miller MB, Novak SM, Rowlinson M-C, Salfinger M, et al. Practical guidance for clinical microbiology laboratories: mycobacteria. *Clin Microbiol Rev* 2018;31. <http://dx.doi.org/10.1128/CMR.00038-17>.
- [23] Geake J, Hammerschlag G, Nguyen P, Wallbridge P, Jenkin GA, Korman TM, et al. Utility of EBUS-TBNA for diagnosis of mediastinal tuberculous lymphadenitis: a multicentre Australian experience. *J Thorac Dis* 2015;7:439–48. <http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2072-1439.2015.01.33>.
- [24] Navani N, Molyneaux PL, Breen RA, Connell DW, Jepson A, Nankivell M, et al. Utility of endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle aspiration in patients with tuberculous intrathoracic lymphadenopathy: a multicentre study. *Thorax* 2011;66:889–93. <http://dx.doi.org/10.1136/thoraxjnl-2011-200063>.
- [25] Kanda H, Uchimura K, Hara S, Sakakibara H, Morimoto T, Shigemitsu S, et al. A retrospective study of Endobronchial Ultrasound-guided Transbronchial Needle Aspiration (EBUS-TBNA) performed on tuberculous lymphadenitis cases. *J UOEH* 2020;42:223–7. <http://dx.doi.org/10.7888/juoe.42.223>.
- [26] Ko R-E, Jeong B-H, Chon HR, Huh HJ, Han J, Lee H, et al. Clinical usefulness of routine AFB culture and MTB PCR of EBUS-TBNA needle rinse fluid. *Respirology* 2019;24:667–74. <http://dx.doi.org/10.1111/resp.13488>.
- [27] Sun J, Teng J, Yang H, Li Z, Zhang J, Zhao H, et al. Endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle aspiration in diagnosing intrathoracic tuberculosis. *Ann Thorac Surg* 2013;96:2021–7. <http://dx.doi.org/10.1016/j.athoracsur.2013.07.005>.
- [28] Yang J, Du Z. Comparison of clinical and pathological features of lymph node tuberculosis and histiocytic necrotizing lymphadenitis. *J Infect Dev Ctries* 2019;13:706–13. <http://dx.doi.org/10.3855/jidc.10860>.
- [29] Lin C-K, Keng L-T, Lim C-K, Lin Y-T, Lin S-Y, Chen L-Y, et al. Diagnosis of mediastinal tuberculous lymphadenitis using endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle aspiration with rinse fluid polymerase chain reaction. *J Formos Med Assoc* 2020;119:509–15. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfma.2019.07.014>.
- [30] BIORAD. DX MTB ASSAY test procedure. Direct detection of Mycobacterium tuberculosis complex by real-time PCR. Marnes-La-Coquette; 2013. p. 1–11. <http://dx.doi.org/10.4000/books.septentrion.19822>.
- [31] Ho J, Marks GB, Fox GJ. The impact of sputum quality on tuberculosis diagnosis: a systematic review. *Int J Tuberc Lung Dis* 2015;19:537–44. <http://dx.doi.org/10.5588/ijtld.14.0798>.
- [32] Yoon SH, Lee NK, Yim JJ. Impact of sputum gross appearance and volume on smear positivity of pulmonary tuberculosis: a prospective cohort study. *BMC Infect Dis* 2012;12:172. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2334-12-172>.
- [33] Fisher M, Dolby T, Surtie S, Omar G, Hapeela N, Basu D, et al. Improved method for collection of sputum for tuberculosis testing to ensure adequate sample volumes for molecular diagnostic testing. *J Microbiol Methods* 2017;135:35–40. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2017.01.011>.
- [34] Datta S, Shah L, Gilman RH, Evans CA. Comparison of sputum collection methods for tuberculosis diagnosis: a systematic review and pairwise and network meta-analysis. *Lancet Glob Health* 2017;5:e760–71. [http://dx.doi.org/10.1016/S2214-109X\(17\)30201-2](http://dx.doi.org/10.1016/S2214-109X(17)30201-2).
- [35] Dickson SJ, Brent A, Davidson RN, Wall R. Comparison of bronchoscopy and gastric washings in the investigation of smear-negative pulmonary tuberculosis. *Clin Infect Dis* 2003;37:1649–53. <http://dx.doi.org/10.1086/379716>.
- [36] Rizvi N, Rao NA, Hussain M. Yield of gastric lavage and bronchial wash in pulmonary tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis* 2000;4:147–51.
- [37] Cracco C, Fartoukh M, Prodanovic H, Azoulay E, Chenivresse C, Lorut C, et al. Safety of performing fiberoptic bronchoscopy in critically ill hypoxic patients with acute respiratory failure. *Intensive Care Med* 2013;39:45–52. <http://dx.doi.org/10.1007/s00134-012-2687-9>.
- [38] Rodriguez-Takeuchi SY, Renjifo ME, Medina FJ. Extrapulmonary tuberculosis: pathophysiology and imaging findings. *Radiographics* 2019;39:2023–37. <http://dx.doi.org/10.1148/rg.2019190109>.
- [39] George PM, Mehta M, Dhariwal J, Singanayagam A, Raphael CE, Salmasi M, et al. Post-bronchoscopy sputum: improving the diagnostic yield in smear negative pulmonary TB. *Respir Med* 2011;105:1726–31. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rmed.2011.07.014>.
- [40] Malekmohammad M, Marjani M, Tabarsi P, Baghaei P, Sadr Z, Naghan PA, et al. Diagnostic yield of post-bronchoscopy sputum smear in pulmonary tuberculosis. *Scand J Infect Dis* 2012;44:369–73. <http://dx.doi.org/10.3109/00365548.2011.643820>.
- [41] Patel VB, Theron G, Lenders L, Matinyena B, Connolly C, Singh R, et al. Diagnostic accuracy of quantitative PCR (Xpert MTB/RIF) for tuberculous meningitis in a high burden setting: a prospective study. *PLOS Med* 2013;10:e1001536. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pmed.1001536>.
- [42] Anselmo LMP, Feliciano C, Mauad F, do Nascimento MP, Pocente RC, Silva JM, et al. A predictive score followed by nucleic acid amplification for adult tuber-

- culous meningitis diagnosis in Southern Brazil. *J Neurol Sci* 2017;379:253–8, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jns.2017.06.016>.
- [43] Marais BJ, Heemskerk AD, Marais SS, van Crevel R, Rohlwink U, Caws M, et al. Standardized methods for enhanced quality and comparability of tuberculous meningitis studies. *Clin Infect Dis* 2017;64:501–9, <http://dx.doi.org/10.1093/cid/ciw757>.
- [44] Delory T, Ferrand H, Grall N, Casalino E, Lafarge M, Melot B, et al. Score for pulmonary tuberculosis in patients with clinical presumption of tuberculosis in a low-prevalence area. *Int J Tuberc Lung Dis* 2017;21:1272–9, <http://dx.doi.org/10.5588/ijtld.17.0353>.
- [45] Pinto LM, Pai M, Dheda K, Schwartzman K, Menzies D, Steingart KR. Scoring systems using chest radiographic features for the diagnosis of pulmonary tuberculosis in adults: a systematic review. *Eur Respir J* 2013;42:480–94, <http://dx.doi.org/10.1183/09031936.00107412>.



Impact of the revised definition of extensively drug-resistant tuberculosis

Copyright ©The authors 2021. For reproduction rights and permissions contact permissions@ersnet.org

Received: 2 March 2021
Accepted: 6 April 2021

To the Editor:

Recently, the World Health Organization (WHO) has released a revised definition of extensively drug-resistant (XDR) tuberculosis (TB) that should be used for clinical and surveillance purposes starting from 1 January, 2021 [1, 2]. The previous definition of XDR-TB was TB that is resistant to any fluoroquinolone (levofloxacin and/or moxifloxacin) and to at least one of three second-line injectable drugs (SLIs: capreomycin, kanamycin and amikacin), in addition to multidrug resistance. The revised definition is: TB caused by *Mycobacterium tuberculosis* strains that fulfil the definition of MDR/RR-TB and which are also resistant to any fluoroquinolone and at least one additional group A drug. WHO group A drugs currently include fluoroquinolones (levofloxacin or moxifloxacin), linezolid and bedaquiline. In addition, pre-XDR-TB is now a WHO-endorsed definition, identified as MDR/RR-TB with any fluoroquinolone resistance. Although the previous definition of XDR-TB has proved to be predictive of poor treatment outcome [3], the 2020 update appears in line with recent changes of treatment regimens given, *i.e.* less frequent use of SLI in favour of the potent oral drugs, bedaquiline and linezolid. Moreover, a large meta-analysis failed to show an association between mortality reduction and SLI use, whereas this association was shown for bedaquiline and linezolid [4]. In this study, we aimed to measure retrospectively the impact of the revised definition on the epidemiology of XDR-TB in France.

The French National Reference Centre of Mycobacteria (CNR-MyRMA, Paris, France) receives the MDR-TB strains of each new MDR-TB case identified in France and performs complete phenotypic drug susceptibility testing (DST) using the proportion method. Linezolid (1 mg·L⁻¹) and ofloxacin (2 mg·L⁻¹ formerly, currently transitioning to moxifloxacin following WHO recommendations) are tested in Lowenstein–Jensen medium, and bedaquiline (0.25 mg·L⁻¹) is routinely tested in 7H11. CNR-MyRMA has received certification for second-line proficiency testing by the European Reference Laboratory Network for TB during this period. We retrospectively re-analysed phenotypic DST results of all MDR-TB strains received by CNR-MyRMA between 1 January, 2017 and 31 December, 2020. Anonymised data were retrieved from the CNR-MyRMA database. Rates of drug-resistant strains according to old and revised definitions were calculated, and 95% confidence intervals were provided. Data analysis was performed using Stata software version 15.0 (StataCorp). According to French regulations at the time of study commencement and in accordance with the ethical standards of our hospitals' institutional review boards (Committee for the Protection of Human Subjects), informed consent was not sought because this observational study did not modify existing diagnostic or therapeutic strategies, and is focused on strain drug susceptibility without collection of patient data.

Overall, the total number of XDR strains over these 4 years was 37 according to the old definition, compared to six with the revised definition (table 1). As a consequence, the percentage of XDR strains among all MDR strains decreased from 12.6% (95% CI 9.0–16.9%) according to the old definition, to 2.0% (95% CI 0.7–4.4%) according to the revised definition. All six strains classified XDR according to the revised definition were also classified XDR according to the old definition. Overall, in the same period, 57 strains (19.4%, 95% CI 15.0–24.4%) with resistance to any fluoroquinolone were identified. Among these, 51 strains (17.4%, 95% CI 13.2–22.2%) would be classified as pre-XDR-TB according to the revised definition. Among the six XDR strains identified according to the revised definition, two were resistant to both linezolid and bedaquiline, *i.e.* resistant to all three WHO group A drugs, representing as such the most difficult to treat cases with currently available drugs. Interestingly, among strains resistant to

Shareable abstract (@ERSpublications)

The revised WHO definition of XDR-TB decreases the number of TB cases classified as such, and allows better focus on the most difficult to treat cases of TB <https://bit.ly/3tgaXQA>

Cite this article as: Veziris N, Bonnet I, Morel F, *et al.* Impact of the revised definition of extensively drug-resistant tuberculosis. *Eur Respir J* 2021; 58: 2100641 [DOI: 10.1183/13993003.00641-2021].



TABLE 1 Number of *Mycobacterium tuberculosis* strains classified as multidrug-resistant (MDR), MDR with additional fluoroquinolone resistance (MDR, FQ-R), and extensively drug-resistant (XDR), according to old and revised definitions, in France between 2017 and 2020

	2017	2018	2019	2020	Total (95% CI)
MDR	79	80	69	66	294
MDR, FQ-S BDQ-S and LNZ-S	78	79	69	66	
MDR, FQ-S BDQ-R and LNZ-S	0	0	0	0	0
MDR, FQ-S BDQ-S and LNZ-R	1	1	0	0	2
MDR, FQ-S BDQ-R and LNZ-R	0	0	0	0	0
MDR, FQ-R[#]	14 (17.7%)	20 (25%)	13 (18.8%)	10 (14.5%)	57, 19.4% (15.0–24.4%)
XDR, old definition	10 (12.6%)	11 (13.8%)	10 (14.5%)	6 (9.1%)	37, 12.6% (9.0–16.9%)
XDR, revised definition	3 (3.8%)	2 (2.5%)	1 (1.5%)	0 (0%)	6, 2.0% (0.7–4.4%)
XDR, revised definition BDQ-R and LNZ-S	1	1	0	0	2
XDR, revised definition BDQ-S and LNZ-R	1	0	1	0	2
XDR, revised definition BDQ-R and LNZ-R	1	1	0	0	2

[#]: pre-XDR-TB according to revised World Health Organization definition. BDQ: bedaquiline; LNZ: linezolid; R: resistant; S: susceptible.

either bedaquiline, linezolid, or both, the majority (6/8) were also fluoroquinolone-resistant (and thus classified as XDR). Overall, the low percentage of MDR strains with additional resistance to bedaquiline and/or linezolid in France is reassuring.

According to the results of our study, the revised definition will dramatically reduce the number of cases of TB classified as XDR in France. It will likely be also the case in many other countries in western Europe. One possible limit of the revised definition is represented by technical challenges and limited availability of DST capacity worldwide for detection of bedaquiline and linezolid resistance. The phenotypic DST is performed at the CNR-MyRMA with in-house prepared media requiring a high workload and skilled technicians. An alternative is a recently developed 14-drug microtiter plate containing both bedaquiline and linezolid [5]. However, this will still require BSL-3 containment. To the best of our knowledge, the only currently available commercial genotypic tests is Deeplex®, a deep-sequencing technique which allows detection of bedaquiline (only *rv0678*) and linezolid resistance [6]. Thus, even in areas where MDR-TB strains with linezolid and bedaquiline resistance are more frequent, such strains may not be detected due to lack of DST availability. National programmes should urgently implement DST for bedaquiline and linezolid in order to avoid a false disappearance of XDR-TB. Additionally, in France, XDR strain handling is subject to specific authorisations from a national agency (ANSM): the revised definition would reduce by 80% the number of strains that have been concerned by this regulation since 2017.

In our study, all the strains classified as XDR according to the revised definition were also classified as XDR according to the old definition. This finding confirms that the revised definition focuses on the subset of the previous XDR cases that includes the most difficult to treat patients.

In 2020, WHO has released an update on the treatment of drug-resistant TB [7]. According to this document the Nix-TB regimen, including bedaquiline, pretomanid and linezolid, may be used for XDR-TB under operational research conditions [8]. Given the multiple reports on the rising frequency of primary bedaquiline resistance [9], national programmes should, as mentioned in the report, be clearly encouraged to screen for bedaquiline resistance and not only rely on lack of previous bedaquiline treatment. We suggest that inclusion criteria for such operational research should include baseline DST for all three drugs of the BPaL regimen.

In conclusion, the revised definition reduces the number of cases classified as XDR in France and will likely allow to better focus on the most relevant TB cases that deserve reporting and surveillance, *i.e.* on the most difficult to treat cases of TB. National programmes should urgently implement DST for bedaquiline and linezolid. In the meantime, fluoroquinolone resistance, which can be detected by rapid genotypic tests endorsed by the WHO, should be used to detect pre-XDR-TB and to guide therapeutic decisions by clinicians [10].

Nicolas Veziris¹, Isabelle Bonnet², Florence Morel², Lorenzo Guglielmetti², Thomas Maitre³, Laure Fournier Le Ray³, Wladimir Sougakoff², Jérôme Robert² and Alexandra Aubry², on behalf of the CNR MyRMA⁴

¹Centre d'Immunologie et des Maladies Infectieuses (Cimi-Paris), UMR 1135, Département de Bactériologie, Hôpital Saint-Antoine, Centre National de Référence des Mycobactéries, APHP, Sorbonne Université, Sorbonne Université, Paris, France. ²Centre d'Immunologie et des Maladies Infectieuses (Cimi-Paris), UMR 1135, Laboratoire de Bactériologie-Hygiène, Hôpital Pitié-Salpêtrière, Centre National de Référence des Mycobactéries, APHP, Sorbonne Université, Sorbonne Université, Paris, France. ³Centre d'Immunologie et des Maladies Infectieuses (Cimi-Paris), UMR 1135, Sorbonne Université, Paris, France. ⁴Members of the CNR-MyRMA (French National Reference Center for Mycobacteria) are listed in the acknowledgements.

Corresponding author: Nicolas Veziris (nicolas.veziris@sorbonne-universite.fr)

Acknowledgements: We thank all technicians working at the CNR-MyRMA for their dedication to their work.

Members of the CNR-MyRMA (French National Reference Center for Mycobacteria) are Emmanuelle Cambau, Faiza Mougari and Vichita Ok.

Conflict of interest: N. Veziris reports that the national reference centre receives an annual grant from Santé Publique France; that the laboratory in which the authors work has received a research grant from Janssen for a study on bedaquiline. I. Bonnet reports that the national reference centre receives an annual grant from Santé Publique France; that the laboratory in which the authors work has received a research grant from Janssen for a study on bedaquiline. F. Morel reports that the national reference centre receives an annual grant from Santé Publique France; that the laboratory in which the authors work has received a research grant from Janssen for a study on bedaquiline. L. Guglielmetti reports that the national reference centre receives an annual grant from Santé Publique France; that the laboratory in which the authors work has received a research grant from Janssen for a study on bedaquiline. T. Maitre reports that the national reference centre receives an annual grant from Santé Publique France; that the laboratory in which the authors work has received a research grant from Janssen for a study on bedaquiline. L. Fournier Le Ray reports that the national reference centre receives an annual grant from Santé Publique France; that the laboratory in which the authors work has received a research grant from Janssen for a study on bedaquiline. W. Sougakoff reports that the national reference centre receives an annual grant from Santé Publique France; that the laboratory in which the authors work has received a research grant from Janssen for a study on bedaquiline. J. Robert reports that the national reference centre receives an annual grant from Santé Publique France; that the laboratory in which the authors work has received a research grant from Janssen for a study on bedaquiline. A. Aubry reports that the national reference centre receives an annual grant from Santé Publique France; that the laboratory in which the authors work has received a research grant from Janssen for a study on bedaquiline.

Support statement: CNR-MyRMA is supported by an annual grant from Santé Publique France. Funding information for this article has been deposited with the Crossref Funder Registry.

References

- 1 World Health Organization. WHO Announces Updated Definitions of Extensively Drug-resistant Tuberculosis. www.who.int/news/item/27-01-2021-who-announces-updated-definitions-of-extensively-drug-resistant-tuberculosis Date last accessed: 5 Feb 2021. Date last updated: 27 Jan 2021.
- 2 Viney K, Linh NN, Gegia M, *et al*. New definitions of pre-extensively and extensively drug-resistant tuberculosis: update from the World Health Organization. *Eur Respir J* 2021; 57: 2100361.
- 3 Kim DH, Kim HJ, Park SK, *et al*. Treatment outcomes and survival based on drug resistance patterns in multidrug-resistant tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2010; 182: 113–119.
- 4 Collaborative Group for the Meta-Analysis of Individual Patient Data in MDR-TB treatment–2017, Ahmad N, Ahuja SD, *et al*. Treatment correlates of successful outcomes in pulmonary multidrug-resistant tuberculosis: an individual patient data meta-analysis. *Lancet* 2018; 392: 821–834.
- 5 Rancoita PMV, Cugnata F, Gibertoni Cruz AL, *et al*. Validating a 14-drug microtiter plate containing bedaquiline and delamanid for large-scale research susceptibility testing of mycobacterium tuberculosis. *Antimicrob Agents Chemother* 2018; 62: e00344-18.
- 6 Jouet A, Gaudin C, Badalato N, *et al*. Deep amplicon sequencing for culture-free prediction of susceptibility or resistance to 13 anti-tuberculous drugs. *Eur Respir J* 2021; 57: 2002338.
- 7 Mirzayev F, Viney K, Linh NN, *et al*. World Health Organization recommendations on the treatment of drug-resistant tuberculosis, 2020 update. *Eur Respir J* 2021; 57: 2003300.
- 8 Conradie F, Diacon AH, Ngubane N, *et al*. Treatment of highly drug-resistant pulmonary tuberculosis. *N Engl J Med* 2020; 382: 893–902.

- 9 Andres S, Merker M, Heyckendorf J, *et al.* Bedaquiline-resistant tuberculosis: dark clouds on the horizon. *Am J Respir Crit Care Med* 2020; 201: 1564–1568.
- 10 World Health Organization; The Stop TB Department. Policy Guidance on Drug-susceptibility Testing (DST) of Second-line Antituberculosis Drugs. Geneva, WHO, 2020. Available from: <https://www.who.int/publications/item/WHO-HTM-TB-2008.392>

***atpE* Mutation in *Mycobacterium tuberculosis* Not Always Predictive of Bedaquiline Treatment Failure**

Laure Fournier Le Ray, Alexandra Aubry, Wladimir Sougakoff, Matthieu Revest, Jérôme Robert, Isabelle Bonnet, Nicolas Veziris, Florence Morel

Author affiliations: Sorbonne Université, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Paris, France (L. Fournier Le Ray, A. Aubry, W. Sougakoff, J. Robert, I. Bonnet, N. Veziris, F. Morel); Hôpital Pitié-Salpêtrière, Assistance Publique–Hôpitaux de Paris, Sorbonne Université, Paris, France (A. Aubry, W. Sougakoff, J. Robert, I. Bonnet, F. Morel); Pontchaillou University Hospital, Rennes, France (M. Revest); Université de Rennes, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Rennes (M. Revest); Hôpital Saint-Antoine, Assistance Publique–Hôpitaux de Paris, Sorbonne Université, Paris (N. Veziris)

DOI: <https://doi.org/10.3201/eid2805.212517>

We report the emergence of an *atpE* mutation in a clinical *Mycobacterium tuberculosis* strain. Genotypic and phenotypic bedaquiline susceptibility testing displayed variable results over time and ultimately were not predictive of treatment outcome. This observation highlights the limits of current genotypic and phenotypic methods for detection of bedaquiline resistance.

Bedaquiline is one of the core drugs used to treat multidrug-resistant (MDR) tuberculosis (TB) and extensively drug-resistant TB (XDR TB) (1). Bedaquiline resistance is now part of the revised definition of XDR TB, and its incidence is rising alarmingly (2,3). Resistance to bedaquiline is mainly caused by mutations in *Rv0678* (*mmpR*), which encodes the repressor of the efflux pump MmpL5–MmpS5, usually leading to low-level resistance (4). Conversely, mutations in *atpE*, which encodes the target of bedaquiline, the c subunit of the ATP synthase, are rarely described in clinical strains (5) and are associated with high increase of MICs (4). Mutations in *pepQ* and *Rv1979c* are also reported, but their effect on bedaquiline susceptibility is unclear. We report a case of an *atpE* mutation in a bedaquiline-resistant clinical strain of *Mycobacterium tuberculosis* and discuss the performances of current methods for susceptibility testing (Appendix, <https://wwwnc.cdc.gov/EID/article/28/5/21-2517-App1.pdf>) and their clinical implications (6).

A 32-year-old man from Georgia received a diagnosis of bilateral cavitary lung MDR TB upon his

arrival in France in January 2020. Three consecutive treatment regimens of bedaquiline and clofazimine had failed. A fourth regimen combining bedaquiline, linezolid, cycloserine, clofazimine, delamanid, and amoxicillin/clavulanate + meropenem was initiated on arrival.

The first isolate from January 2020 (S1) was bedaquiline-resistant with a MIC one dilution above the breakpoint (MIC = 2 mg/L) and clofazimine-susceptible with a MIC close to the breakpoint (MIC = 1 mg/L). We detected 2 deletions (P129fs [15%] and G66fs [54%]) in *Rv0678* (Figure).

At the end of March 2020, cycloserine was withdrawn because of phenotypic resistance, and bedaquiline, which had been stopped 1 month earlier, was resumed; the patient underwent a lobectomy. One month after, sputum microscopic examination and culture were still positive. The second isolate (S2) from April 2020 had an increased bedaquiline MIC (4 mg/L) but clofazimine MIC remained unchanged (1 mg/L). No mutation in *Rv0678* was detected, but we observed an AtpE I66M (63%) substitution (Figure).

Two months later in June, the patient was sputum smear-negative but remained culture positive. Isolate S3 was susceptible to bedaquiline (MIC = 0.5 mg/L) and clofazimine resistant (MIC = 2 mg/L). A deletion was found in *Rv0678* different from those identified in S1: deletion at position 293 (N98fs) (97%), whereas no mutation was identified in *atpE* (Figure). Verapamil and ethionamide were added and amoxicillin-clavulanate + meropenem was stopped. Finally, samples from September 2020 were culture negative, with regression of pulmonary lesions. The outcome was classified as treatment success in February 2021 after 13 months of treatment and was still favorable as of December 2021.

All 3 isolates shared the same spoligotype (SIT1) (Beijing lineage) and displayed only 3 single-nucleotide variants (SNVs) of difference by pairwise comparison. The SNVs were all nonsynonymous. Two SNVs were only recovered in strain S2, 1 corresponding to the AtpE: I66M substitution and 1 located in *Rv0243* (L136P substitution) encoding the acetyl-CoA acyltransferase FadA2 and probably implicated in lipid degradation. One SNV was only found in S1 in *Rv3909* (M683L substitution), encoding a protein of unknown function. No mutations were observed in *pepQ*, its promoter, or in *Rv1979c* (7).

As this case illustrates, identifying bedaquiline resistance in the laboratory and its effects on patient management appear complex. Over a 6-month period, we tested 3 *M. tuberculosis* isolates with different genotypic and phenotypic patterns regarding

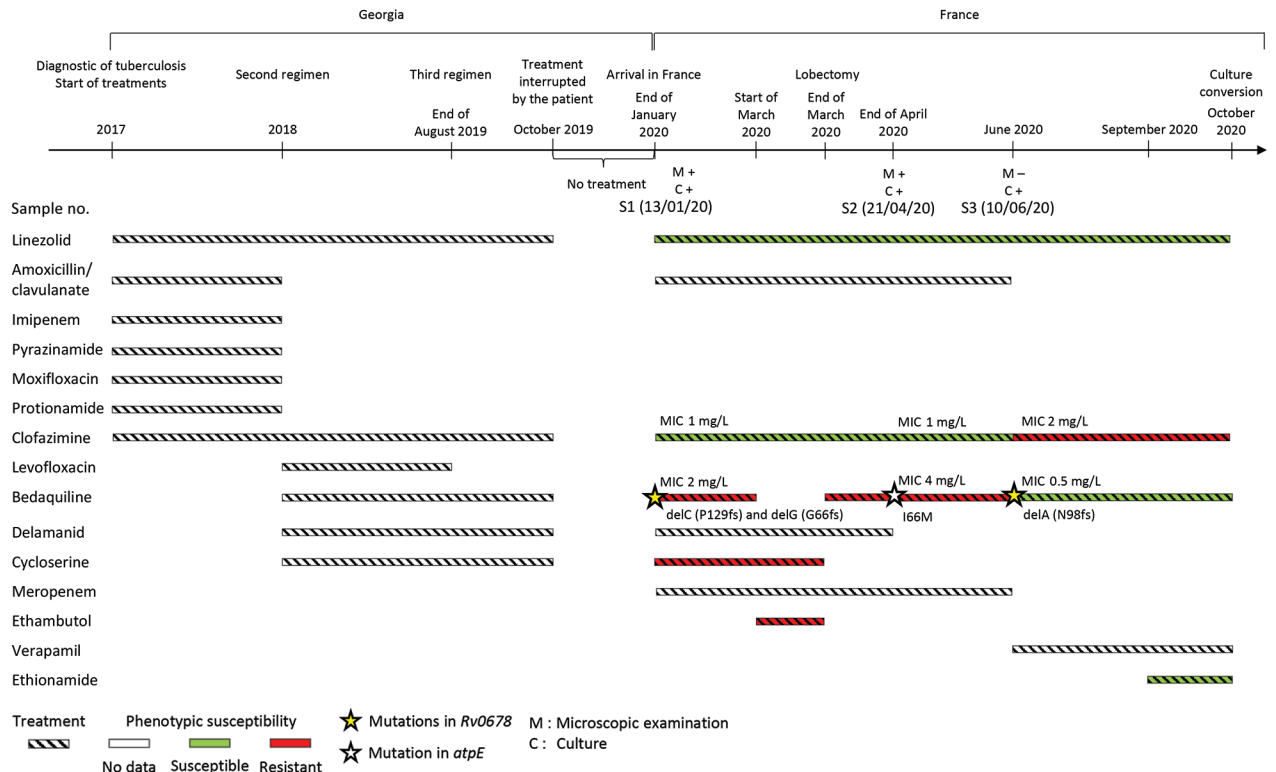


Figure. Timeline of treatment regimen and microbiologic data for patient with multidrug-resistant tuberculosis before and after his arrival in France from Georgia. Timeline for each antibiotic indicates treatment (striped), phenotypic resistance (red), and susceptibility (green), as indicated in patient records. M, microscopic examination; C, culture.

bedaquiline, exhibiting various MIC levels and mutations in genes involved in bedaquiline resistance. These isolates displayed only 3 SNVs by pairwise comparison of their genomes, excluding a reinfection by a new strain or a mixed infection.

Of note, mutations in *atpE* or *Rv0678* were found only once and were not found at subsequent time-points. Despite continuous bedaquiline treatment, resistant strain S2 with the *atpE* mutation was not selected, and the patient was cured. A previous in vitro study suggested that, whereas *Rv0678* mutations were dynamic over time, *atpE* mutations were fixed once they appeared (8). This observation was not confirmed by our clinical case. One possible explanation for nonfixation of these mutations could be the associated fitness cost. However, an in vitro study did not show any fitness cost because of the I66M substitution (9). Because fitness also depends on the genetic background, the results of this in vitro study might not be transposable here. Regarding *Rv0678*, 2 mutations have been studied and did not have fitness impact (E138G and R94Q) (4). Additional in vivo and epidemiologic studies would help evaluate the fitness cost of such mutations. Another explanation for the variability of genotypic and

phenotypic bedaquiline susceptibility over time could be a spatial heterogeneity in the lesions as already described (10).

This case raises concerns about the ability of current phenotypic and genotypic methods to detect bedaquiline resistance. Further studies are needed before relying on these methods for therapeutic decisions. In the meantime, these data can help improve the World Health Organization database of drug resistance-related mutations (11). Overall, this case underlines the complexity of bedaquiline-resistance mechanisms and of the dynamics of mutation emergence and selection.

Acknowledgments

We thank the technicians of NRC MyRMA for their technical assistance.

We wish to honor the memory of our colleague, Wladimir Sougakoff, who passed away in January 2022.

NRC MyRMA is supported by annual grant of Santé Publique France. L.F.L.R. was supported by a grant for Fondation du Souffle. The laboratory has received a research grant from Janssen for study on bedaquiline antimycobacterial activity.

About the Author

Dr. Fournier Le Ray recently successfully defended a PhD thesis in microbiology. Her research was focused on the in vivo emergence of bedaquiline resistance.

References

1. Van Deun A, Decroo T, Piubello A, de Jong BC, Lynen L, Rieder HL. Principles for constructing a tuberculosis treatment regimen: the role and definition of core and companion drugs. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2018;22:239–45. <https://doi.org/10.5588/ijtld.17.0660>
2. World Health Organization. Meeting report of the WHO expert consultation on the definition of extensively drug-resistant tuberculosis, 27–29 October 2020 [cited 2021 Feb 5]. <https://www.who.int/publications/i/item/meeting-report-of-the-who-expert-consultation-on-the-definition-of-extensively-drug-resistant-tuberculosis>
3. Andres S, Merker M, Heyckendorf J, Kalsdorf B, Rumetshofer R, Indra A, et al. Bedaquiline-resistant tuberculosis: dark clouds on the horizon. *Am J Respir Crit Care Med*. 2020;201:1564–8. <https://doi.org/10.1164/rccm.201909-1819LE>
4. Andries K, Villellas C, Coeck N, Thys K, Gevers T, Vranckx L, et al. Acquired resistance of *Mycobacterium tuberculosis* to bedaquiline. *PLoS One*. 2014;9:e102135. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0102135>
5. Peretokina IV, Krylova LY, Antonova OV, Kholina MS, Kulagina EV, Nosova EY, et al. Reduced susceptibility and resistance to bedaquiline in clinical *M. tuberculosis* isolates. *J Infect*. 2020;80:527–35. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2020.01.007>
6. World Health Organization. Technical manual for drug susceptibility testing of medicines used in the treatment of tuberculosis. 2018 [cited 2018 Oct 18]. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/275469>
7. Battaglia S, Spitaleri A, Cabibbe AM, Meehan CJ, Utpatel C, Ismail N, et al. Characterization of genomic variants associated with resistance to bedaquiline and delamanid in naive mycobacterium tuberculosis clinical strains. *J Clin Microbiol*. 2020;58:1304–24. <https://doi.org/10.1128/JCM.01304-20>
8. Ismail N, Ismail NA, Omar SV, Peters RPH. In vitro study of stepwise acquisition of rv0678 and atpE mutations conferring bedaquiline resistance. *Antimicrob Agents Chemother*. 2019;63:e00292–19. <https://doi.org/10.1128/AAC.00292-19>
9. Huitric E, Verhasselt P, Koul A, Andries K, Hoffner S, Andersson DI. Rates and mechanisms of resistance development in *Mycobacterium tuberculosis* to a novel diarylquinoline ATP synthase inhibitor. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010;54:1022–8. <https://doi.org/10.1128/AAC.01611-09>
10. Kaplan G, Post FA, Moreira AL, Wainwright H, Kreiswirth BN, Tanverdi M, et al. *Mycobacterium tuberculosis* growth at the cavity surface: a microenvironment with failed immunity. *Infect Immun*. 2003;71:7099–108. <https://doi.org/10.1128/IAI.71.12.7099-7108.2003>
11. World Health Organization. Catalogue of mutations in *Mycobacterium tuberculosis* complex and their association with drug resistance [cited 2022 Jan 18]. <https://www.who.int/publications-detail-redirect/9789240028173>

Address for correspondence: Nicolas Veziris, Faculté de Médecine Sorbonne Université, 91, boulevard de l'hôpital, 75013 Paris, France; email: nicolas.veziris@sorbonne-universite.fr

Emerging Novel Reassortant Influenza A(H5N6) Viruses in Poultry and Humans, China, 2021

Wenming Jiang, Chunxia Dong, Shuo Liu, Cheng Peng, Xin Yin, Shaobo Liang, Lin Zhang, Jinping Li, Xiaohui Yu, Yang Li, Jingjing Wang, Guangyu Hou, Zheng Zeng, Hualei Liu

Author affiliations: China Animal Health and Epidemiology Center, Qingdao, China (W. Jiang, S. Liu, C. Peng, X. Yin, S. Liang, L. Zhang, J. Li, X. Yu, Y. Li, J. Wang, G. Hou, H. Liu); Chongqing Animal Disease Prevention and Control Center, Chongqing, China (C. Dong, Z. Zeng)

DOI: <https://doi.org/10.3201/eid2805.212163>

A novel highly pathogenic avian influenza A(H5N6) clade 2.3.4.4b virus was isolated from a poultry market in China that a person with a confirmed case had visited. Most genes of the avian and human H5N6 isolates were closely related. The virus also exhibited distinct antigenicity to the Re-11 vaccine strain.

Highly pathogenic avian influenza A(H5N1) virus emerged in China in 1996. H5 viruses have spread to Eurasia since 2003, Africa since 2005, and North America since 2014–2015. These viruses cause huge economic losses to the poultry industry and pose substantial threats to human health. By March 2022, a total of 75 confirmed cases of human infection with influenza A(H5N6) virus had been reported, including 48 cases in China since 2021 (<https://www.who.int/teams/global-influenza-programme/avian-influenza/monthly-risk-assessment-summary>).

On July 9, 2021, a human case of H5N6 infection was reported in Chongqing, China. One day later, we conducted an epidemiologic survey in the poultry market the patient had visited and collected swab samples from poultry. We identified the samples as H5N6 subtype by using H5- and N6-specific primers and probes. We propagated the virus in 10-day-old specific pathogen-free chicken embryos and designated the isolate as A/chicken/Chongqing/H1/2021(H5N6) (CK/CQ/H1). We sequenced the viral genome by using the Sanger method and deposited the sequences in GISAID (<https://www.gisaid.org>; accession nos. EPI1937512–9).

Phylogenetic analysis of the hemagglutinin (HA) genes showed that CK/CQ/H1 and A/Chongqing/

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Smith I. Mycobacterium tuberculosis pathogenesis and molecular determinants of virulence. *Clin Microbiol Rev* **2003**; 16:463–496.
2. Lalremruata A, Ball M, Bianucci R, et al. Molecular identification of falciparum malaria and human tuberculosis co-infections in mummies from the Fayum depression (Lower Egypt). *PloS One* **2013**; 8:e60307.
3. Gagneux S. Ecology and evolution of Mycobacterium tuberculosis. *Nat Rev Microbiol* **2018**; 16:202–213.
4. Daniel TM. The history of tuberculosis. *Respir Med* **2006**; 100:1862–1870.
5. Global Tuberculosis Report 2022. Available at: <https://www.who.int/teams/global-tuberculosis-programme/tb-reports/global-tuberculosis-report-2022>. Accessed 3 May 2023.
6. Tuberculosis surveillance and monitoring in Europe 2023 - 2021 data. 2023. Available at: <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/tuberculosis-surveillance-and-monitoring-europe-2023-2021-data>. Accessed 24 September 2023.
7. Davies PDOD Stephen B Gordon, Geriant, editor. *Clinical Tuberculosis*. 5th ed. London: CRC Press, 2014.
8. Creswell J, Raviglione M, Ottmani S, et al. Tuberculosis and noncommunicable diseases: neglected links and missed opportunities. *Eur Respir J* **2011**; 37:1269–1282.
9. Abel L, Fellay J, Haas DW, et al. Genetics of human susceptibility to active and latent tuberculosis: present knowledge and future perspectives. *Lancet Infect Dis* **2018**; 18:e64–e75.
10. Ehrt S, Schnappinger D, Rhee KY. Metabolic principles of persistence and pathogenicity in Mycobacterium tuberculosis. *Nat Rev Microbiol* **2018**; 16:496–507.
11. Handbook on tuberculosis laboratory diagnostic methods in the European Union - Updated 2018. 2018. Available at: <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/handbook-tuberculosis-laboratory-diagnostic-methods-european-union-updated-2018>. Accessed 19 January 2021.
12. Brossier F, Sougakoff W, French National Reference Center for Mycobacteria(b). Molecular detection methods of resistance to antituberculosis drugs in Mycobacterium tuberculosis. *Med Mal Infect* **2017**; 47:340–348.
13. Brossier F, Veziris N, Jarlier V, Sougakoff W. Performance of MTBDR plus for detecting high/low levels of Mycobacterium tuberculosis resistance to isoniazid. *Int J Tuberc Lung Dis Off J Int Union Tuberc Lung Dis* **2009**; 13:260–265.
14. Brossier F, Guindo D, Pham A, et al. Performance of the New Version (v2.0) of the GenoType MTBDRsl Test for Detection of Resistance to Second-Line Drugs in Multidrug-Resistant Mycobacterium tuberculosis Complex Strains. *J Clin Microbiol* **2016**; 54:1573–1580.
15. Dorman SE, Schumacher SG, Alland D, et al. Xpert MTB/RIF Ultra for detection of Mycobacterium tuberculosis and rifampicin resistance: a prospective multicentre diagnostic accuracy study. *Lancet Infect Dis* **2018**; 18:76–84.
16. Shah M, Paradis S, Betz J, et al. Multicenter Study of the Accuracy of the BD MAX Multidrug-resistant Tuberculosis Assay for Detection of Mycobacterium tuberculosis Complex and

Mutations Associated With Resistance to Rifampin and Isoniazid. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* **2020**; 71:1161–1167.

17. Feuerriegel S, Schleusener V, Beckert P, et al. PhyResSE: a Web Tool Delineating Mycobacterium tuberculosis Antibiotic Resistance and Lineage from Whole-Genome Sequencing Data. *J Clin Microbiol* **2015**; 53:1908–1914.
18. Coll F, McNerney R, Preston MD, et al. Rapid determination of anti-tuberculosis drug resistance from whole-genome sequences. *Genome Med* **2015**; 7:51.
19. Walker TM, Miotto P, Köser CU, et al. The 2021 WHO catalogue of Mycobacterium tuberculosis complex mutations associated with drug resistance: A genotypic analysis. *Lancet Microbe* **2022**; 3:e265–e273.
20. Technical manual for drug susceptibility testing of medicines used in the treatment of tuberculosis. Available at: <https://www.who.int/publications-detail-redirect/9789241514842>. Accessed 27 September 2023.
21. WHO | Technical report on critical concentrations for TB drug susceptibility testing of medicines used in the treatment of drug-resistant TB. Available at: http://www.who.int/tb/publications/2018/WHO_technical_report_concentrations_TB_drug_susceptibility/en/. Accessed 7 June 2020.
22. WHO announces updated critical concentrations for susceptibility testing to rifampicin. Available at: <https://www.who.int/news/item/05-02-2021-who-announces-updated-critical-concentrations-for-susceptibility-testing-to-rifampicin>. Accessed 27 September 2023.
23. HCSP. Infections tuberculeuses latentes. Détection, prise en charge et surveillance. Paris: Haut Conseil de la Santé Publique, 2019. Available at: <https://www.hcsp.fr/explore.cgi/avisrapportsdomaine?clefr=731>. Accessed 3 October 2023.
24. Guglielmetti L, Jaffré J, Bernard C, et al. Multidisciplinary advisory teams to manage multidrug-resistant tuberculosis: the example of the French Consilium. *Int J Tuberc Lung Dis Off J Int Union Tuberc Lung Dis* **2019**; 23:1050–1054.
25. Dorman SE, Nahid P, Kurbatova EV, et al. Four-Month Rifapentine Regimens with or without Moxifloxacin for Tuberculosis. *N Engl J Med* **2021**; 384:1705–1718.
26. Guglielmetti L, Günther G, Leu C, et al. Rifapentine access in Europe: growing concerns over key tuberculosis treatment component. *Eur Respir J* **2022**; 59:2200388.
27. WHO announces updated definitions of extensively drug-resistant tuberculosis. Available at: <https://www.who.int/news/item/27-01-2021-who-announces-updated-definitions-of-extensively-drug-resistant-tuberculosis>. Accessed 3 October 2023.
28. Rapid communication: key changes to the treatment of drug-resistant tuberculosis. Available at: <https://www.who.int/publications-detail-redirect/WHO-UCN-TB-2022-2>. Accessed 3 October 2023.
29. Nimmo C, Millard J, Faulkner V, Monteserin J, Pugh H, Johnson EO. Evolution of Mycobacterium tuberculosis drug resistance in the genomic era. *Front Cell Infect Microbiol* **2022**; 12:954074.

30. Müller B, Borrell S, Rose G, Gagneux S. The heterogeneous evolution of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Trends Genet TIG* **2013**; 29:160–169.
31. Gygli SM, Borrell S, Trauner A, Gagneux S. Antimicrobial resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: mechanistic and evolutionary perspectives. *FEMS Microbiol Rev* **2017**; 41:354–373.
32. EUZÉBY JP. List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature: a Folder Available on the Internet. *Int J Syst Evol Microbiol* **1997**; 47:590–592.
33. Cole ST, Brosch R, Parkhill J, et al. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* **1998**; 393:537–544.
34. Dulberger CL, Rubin EJ, Boutte CC. The mycobacterial cell envelope - a moving target. *Nat Rev Microbiol* **2020**; 18:47–59.
35. Sassetti CM, Rubin EJ. Genetic requirements for mycobacterial survival during infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2003**; 100:12989–12994.
36. Pym AS, Brodin P, Brosch R, Huerre M, Cole ST. Loss of RD1 contributed to the attenuation of the live tuberculosis vaccines *Mycobacterium bovis* BCG and *Mycobacterium microti*. *Mol Microbiol* **2002**; 46:709–717.
37. Boritsch EC, Frigui W, Cascioferro A, et al. pks5-recombination-mediated surface remodelling in *Mycobacterium tuberculosis* emergence. *Nat Microbiol* **2016**; 1:15019.
38. Abdallah AM, Gey van Pittius NC, Champion PAD, et al. Type VII secretion--mycobacteria show the way. *Nat Rev Microbiol* **2007**; 5:883–891.
39. Gröschel MI, Sayes F, Simeone R, Majlessi L, Brosch R. ESX secretion systems: mycobacterial evolution to counter host immunity. *Nat Rev Microbiol* **2016**; 14:677–691.
40. Brosch R, Gordon SV, Marmiesse M, et al. A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2002**; 99:3684–3689.
41. Brodin P, Majlessi L, Marsollier L, et al. Dissection of ESAT-6 system 1 of *Mycobacterium tuberculosis* and impact on immunogenicity and virulence. *Infect Immun* **2006**; 74:88–98.
42. Crosskey TD, Beckham KSH, Wilmanns M. The ATPases of the mycobacterial type VII secretion system: Structural and mechanistic insights into secretion. *Prog Biophys Mol Biol* **2020**; 152:25–34.
43. Bunduc CM, Fahrenkamp D, Wald J, et al. Structure and dynamics of a mycobacterial type VII secretion system. *Nature* **2021**; 593:445–448.
44. Raghavan S, Manzanillo P, Chan K, Dovey C, Cox JS. Secreted transcription factor controls *Mycobacterium tuberculosis* virulence. *Nature* **2008**; 454:717–721.
45. Simeone R, Sayes F, Song O, et al. Cytosolic access of *Mycobacterium tuberculosis*: critical impact of phagosomal acidification control and demonstration of occurrence in vivo. *PLoS Pathog* **2015**; 11:e1004650.
46. Simeone R, Majlessi L, Enninga J, Brosch R. Perspectives on mycobacterial vacuole-to-cytosol translocation: the importance of cytosolic access. *Cell Microbiol* **2016**; 18:1070–1077.

47. Manca C, Tsenova L, Bergtold A, et al. Virulence of a *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolate in mice is determined by failure to induce Th1 type immunity and is associated with induction of IFN- α / β . *Proc Natl Acad Sci U S A* **2001**; 98:5752–5757.
48. Belisle JT, Vissa VD, Sievert T, Takayama K, Brennan PJ, Besra GS. Role of the major antigen of *Mycobacterium tuberculosis* in cell wall biogenesis. *Science* **1997**; 276:1420–1422.
49. Zhang F, Xie J-P. Mammalian cell entry gene family of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Cell Biochem* **2011**; 352:1–10.
50. Chitale S, Ehrh S, Kawamura I, et al. Recombinant *Mycobacterium tuberculosis* protein associated with mammalian cell entry. *Cell Microbiol* **2001**; 3:247–254.
51. Vergne I, Gilleron M, Nigou J. Manipulation of the endocytic pathway and phagocyte functions by *Mycobacterium tuberculosis* lipoarabinomannan. *Front Cell Infect Microbiol* **2014**; 4:187.
52. Cumming BM, Lamprecht DA, Wells RM, Saini V, Mazorodze JH, Steyn AJC. The Physiology and Genetics of Oxidative Stress in *Mycobacteria*. *Microbiol Spectr* **2014**; 2.
53. Ehrh S, Schnappinger D. *Mycobacterial* survival strategies in the phagosome: defence against host stresses. *Cell Microbiol* **2009**; 11:1170–1178.
54. Barrett JF, Hoch JA. Two-Component Signal Transduction as a Target for Microbial Anti-Infective Therapy. *Antimicrob Agents Chemother* **1998**; 42:1529–1536.
55. Bretl DJ, Demetriadou C, Zahrt TC. Adaptation to environmental stimuli within the host: two-component signal transduction systems of *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiol Mol Biol Rev MMBR* **2011**; 75:566–582.
56. Walters SB, Dubnau E, Kolesnikova I, Laval F, Daffe M, Smith I. The *Mycobacterium tuberculosis* PhoPR two-component system regulates genes essential for virulence and complex lipid biosynthesis. *Mol Microbiol* **2006**; 60:312–330.
57. Malaga W, Payros D, Meunier E, et al. Natural mutations in the sensor kinase of the PhoPR two-component regulatory system modulate virulence of ancestor-like tuberculosis bacilli. *PLoS Pathog* **2023**; 19:e1011437.
58. Frigui W, Bottai D, Majlessi L, et al. Control of *M. tuberculosis* ESAT-6 secretion and specific T cell recognition by PhoP. *PLoS Pathog* **2008**; 4:e33.
59. Manganelli R. Sigma Factors: Key Molecules in *Mycobacterium tuberculosis* Physiology and Virulence. *Microbiol Spectr* **2014**; 2:MGM2-0007–2013.
60. Chauhan R, Ravi J, Datta P, et al. Reconstruction and topological characterization of the sigma factor regulatory network of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat Commun* **2016**; 7:11062.
61. Manganelli R, Cioetto-Mazzabò L, Segafreddo G, et al. SigE: A master regulator of *Mycobacterium tuberculosis*. *Front Microbiol* **2023**; 14:1075143.
62. Delogu G, Brennan MJ, Manganelli R. PE and PPE Genes: A Tale of Conservation and Diversity. *Adv Exp Med Biol* **2017**; 1019:191–207.

63. Ates LS. New insights into the mycobacterial PE and PPE proteins provide a framework for future research. *Mol Microbiol* **2020**; 113:4–21.
64. Ates LS, Houben ENG, Bitter W. Type VII Secretion: A Highly Versatile Secretion System. *Microbiol Spectr* **2016**; 4.
65. De Maio F, Berisio R, Manganelli R, Delogu G. PE_PGRS proteins of *Mycobacterium tuberculosis*: A specialized molecular task force at the forefront of host-pathogen interaction. *Virulence* **2020**; 11:898–915.
66. van Embden JD, Cave MD, Crawford JT, et al. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. *J Clin Microbiol* **1993**; 31:406–409.
67. Barbier M, Wirth T. The Evolutionary History, Demography, and Spread of the *Mycobacterium tuberculosis* Complex. *Microbiol Spectr* **2016**; 4.
68. Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A, et al. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J Clin Microbiol* **1997**; 35:907–914.
69. Dale JW, Brittain D, Cataldi AA, et al. Spacer oligonucleotide typing of bacteria of the *Mycobacterium tuberculosis* complex: recommendations for standardised nomenclature. *Int J Tuberc Lung Dis Off J Int Union Tuberc Lung Dis* **2001**; 5:216–219.
70. Comas I, Homolka S, Niemann S, Gagneux S. Genotyping of genetically monomorphic bacteria: DNA sequencing in *Mycobacterium tuberculosis* highlights the limitations of current methodologies. *PloS One* **2009**; 4:e7815.
71. Supply P, Allix C, Lesjean S, et al. Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* **2006**; 44:4498–4510.
72. Coscolla M, Gagneux S. Consequences of genomic diversity in *Mycobacterium tuberculosis*. *Semin Immunol* **2014**; 26:431–444.
73. Coll F, McNerney R, Guerra-Assunção JA, et al. A robust SNP barcode for typing *Mycobacterium tuberculosis* complex strains. *Nat Commun* **2014**; 5:4812.
74. Firdessa R, Berg S, Hailu E, et al. *Mycobacterial* lineages causing pulmonary and extrapulmonary tuberculosis, Ethiopia. *Emerg Infect Dis* **2013**; 19:460–463.
75. Ngabonziza JCS, Loiseau C, Marceau M, et al. A sister lineage of the *Mycobacterium tuberculosis* complex discovered in the African Great Lakes region. *Nat Commun* **2020**; 11:2917.
76. Coscolla M, Gagneux S, Menardo F, et al. Phylogenomics of *Mycobacterium africanum* reveals a new lineage and a complex evolutionary history. *Microb Genomics* **2021**; 7:000477.
77. Gagneux S, DeRiemer K, Van T, et al. Variable host-pathogen compatibility in *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2006**; 103:2869–2873.
78. Orgeur M, Brosch R. Evolution of virulence in the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Curr Opin Microbiol* **2018**; 41:68–75.

79. Drobniewski F, Balabanova Y, Nikolayevsky V, et al. Drug-resistant tuberculosis, clinical virulence, and the dominance of the Beijing strain family in Russia. *JAMA* **2005**; 293:2726–2731.
80. Highest to Lowest - Prison Population Total | World Prison Brief. Available at: https://www.prisonstudies.org/highest-to-lowest/prison-population-total?field_region_taxonomy_tid=All. Accessed 3 May 2023.
81. Gygli SM, Loiseau C, Jugheli L, et al. Prisons as ecological drivers of fitness-compensated multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat Med* **2021**; 27:1171–1177.
82. Coscolla M, Gagneux S, Does M. tuberculosis genomic diversity explain disease diversity? *Drug Discov Today Dis Mech* **2010**; 7:e43–e59.
83. Freschi L, Vargas R, Husain A, et al. Population structure, biogeography and transmissibility of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat Commun* **2021**; 12:6099.
84. Kong Y, Cave MD, Zhang L, et al. Association between *Mycobacterium tuberculosis* Beijing/W lineage strain infection and extrathoracic tuberculosis: Insights from epidemiologic and clinical characterization of the three principal genetic groups of *M. tuberculosis* clinical isolates. *J Clin Microbiol* **2007**; 45:409–414.
85. Ford CB, Shah RR, Maeda MK, et al. *Mycobacterium tuberculosis* mutation rate estimates from different lineages predict substantial differences in the emergence of drug-resistant tuberculosis. *Nat Genet* **2013**; 45:784–790.
86. Loiseau C, Windels EM, Gygli SM, et al. The relative transmission fitness of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in a drug resistance hotspot. *Nat Commun* **2023**; 14:1988.
87. Merker M, Rasigade J-P, Barbier M, et al. Transcontinental spread and evolution of *Mycobacterium tuberculosis* W148 European/Russian clade toward extensively drug resistant tuberculosis. *Nat Commun* **2022**; 13:5105.
88. Mokrousov I. Insights into the origin, emergence, and current spread of a successful Russian clone of *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Microbiol Rev* **2013**; 26:342–360.
89. Merker M, Blin C, Mona S, et al. Evolutionary history and global spread of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing lineage. *Nat Genet* **2015**; 47:242–249.
90. Lasunskaja E, Ribeiro SCM, Manicheva O, et al. Emerging multidrug resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains of the Beijing genotype circulating in Russia express a pattern of biological properties associated with enhanced virulence. *Microbes Infect* **2010**; 12:467–475.
91. Fursov MV, Shitikov EA, Lagutkin DA, et al. MDR and Pre-XDR Clinical *Mycobacterium tuberculosis* Beijing Strains: Assessment of Virulence and Host Cytokine Response in Mice Infectious Model. *Microorganisms* **2021**; 9:1792.
92. Vyazovaya A, Mokrousov I, Solovieva N, et al. Tuberculous spondylitis in Russia and prominent role of multidrug-resistant clone *Mycobacterium tuberculosis* Beijing B0/W148. *Antimicrob Agents Chemother* **2015**; 59:2349–2357.
93. Pedersen BP, Stokes DL, Apell H-J. The KdpFABC complex - K⁺ transport against all odds. *Mol Membr Biol* **2019**; 35:21–38.

94. Diskowski M, Mikusevic V, Stock C, Hänel I. Functional diversity of the superfamily of K⁺ transporters to meet various requirements. *Biol Chem* **2015**; 396:1003–1014.
95. Heermann R, Jung K. The complexity of the ‘simple’ two-component system KdpD/KdpE in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* **2010**; 304:97–106.
96. Epstein W. The roles and regulation of potassium in bacteria. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **2003**; 75:293–320.
97. Freeman ZN, Dorus S, Waterfield NR. The KdpD/KdpE two-component system: integrating K⁺ homeostasis and virulence. *PLoS Pathog* **2013**; 9:e1003201.
98. Xue T, You Y, Hong D, Sun H, Sun B. The *Staphylococcus aureus* KdpDE two-component system couples extracellular K⁺ sensing and Agr signaling to infection programming. *Infect Immun* **2011**; 79:2154–2167.
99. Zhao L, Xue T, Shang F, Sun H, Sun B. *Staphylococcus aureus* AI-2 quorum sensing associates with the KdpDE two-component system to regulate capsular polysaccharide synthesis and virulence. *Infect Immun* **2010**; 78:3506–3515.
100. Voyich JM, Braughton KR, Sturdevant DE, et al. Insights into mechanisms used by *Staphylococcus aureus* to avoid destruction by human neutrophils. *J Immunol Baltim Md 1950* **2005**; 175:3907–3919.
101. Alegado RA, Chin C-Y, Monack DM, Tan M-W. The two-component sensor kinase KdpD is required for *Salmonella typhimurium* colonization of *Caenorhabditis elegans* and survival in macrophages. *Cell Microbiol* **2011**; 13:1618–1637.
102. Parish T, Smith DA, Kendall S, Casali N, Bancroft GJ, Stoker NG. Deletion of two-component regulatory systems increases the virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* **2003**; 71:1134–1140.
103. Hou JY, Graham JE, Clark-Curtiss JE. *Mycobacterium avium* genes expressed during growth in human macrophages detected by selective capture of transcribed sequences (SCOTS). *Infect Immun* **2002**; 70:3714–3726.
104. O’Loughlin JL, Spinner JL, Minnich SA, Kobayashi SD. *Yersinia pestis* two-component gene regulatory systems promote survival in human neutrophils. *Infect Immun* **2010**; 78:773–782.
105. Vlisidou I, Eleftherianos I, Dorus S, et al. The KdpD/KdpE two-component system of *Photobacterium damela* promotes bacterial survival within *M. sexta* hemocytes. *J Invertebr Pathol* **2010**; 105:352–362.
106. Moule MG, Monack DM, Schneider DS. Reciprocal analysis of *Francisella novicida* infections of a *Drosophila melanogaster* model reveal host-pathogen conflicts mediated by reactive oxygen and imd-regulated innate immune response. *PLoS Pathog* **2010**; 6:e1001065.
107. Weiss DS, Brotcke A, Henry T, Margolis JJ, Chan K, Monack DM. In vivo negative selection screen identifies genes required for *Francisella* virulence. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2007**; 104:6037–6042.

108. Njoroge JW, Nguyen Y, Curtis MM, Moreira CG, Sperandio V. Virulence meets metabolism: Cra and KdpE gene regulation in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *mBio* **2012**; 3:e00280-00212.
109. Hughes DT, Clarke MB, Yamamoto K, Rasko DA, Sperandio V. The QseC adrenergic signaling cascade in Enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC). *PLoS Pathog* **2009**; 5:e1000553.
110. Salina EG, Waddell SJ, Hoffmann N, Rosenkrands I, Butcher PD, Kaprelyants AS. Potassium availability triggers *Mycobacterium tuberculosis* transition to, and resuscitation from, non-culturable (dormant) states. *Open Biol* **2014**; 4:140106.
111. Cholo MC, Matjokotja MT, Osman AG, Anderson R. Role of the kdpDE Regulatory Operon of *Mycobacterium tuberculosis* in Modulating Bacterial Growth in vitro. *Front Genet* **2021**; 12:698875.
112. Cholo MC, van Rensburg EJ, Anderson R. Potassium uptake systems of *Mycobacterium tuberculosis*: genomic and protein organisation and potential roles in microbial pathogenesis and chemotherapy. *South Afr J Epidemiol Infect* **2008**; 23:13–16.
113. Agrawal R, Saini DK. Rv1027c-Rv1028c encode functional KdpDE two--component system in *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochem Biophys Res Commun* **2014**; 446:1172–1178.
114. MacGilvary NJ, Kevorkian YL, Tan S. Potassium response and homeostasis in *Mycobacterium tuberculosis* modulates environmental adaptation and is important for host colonization. *PLoS Pathog* **2019**; 15:e1007591.
115. Cholo MC, van Rensburg EJ, Osman AG, Anderson R. Expression of the Genes Encoding the Trk and Kdp Potassium Transport Systems of *Mycobacterium tuberculosis* during Growth In Vitro. *BioMed Res Int* **2015**; 2015:608682.
116. Ali MK, Li X, Tang Q, et al. Regulation of Inducible Potassium Transporter KdpFABC by the KdpD/KdpE Two-Component System in *Mycobacterium smegmatis*. *Front Microbiol* **2017**; 8:570.
117. Steyn AJC, Joseph J, Bloom BR. Interaction of the sensor module of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv KdpD with members of the Lpr family. *Mol Microbiol* **2003**; 47:1075–1089.
118. Sasseti CM, Boyd DH, Rubin EJ. Genes required for mycobacterial growth defined by high density mutagenesis. *Mol Microbiol* **2003**; 48:77–84.
119. Rengarajan J, Bloom BR, Rubin EJ. Genome-wide requirements for *Mycobacterium tuberculosis* adaptation and survival in macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2005**; 102:8327–8332.
120. Haydel SE, Clark-Curtiss JE. Global expression analysis of two-component system regulator genes during *Mycobacterium tuberculosis* growth in human macrophages. *FEMS Microbiol Lett* **2004**; 236:341–347.
121. Betts JC, Lukey PT, Robb LC, McAdam RA, Duncan K. Evaluation of a nutrient starvation model of *Mycobacterium tuberculosis* persistence by gene and protein expression profiling. *Mol Microbiol* **2002**; 43:717–731.

122. Liu X, Wang C, Yan B, Lyu L, Takiff HE, Gao Q. The potassium transporter KdpA affects persister formation by regulating ATP levels in *Mycobacterium marinum*. *Emerg Microbes Infect* **2020**; 9:129–139.
123. den Hengst CD, Buttner MJ. Redox control in actinobacteria. *Biochim Biophys Acta* **2008**; 1780:1201–1216.
124. Saini V, Farhana A, Glasgow JN, Steyn AJC. Iron sulfur cluster proteins and microbial regulation: implications for understanding tuberculosis. *Curr Opin Chem Biol* **2012**; 16:45–53.
125. Crack JC, Green J, Le Brun NE, Thomson AJ. Detection of sulfide release from the oxygen-sensing [4Fe-4S] cluster of FNR. *J Biol Chem* **2006**; 281:18909–18913.
126. Chater KF. A morphological and genetic mapping study of white colony mutants of *Streptomyces coelicolor*. *J Gen Microbiol* **1972**; 72:9–28.
127. Bush MJ. The actinobacterial WhiB-like (Wbl) family of transcription factors. *Mol Microbiol* **2018**; 110:663–676.
128. Saini V, Farhana A, Steyn AJC. *Mycobacterium tuberculosis* WhiB3: a novel iron-sulfur cluster protein that regulates redox homeostasis and virulence. *Antioxid Redox Signal* **2012**; 16:687–697.
129. Jakimowicz P, Cheesman MR, Bishai WR, Chater KF, Thomson AJ, Buttner MJ. Evidence that the *Streptomyces* developmental protein WhiD, a member of the WhiB family, binds a [4Fe-4S] cluster. *J Biol Chem* **2005**; 280:8309–8315.
130. Garg SK, Suhail Alam M, Soni V, Radha Kishan KV, Agrawal P. Characterization of *Mycobacterium tuberculosis* WhiB1/Rv3219 as a protein disulfide reductase. *Protein Expr Purif* **2007**; 52:422–432.
131. Singh A, Guidry L, Narasimhulu KV, et al. *Mycobacterium tuberculosis* WhiB3 responds to O₂ and nitric oxide via its [4Fe-4S] cluster and is essential for nutrient starvation survival. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2007**; 104:11562–11567.
132. Alam MS, Garg SK, Agrawal P. Molecular function of WhiB4/Rv3681c of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv: a [4Fe-4S] cluster co-ordinating protein disulphide reductase. *Mol Microbiol* **2007**; 63:1414–1431.
133. Geiman DE, Raghunand TR, Agarwal N, Bishai WR. Differential gene expression in response to exposure to antimycobacterial agents and other stress conditions among seven *Mycobacterium tuberculosis* whiB-like genes. *Antimicrob Agents Chemother* **2006**; 50:2836–2841.
134. Houben D, Demangel C, van Ingen J, et al. ESX-1-mediated translocation to the cytosol controls virulence of mycobacteria. *Cell Microbiol* **2012**; 14:1287–1298.
135. Solans L, Aguiló N, Samper S, et al. A specific polymorphism in *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv causes differential ESAT-6 expression and identifies WhiB6 as a novel ESX-1 component. *Infect Immun* **2014**; 82:3446–3456.
136. Bosserman RE, Nguyen TT, Sanchez KG, et al. WhiB6 regulation of ESX-1 gene expression is controlled by a negative feedback loop in *Mycobacterium marinum*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2017**; 114:E10772–E10781.

137. Abdallah AM, Weerdenburg EM, Guan Q, et al. Integrated transcriptomic and proteomic analysis of pathogenic mycobacteria and their esx-1 mutants reveal secretion-dependent regulation of ESX-1 substrates and WhiB6 as a transcriptional regulator. *PloS One* **2019**; 14:e0211003.
138. Sanchez KG, Ferrell MJ, Chirakos AE, et al. EspM Is a Conserved Transcription Factor That Regulates Gene Expression in Response to the ESX-1 System. *mBio* **2020**; 11:e02807-19.
139. Chirakos AE, Nicholson KR, Huffman A, Champion PA. Conserved ESX-1 Substrates EspE and EspF Are Virulence Factors That Regulate Gene Expression. *Infect Immun* **2020**; 88:e00289-20.
140. Chen Z, Hu Y, Cumming BM, et al. Mycobacterial WhiB6 Differentially Regulates ESX-1 and the Dos Regulon to Modulate Granuloma Formation and Virulence in Zebrafish. *Cell Rep* **2016**; 16:2512–2524.
141. Voskuil MI, Schnappinger D, Visconti KC, et al. Inhibition of respiration by nitric oxide induces a Mycobacterium tuberculosis dormancy program. *J Exp Med* **2003**; 198:705–713.
142. Pak MA, Markhieva KA, Novikova MS, et al. Using AlphaFold to predict the impact of single mutations on protein stability and function. *PloS One* **2023**; 18:e0282689.
143. Buel GR, Walters KJ. Can AlphaFold2 predict the impact of missense mutations on structure? *Nat Struct Mol Biol* **2022**; 29:1–2.
144. Physical Review Letters - Accepted Paper: AlphaFold2 can predict single-mutation effects. Available at: <https://journals.aps.org/prl/accepted/97076Y16Nf51d07168e133f1f2785ed8e8ccc6917>. Accessed 18 October 2023.
145. Lovey A, Verma S, Kaipilyawar V, et al. Early alveolar macrophage response and IL-1R-dependent T cell priming determine transmissibility of Mycobacterium tuberculosis strains. *Nat Commun* **2022**; 13:884.
146. Ismail N, Dippenaar A, Morgan G, et al. Microfluidic Capture of Mycobacterium tuberculosis from Clinical Samples for Culture-Free Whole-Genome Sequencing. *Microbiol Spectr* **2023**; 11:e0111423.

RESUME

La tuberculose (TB) est, hors COVID, la première cause de décès lié à un agent infectieux. La détermination rapide du profil de résistance complet de *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) est essentielle pour démarrer un traitement adapté dans les cas de TB multirésistante (MDR) et ainsi limiter l'acquisition de résistances supplémentaires, augmenter les chances de succès thérapeutique et réduire la transmission de ces souches. Il existe 9 lignées principales au sein du complexe *M. tuberculosis*, dont 2 sont largement répandues dans le monde (L2 et L4). Au sein de la lignée 2, le clone W148 (ou complexe clonal CC 100-32) a diffusé récemment en Europe et en Asie. Cette diffusion pourrait s'expliquer par des mutations spécifiques au sein du génome.

En premier lieu, nous avons étudié la technologie Deeplex Myc-TB pour détecter rapidement le génotype et la résistance des souches cliniques de Mtb MDR. Cette technologie, basée sur une PCR multiplex et un séquençage haut débit, détermine à la fois l'espèce (*hsp65*), le génotype (spoligotype) et la résistance à 13 antituberculeux de première et seconde ligne (18 cibles). Le travail d'évaluation a inclus 112 prélèvements et 94 souches adressés au Centre National de Référence des Mycobactéries et de la Résistance des Mycobactéries aux Antituberculeux (CNR MyRMA). Nous avons observé que le test Deeplex Myc-TB fonctionne sur prélèvement positif à l'examen microscopique et sur souche. Les profils de résistance obtenus sont concordants à 85,4% avec les résultats de la méthode phénotypique de référence. L'utilisation de Deeplex Myc-TB fournit des résultats en une dizaine de jours, soit environ 6 semaines avant ceux de l'antibiogramme phénotypique. Deeplex Myc-TB permet donc d'adapter l'antibiothérapie bien avant que ce qui était fait jusqu'à présent, pour le bénéfice des patients. Nous avons ainsi pu valider cet outil maintenant utilisé en routine au CNR MyRMA.

Nous avons ensuite étudié les mutations spécifiques du CC 100-32 MDR. L'analyse du génome complet de 29 souches reçues au CNR MyRMA a permis d'identifier 30 mutations non synonymes et petites délétions spécifiques. Parmi elles, nous avons choisi d'étudier celles présentes dans *kdpD* et *whiB6*, car des données de la littérature semblent montrer un impact de ces gènes sur la virulence de la souche. KdpDE est un système à deux composants régulant l'expression du système de transport du potassium inductible KdpFABC. La mutation présente dans le complexe CC 100-32 MDR est une délétion de 2 nucléotides à la fin du gène *kdpD* entraînant une protéine de fusion KdpDE. Nous avons donc construit un tel mutant chez Mtb H37Rv en supprimant les deux gènes *kdpD* et *kdpE* avant de le compléter avec la forme sauvage ou mutée de *kdpDE*. Nous n'avons pas observé de différence de croissance *in vitro* des différentes souches, y compris en l'absence de potassium, suggérant que KdpDE n'est pas essentiel pour le fitness de la bactérie en présence et absence de potassium. L'étude de l'impact de la délétion sur l'activité transcriptionnelle et la virulence est en cours. D'autre part, WhiB6 est un facteur de transcription qui régule le système ESX-1, nécessaire à la virulence. Des travaux du laboratoire ont permis d'obtenir le mutant $\Delta whiB6$ et les souches complémentées WT et mutée (T51P) et leur ré-analyse indique que la souche mutée T51P entraîne une production d'ESAT-6 et de cytokines pro-inflammatoires plus faible que la souche sauvage ; nous réalisons actuellement une analyse du transcriptome. Les premiers résultats obtenus semblent indiquer que la mutation T51P dans WhiB6 entraîne moins de virulence et d'inflammation. Ce travail a permis de valider un outil maintenant indispensable au diagnostic des TB MDR en routine au CNR MyRMA et d'étudier la diffusion d'un clone MDR à travers les fonctions de deux facteurs de transcription impliqués dans la virulence.

ABSTRACT

Tuberculosis (TB) is, excluding COVID, the leading cause of death linked to an infectious agent. Rapid determination of the full resistance profile of *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) is essential to initiate appropriate treatment of multidrug resistant (MDR) cases, thereby limiting the acquisition of additional resistance, increasing the chances of therapeutic success and reducing transmission of these strains. There are 9 main lineages within the *M. tuberculosis* complex, 2 of which are widespread throughout the world (L2 and L4). Within lineage 2, the clone W148 (or clonal complex CC 100-32) has recently spread to Europe and Asia. This spread could be explained by specific mutations within the genome.

First, we investigated the Deeplex Myc-TB tool for rapid detection of genotype and resistance in clinical Mtb MDR strains. The Deeplex Myc-TB technology, based on multiplex PCR and high-throughput sequencing, determines species (*hsp65*), genotype (spoligotype) and resistance to 13 first- and second-line anti-tuberculosis drugs (18 targets). Our evaluation included 112 samples and 94 strains sent to the Centre National de Référence des Mycobactéries et de la Résistance des Mycobactéries aux Antituberculeux (CNR MyRMA). We have observed that the Deeplex Myc-TB test is efficient on microscopically positive samples and strains. The resistance profiles obtained are 85.4% concordant with the results of the phenotypic reference method. The use of Deeplex Myc-TB provides results within ten days, and around 6 weeks before those of the phenotypic antibiogram. Deeplex Myc-TB can therefore be used to adapt antibiotic therapy much earlier than was previously possible, to the patient benefit. We were thus able to validate this tool, which is now routinely used at CNR MyRMA.

We next studied mutations specific to CC 100-32 MDR. Genome-wide analysis of 29 strains received at CNR MyRMA identified 30 non-synonymous mutations and small deletions specific to CC 100-32 MDR strains. Among these, we chose to study mutations present in *kdpD* and *whiB6*, as data in the literature indicated an impact of these genes on the virulence of the strain. On the one hand, KdpDE is a two-component system regulating expression of the inducible potassium transport system KdpFABC. The mutation present in the CC 100-32 MDR complex is a 2-nucleotides deletion at the end of the *kdpD* gene, resulting in a KdpDE fusion protein. We therefore constructed such a mutant in Mtb H37Rv by deleting both the *kdpD* and *kdpE* genes before complementing it with the wild-type or mutated form of *kdpDE*. We observed no difference in the *in vitro* growth of the different strains, even in the absence of potassium, suggesting that KdpDE is not essential for bacterial fitness in presence or absence of potassium. The impact of the deletion on transcriptional activity and virulence is currently being studied. On the other hand, WhiB6 is a transcription factor that regulates the ESX-1 system, necessary for virulence. Work from the laboratory generated a Δ *whiB6* mutant and the complemented WT and mutated (T51P) strains and their re-analysis indicated that T51P mutant strain produces less ESAT-6 and pro-inflammatory cytokines than the wild-type strain. Our transcriptome analysis of these strains is currently underway. Initial results suggest that the T51P mutation in WhiB6 results in less virulence and inflammation. This work has validated a tool that is now essential for routine diagnosis of MDR TB at CNR MyRMA, and to study the spread of an MDR clone through the function of two transcription factors involved in virulence.