



HAL
open science

Apport de la génomique dans la tuberculose multirésistante : de l'étude des bases moléculaires de la dissémination à la découverte de nouveaux mécanismes de résistance

Florence Morel

► To cite this version:

Florence Morel. Apport de la génomique dans la tuberculose multirésistante : de l'étude des bases moléculaires de la dissémination à la découverte de nouveaux mécanismes de résistance. Bactériologie. Sorbonne Université, 2023. Français. NNT : 2023SORUS139 . tel-04924807

HAL Id: tel-04924807

<https://theses.hal.science/tel-04924807v1>

Submitted on 1 Feb 2025

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 Université

École doctorale Complexité du vivant, ED515

Centre d'Immunologie et des Maladies infectieuses,

Équipe : Émergence et propagation des multi-résistances aux antibiotiques

Apport de la génomique dans la tuberculose multirésistante : de l'étude des bases moléculaires de la dissémination à la découverte de nouveaux mécanismes de résistance

Par Florence Morel

Thèse de doctorat de Microbiologie

Dirigée par Alexandra Aubry

Présentée et soutenue publiquement le 31 janvier 2023

Devant un jury composé de :

Monsieur Jean-Emmanuel Hugonnet, Professeur

Madame Oana Dumitrescu, Maître de Conférence

Monsieur Philippe Lanotte, Professeur

Madame Nadine Lemaître, Professeur

Monsieur Thierry Wirth, Professeur

Madame Alexandra Aubry, Professeur

Président du jury

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

Directeur de thèse

Remerciements

A Monsieur le Professeur Jean-Emmanuel Hugonnet
pour l'honneur qu'il me fait de présider ce jury de thèse.

A Madame le Docteur Oana Dumitrescu et Monsieur le Professeur Philippe Lanotte
pour me faire l'honneur de juger ce travail et en être les rapporteurs.

A Madame le Professeur Nadine Lemaître et Monsieur le Professeur Thierry Wirth
pour me faire l'honneur d'examiner ce travail.

A Madame le Professeur Alexandra Aubry
pour m'avoir fait confiance et dirigée dans la réalisation de ce travail de thèse.
Alexandra, merci pour ta confiance et ton soutien, depuis mon internat jusqu'à présent. Merci
aussi pour ta grande disponibilité et tes conseils.

A Monsieur le Docteur Wladimir Sougakoff
pour m'avoir confié une partie de ce travail et m'avoir co-dirigée dans sa réalisation.
C'est un très grand regret pour moi de ne pas avoir pu apprendre plus à tes côtés, et de ne plus
pouvoir échanger avec toi.

A Monsieur le Professeur Jérôme Robert
Pour m'avoir accueillie au sein du laboratoire de Bactériologie et au sein du CNR des
Mycobactéries, et pour son soutien.

A Monsieur le Professeur Nicolas Veziris
Pour avoir participé à la relecture de la publication concernant les fluoroquinolones, et pour
tous les échanges très formateurs que nous avons dans le cadre de notre pratique au CNR des
Mycobactéries.

Un très grand merci à Monsieur le Professeur Philip Supply, pour la collaboration que nous
avons pu engager dans ce travail, et pour tous les échanges très stimulants. Un très grand merci
à Cyril Gaudin pour l'apport de son expertise en bioinformatique et pour son aide précieuse
dans l'analyse génomique.

Un grand merci à Madame le Docteur Stéphanie Petrella, pour l'apport de son expertise sur les
protéines Mfp.

A toute l'équipe du Laboratoire de Bactériologie, que je connais depuis mon internat en 2013.
Le labo est un peu comme une seconde maison pour moi.
Merci à toute l'équipe technique, à ceux que je connais depuis bientôt 10 ans maintenant et à
ceux arrivés plus récemment dans le laboratoire. C'est très agréable de travailler à vos côtés.

Un merci particulier à Sabrina et à Gérald de la BM, votre compétence et votre soutien m'ont aidée et m'aident encore à maintenir le cap dans le secteur après le décès de Wladimir. Un merci particulier également à tous les techniciens du secteur des mycobactéries.

Merci à tous mes collègues biologistes, une mention très spéciale pour Laurence, pour ton soutien, ton aide dans les coups durs, c'est un très grand plaisir de travailler à tes côtés. Merci aussi à Brigitte, pour nos discussions, j'aimerais avoir le temps de plus échanger avec toi ! Merci à Isabelle, pour notre travail ensemble au quotidien, et de m'avoir aidée pour la validation du secteur BM afin de me permettre au mieux de rédiger cette thèse.

A toute l'équipe du Cimi. Un grand merci à Elodie, pour ton aide, ta disponibilité, tes conseils techniques précieux, le partage de connaissances, et pour tous nos échanges autour d'un cappuccino au relai H... C'est plaisant aussi d'avoir une partenaire de génomique ! Merci à Cuc, tu vas beaucoup nous manquer, et à Laure, pour ta bonne humeur, j'ai eu grand plaisir à travailler avec toi autour de la thématique de la résistance à la bédaquiline. Merci à Alex et à Catherine pour leur soutien et toutes les discussions que nous avons pu avoir (et aussi pour les cafés !).

Merci à Christine Bernard, qui avait initié ce travail sur les fluoroquinolones, et qui s'est rendue disponible pour m'aider dans sa réalisation.

Une pensée particulière pour Florence Brossier,
Ton départ a été un choc pour nous tous. Je suis heureuse d'avoir pu bénéficier de ta formation en BM, j'aurais aimé pouvoir continuer à apprendre et à travailler à tes côtés.

Merci enfin à ma famille, en particulier à mes parents, et à mon mari Romain, pour leur soutien indéfectible et très précieux.

A mon fils Paul, mon petit trésor, te voir grandir est une immense source de bonheur pour moi.

SOMMAIRE

LISTE DES FIGURES.....	5
LISTE DES TABLEAUX.....	7
LISTE DES ABREVIATIONS.....	8
LEXIQUE.....	9
AVANT-PROPOS.....	12
PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE.....	13
1. <i>Mycobacterium tuberculosis complex</i> et tuberculose.....	13
1.1. Caractéristiques des mycobactéries.....	13
1.2. Taxonomie et phylogénie au sein du genre <i>Mycobacterium</i>	15
1.3. Le complexe <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	20
1.3.1. Présentation des espèces du complexe <i>tuberculosis</i>	20
1.3.2. Etude de la phylogénie du complexe <i>tuberculosis</i>	24
1.3.2.1. Méthodes « pré-NGS ».....	24
1.3.2.2. Méthodes basées sur l'utilisation du NGS.....	25
1.4. Tuberculose humaine.....	28
1.4.1. Epidémiologie de la tuberculose.....	28
1.4.2. Etapes de l'infection tuberculeuse.....	30
1.4.3. Formes cliniques de la tuberculose maladie.....	33
1.4.4. Diagnostic de la tuberculose maladie.....	33
1.4.4.1. Stratégie de prélèvement pour le diagnostic de la tuberculose pulmonaire.....	33
1.4.4.2. Diagnostic microbiologique.....	34
1.4.4.2.1. Examen microscopique sur prélèvement.....	35
1.4.4.2.2. Culture.....	35
1.4.4.2.3. Biologie moléculaire.....	37
1.4.5. Traitement des tuberculoses à bacilles sensibles.....	42
2. Résistance de <i>Mycobacterium tuberculosis complex</i> aux antituberculeux.....	43
2.1. Définitions.....	43
2.2. Epidémiologie de la résistance aux antituberculeux.....	45
2.2.1. Epidémiologie de la tuberculose résistante dans le monde.....	45
2.2.2. Epidémiologie de la tuberculose résistante en France.....	47
2.3. Mécanismes généraux de résistance aux antituberculeux.....	48
2.4. Mécanismes de sélection et d'acquisition de la résistance aux antituberculeux.....	50
2.5. Paramètres autres que la proportion naturelle de mutants résistants impliqués dans la résistance aux antituberculeux.....	52
2.5.1. Influence de la lignée phylogénétique.....	53
2.5.2. Hétérorésistance.....	53
2.5.3. Tolérance et persistance et les gènes qui leur sont associés, le tolérome.....	56
2.5.4. Fitness, mutations compensatoires et épistasie.....	59
2.6. Mécanismes de résistance par antituberculeux.....	62
2.6.1. Isoniazide.....	62
2.6.2. Rifampicine.....	63
2.6.3. Pyrazinamide.....	63
2.6.4. Ethambutol.....	64
2.6.5. Streptomycine.....	64
2.6.6. Le linézolide.....	65
2.6.7. Cyclosérine.....	65
2.6.8. Injectables de deuxième ligne : amikacine, kanamycine et capréomycine.....	65
2.6.9. Nitro-imidazolés : délamanide et prétomanide.....	66
2.6.10. Ethionamide.....	67
2.6.11. Acide para-amino-salicylique.....	68
2.7. Diagnostic de la résistance aux antituberculeux.....	70
2.7.1. Méthodes phénotypiques.....	70
2.7.1.1. Méthodes phénotypiques en milieu solide.....	71
2.7.1.2. Méthodes phénotypiques en milieux liquides.....	71

2.7.1.3.	<i>Méthodes phénotypiques simples et rapides</i>	72
2.7.1.4.	<i>Limites des méthodes phénotypiques</i>	73
2.7.2.	Méthodes génotypiques	77
2.7.2.1.	<i>Principes et écueils communs aux méthodes génotypiques</i>	77
2.7.2.2.	<i>Techniques génotypiques « conventionnelles »</i>	78
2.7.2.3.	<i>Méthodes basées sur le NGS</i>	88
2.7.2.3.1.	Historique et principes du séquençage génomique appliqué à l'étude de <i>Mtb</i>	88
2.7.2.3.2.	Deeplex Myc-TB®	94
2.7.2.3.3.	Séquençage du génome complet.....	98
2.7.2.3.4.	Apport des techniques de séquençage <i>long-read</i>	101
2.8.	Résistance aux fluoroquinolones chez <i>M. tuberculosis</i>	102
2.8.1.	Présentation générale des (fluoro)quinolones	102
2.8.2.	Activité des fluoroquinolones chez <i>M. tuberculosis</i>	103
2.8.2.1.	<i>Activité in vitro</i>	103
2.8.2.2.	<i>Activité in vivo dans des modèles murins d'infection tuberculeuse</i>	104
2.8.2.3.	<i>Etudes de bactéricidie initiale (EBA) réalisées chez l'homme</i>	104
2.8.2.4.	<i>Utilisation des FQ dans le traitement de la TB chez l'homme</i>	105
2.8.3.	Mécanisme d'action des fluoroquinolones	105
2.8.4.	Mécanismes de résistance acquise aux fluoroquinolones chez <i>M. tuberculosis</i>	108
2.8.4.1.	<i>Modifications de la cible</i>	109
2.8.4.2.	<i>Surexpression de systèmes d'efflux</i>	112
2.8.4.3.	<i>Mutation dans <i>EccC5</i></i>	113
2.8.4.4.	<i>Protéine à motifs répétés <i>MpfA</i></i>	114
2.8.5.	Particularités du diagnostic de la résistance aux FQ chez <i>M. tuberculosis</i>	116
2.9.	Résistance à la bédaquiline chez <i>M. tuberculosis</i>	118
2.9.1.	Présentation générale de la bédaquiline	118
2.9.2.	Mécanismes d'action	119
2.9.3.	Activité de la bédaquiline sur <i>M. tuberculosis</i>	122
2.9.3.1.	<i>Activité in vitro</i>	122
2.9.3.2.	<i>Activité in vivo dans des modèles murins de tuberculose</i>	123
2.9.3.3.	<i>Utilisation de la bédaquiline dans le traitement de la tuberculose chez l'homme</i>	124
2.9.4.	Mécanismes d'acquisition de la résistance	124
2.9.4.1.	<i>Modification de la cible : mutations dans <i>atpE</i></i>	125
2.9.4.2.	<i>Efflux : mutations dans <i>Rv0678</i></i>	126
2.9.4.3.	<i>Mutations dans le gène <i>pepQ</i></i>	128
2.9.4.4.	<i>Mutations dans le gène <i>Rv1979c</i></i>	128
2.9.5.	Difficultés du diagnostic génotypique de la résistance à la bédaquiline	129
2.10.	Traitement des tuberculoses à bacilles résistants	130
3.	Virulence de <i>M. tuberculosis</i>	132
3.1.	Mécanismes d'échappement du système immunitaire de <i>M. tuberculosis</i>	132
3.2.	Systèmes de sécrétion de type VII (SST7 ou ESX)	134
3.2.1.	<i>Système ESX-I</i>	136
3.2.2.	<i>Autres systèmes ESX impliqués dans la virulence de <i>M. tuberculosis</i></i>	141
3.3.	Implication des lipides de la mycomembrane	142
3.4.	Protéines PE/PPE	144
CONTEXTE ET OBJECTIFS		148
TRAVAUX ORIGINAUX		150
I.	Travaux relatifs au contexte du travail de thèse	150
II.	Travaux portant sur la recherche de mécanismes de résistance aux fluoroquinolones chez <i>M. tuberculosis</i> non liés à l'ADN gyrase	218
III.	Travaux portant sur l'investigation des mécanismes moléculaires de dissémination d'un cluster particulier de souches de <i>M. tuberculosis</i> MDR	373
DISCUSSION ET PERSPECTIVES		386
CONCLUSION		400
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES		401
ABSTRACT/RESUME		432

LISTE DES FIGURES

Figure 1- Représentation schématique de la paroi des mycobactéries, d'après ³	14
Figure 2- Arbre phylogénétique des nouveaux genres mycobactériens, basée sur une étude phylogénomique, d'après ⁴	16
Figure 3- Arbre phylogénétique du genre <i>Mycobacterium</i> d'après. ⁵	19
Figure 4- Phylogénie du complexe <i>tuberculosis</i> . D'après ⁵⁴	23
Figure 5- Arbre phylogénétique de MTBC. D'après ⁵⁸	27
Figure 6- Nombre de notifications de cas de TB nouvellement diagnostiqués (en millions) sur la période 2015-2021, données OMS 2022, d'après ⁶²	28
Figure 7- Estimation de l'incidence de la TB en 2021 D'après ⁶²	29
Figure 8- Pathogénicité de <i>Mtb</i> . D'après ⁶⁷	31
Figure 9- Les cinq voies d'évolution de l'infection tuberculeuse. D'après ⁶¹	32
Figure 10- Seuils de détection des méthodes diagnostiques de la TB.....	34
Figure 11- Aspects des BAAR à l'examen microscopique.....	37
Figure 12- Aspect des colonies de <i>M. canetti</i> (lisses) <i>versus</i> aspect rugueux des colonies d'une souche de <i>Mtb stricto sensu</i> D'après ⁴⁷	37
Figure 13- Présentation des différentes technologies de PCR disponibles actuellement avec leurs avantages et inconvénients. D'après ⁸⁴	41
Figure 14- Estimation du nombre de cas incidents de TB résistante à la rifampicine (en milliers/an), tendances 2015-2021. Données de l'OMS, d'après ⁶²	45
Figure 15- Estimation de l'incidence de la TB MDR en 2021, pour les pays comptant au moins 1000 cas incidents.....	46
Figure 16- Répartition par groupe de pays de naissance des cas de TB MDR (souches reçues au CNR-MyRMA de 2006 au 1er semestre 2022)......	47
Figure 17- Structures représentatives de pompes d'efflux identifiées chez <i>Mtb</i> , D'après ¹⁰⁰	49
Figure 18- Caractéristiques génomiques des principales espèces bactériennes médiant la résistance aux antibiotiques. D'après ¹¹⁶	51
Figure 19- Taux de mutation spontanée <i>in vitro</i> pour les principaux antituberculeux. D'après ¹¹⁵	52
Figure 20- Mécanismes conduisant à l'apparition de l'hétérorésistance et facteurs influençant le degré de l'hétérorésistance. D'après ¹²²	55
Figure 21- Dynamique d'acquisition de la diversité génétique dans le contexte du traitement antimicrobien. D'après ¹²²	56
Figure 22- Distinction entre résistance, tolérance et persistance. D'après ¹³¹	58
Figure 23- La résistance aux antibiotiques chez <i>Mtb</i> est le résultat d'un réseau d'épistasie. D'après ¹⁶⁴	61
Figure 24- Mécanismes d'action du délamanide et mécanismes de résistance rapportés. D'après ²¹¹	67
Figure 25- Distribution des CMI d'une population sauvage et de haut ou bas-niveau de résistance à un antibiotique.....	74
Figure 26- Méthodes d'antibiogramme phénotypique pour tester la sensibilité aux antituberculeux de <i>Mtb</i>	74
Figure 27- Schéma de la plaque 96 puits UKMYC6 désignée par le consortium international CRYPTIC. D'après ²³²	75
Figure 28- Mesure des ECOFFs basée sur la distribution des CMI des souches sauvages par méthode de microdilution en plaque UKMYC6 (consortium international CRYPTIC). D'après ²³²	75

Figure 29- Spectre de détection de la résistance des principales techniques génotypiques utilisées actuellement pour le diagnostic de la résistance aux antituberculeux de première et de seconde ligne.....	82
Figure 30- Workflow standard du WGS chez MTBC. D'après ²⁷⁹	89
Figure 31- Représentation schématique des paramètres de couverture et de profondeur de séquençage.	91
Figure 32- Synthèse des différents paramètres qui influencent l'émergence et la détection de RAV chez <i>Mtb</i> . D'après ¹¹¹	93
Figure 33- Profondeurs de séquençage obtenues par réalisation du Deeplex Myc-TB® directement sur échantillon clinique. D'après ²⁷¹	96
Figure 34- Exemple de rapport de résultat du test Deeplex Myc-TB®	97
Figure 35- Sensibilité et spécificité du catalogue OMS pour la prédiction de la résistance par antituberculeux. D'après ²⁹¹	100
Figure 36- Structure chimique des fluoroquinolones. D'après ²⁹⁸	103
Figure 37- Représentation schématique de la séquence organisée en domaines des sous-unités GyrA et GyrB formant l'hétérotétramère GyrA ₂ B ₂ . D'après ^{340, 337}	107
Figure 38- Représentation schématique de la structure de MfpA. D'après ³⁷⁵	116
Figure 39- Structure chimique de la bédaquiline.....	118
Figure 40- Phosphorylation oxydative et chaîne respiratoire chez <i>Mtb</i> . D'après ³⁹⁰	119
Figure 41- Représentation schématique de l'ATP synthase. D'après ³⁹³	121
Figure 42- Fixation de la BDQ sur l'ATP synthase de <i>M. smegmatis</i> . D'après ³⁹³	122
Figure 43- Régulation de la pompe d'efflux MmpS5-MmpL5 par son répresseur Rv0678 ⁴²⁷	127
Figure 44- Représentation du système de sécrétion de type VII basée sur la structure d'ESX-5 de <i>Mycobacterium xenopi</i>	135
Figure 45- Structure génétique des cinq loci <i>esx</i> et de l'opéron <i>espACD</i> chez <i>M. tuberculosis</i> H37Rv. D'après ⁴⁵⁰	136
Figure 46- Modélisation du système ESX-1. D'après ⁴⁵⁶	138
Figure 47- Représentation schématique des boucles impliquées dans la régulation de la sécrétion d'EsxA (ESAT-6) et d'EsxB (CFP-10). D'après ⁴⁵⁵	139
Figure 48- Rôles des systèmes de sécrétion de type VII dans la virulence de <i>Mtb</i> . D'après ⁴⁶⁵	141
Figure 49- Rôles des PDIM dans la virulence de <i>Mtb</i> . D'après ⁴⁷⁵	144
Figure 50- Représentation schématique du contexte et des objectifs du travail de thèse.....	149
Figure 51- Répartition géographique des 35 298 souches de MTBC dont les génomes ont été analysés dans l'étude de Napier <i>et al.</i> D'après ⁵⁸	373
Figure 52- Dendrogramme UPGMA de 155 génomes de souches appartenant à la lignée 4 (database CNR-MyRMA).....	377
Figure 53- Représentation schématisée du locus <i>esx-1</i> chez <i>Mtb</i> , d'après ⁴⁵⁷	380
Figure 54- Comparaison des régions promotrices des gènes <i>eis</i> , <i>fabG-inhA</i> (promoteurs publiés) et de la région promotrice putative d' <i>espK</i>	382
Figure 55- Résultats obtenus à l'issue du 1 ^{er} protocole de qPCR pour les gènes <i>espK</i> et <i>esxA</i>	383
Figure 56- Résultats obtenus à l'issue du 2 ^{ème} protocole de qPCR pour les gènes <i>espK</i> et <i>esxA</i>	384
Figure 57- Duplications de grande taille décrites chez MTBC	389
Figure 58- Structure de l'opéron <i>mfpAE</i> de plusieurs mycobactéries. D'après ⁵³³	392
Figure 59- Structures de l'opéron <i>mfpAE</i> de <i>Mtb</i>	393
Figure 60- Représentation schématique de l'interaction des protéines Mfp et de leurs rôles putatifs.	393
Figure 61- Rôle de MfpD dans la résistance aux FQ médiée par MfpA chez <i>Mtb</i> . D'après ⁵³³	394

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1- Correspondances entre les différentes nomenclatures utilisées pour la phylogénie de MTBC, pour les lignées adaptées à l'homme..	26
Tableau 2- Performances de détection de MTBC dans les prélèvements comparativement à la culture.....	40
Tableau 3- Régime des TB à bacilles MDR et XDR selon les recommandations de l'OMS. .	44
Tableau 4- Mécanismes d'action des antituberculeux, gènes impliqués dans la résistance, et mécanismes compensatoires.	69
Tableau 5- Concentrations critiques définies par l'OMS selon le milieu de culture	76
Tableau 6- Principaux tests actuellement disponibles pour l'antibiogramme génotypique (gDST) de <i>Mtb</i> : méthodologie, délai de rendu des résultats, avantages et inconvénients, cibles moléculaires et performances de détection de l'hétérorésistance et de la résistance et par antituberculeux..	83
Tableau 7- Comparaison des numérotations chez <i>E. coli</i> et <i>Mtb</i> de la région déterminant la résistance aux quinolones (QRDR) de GyrA.	109
Tableau 8- Comparaison des différents systèmes de numérotation de GyrB décrits dans la littérature	110
Tableau 9- Protéines PE/PPE : mécanisme de sécrétion et rôle suspecté chez <i>Mtb</i>	147
Tableau 10- Données épidémiologiques, cliniques et microbiologiques relatives aux souches du cluster T3-Congo.....	375
Tableau 11- Variants communs et spécifiques aux isolats du cluster T3-Congo.....	379

LISTE DES ABREVIATIONS

BAAR : bacille acido-alcoolique résistant
bp : paire de bases
BDQ : bédaquiline
CC : concentration critique
CFZ : clofazimine
CMB : concentration minimale bactéricide
CMI : concentration minimale inhibitrice
CNR-MyRMA : Centre National de Référence des Mycobactéries et de la Résistance des Mycobactéries aux Antituberculeux
CRyPTIC : *Comprehensive Resistance Prediction for Tuberculosis : An International Consortium*
ECOFF : *Epidemiological Cut-Off Value*
FQ : fluoroquinolones
ITL : infection tuberculeuse latente
IS : séquence d'insertion
kb : kilobase
LJ : Löwenstein-Jensen
LPA : line probe assay
MDR : multi-résistant
MGIT : *mycobacterial growth indicator tube*
MIRU : *mycobacterial interspersed repetitive units*
MLVA : *multilocus variable analysis*
MNT : mycobactérie non tuberculeuse
MOT : micro-organismes et toxines hautement pathogènes
Mtb : *Mycobacterium tuberculosis*
MTBC : *Mycobacterium tuberculosis complex*
MNT : Mycobactérie non tuberculeuse
NAAT : tests d'amplification des acides nucléiques
NGS : *next generation sequencing*
NSUV : *non-synonymous uncharacterized variant*
OADC : acide oléique, albumine, dextrose et catalase
Pb : paire de bases d'ADN
PCR : polymerase chain reaction
RAV : variant associé à la résistance
RD : région de différence
RR : résistant à la rifampicine
SNP : *single nucleotide polymorphisms*
SNV : *Single Nucleotide Variant*
SS : système de sécrétion
SST7 : système de sécrétion de type VII
TB : tuberculose
WGS : *whole genome sequencing*
XDR : ultra-résistant

LEXIQUE

ADN : L'acide désoxyribonucléique ou ADN est une macromolécule biologique présente dans toutes les cellules ainsi que chez de nombreux virus. L'ADN contient toute l'information génétique, appelée génome, permettant le développement, le fonctionnement et la reproduction des êtres vivants.

Alignement : Etape de l'analyse bio-informatique consistant à utiliser une approche algorithmique visant à faire correspondre au mieux les bases nucléotidiques consécutives d'une séquence avec une autre séquence ou un autre génome (généralement un génome de référence, « *mapping* ») dans le but de d'identifier la variation génétique à partir de la référence.

Aligneur BWA : Outil d'alignement (*mapping*) de lectures (ou *reads*) issu du séquençage sur le génome de référence. Ces lectures une fois alignées sur le génome de référence, cet outil permet de détecter les variants génétiques de l'isolat étudié vis à vis du génome de référence.

Allèle : Dans une population, on peut avoir plusieurs allèles d'un gène, représentant plusieurs formes alternatives (ou version) du même gène. La fréquence d'un allèle est la fréquence de cette version de gène au sein de la population générale.

Amplicon : Un amplicon est un fragment d'ADN amplifié par PCR (réaction en chaîne par polymérase).

Annotation : Est le fait de documenter une variation génétique ou un gène avec des informations issues de bases de données.

Appel des bases (*base calling*) : Identification des bases. L'appel des bases est le processus qui permet de convertir les images de fluorescence détectées par le séquenceur en base d'ADN.

ARN : Acide nucléique essentiel dans le transport du message génétique et la synthèse des protéines.

Base : L'ADN est constitué de 4 bases (A,T,G,C) qu'il est possible de séquencer.

Brin : L'ADN est constitué de 2 brins complémentaires. Ces brins portent les bases de l'ADN.

Cluster : Un cluster consiste à amplifier le fragment d'ADN de nombreuses fois afin d'atteindre une taille suffisante pour que la détection de fluorescence soit possible par le séquenceur. C'est à dire le regroupement d'une même séquence au même endroit.

Couverture du génome : Pourcentage de bases nucléotidiques du génome de référence couvertes à une profondeur donnée par le séquençage du génome de l'isolat. En d'autres termes, cela représente dans quelle proportion le génome est couvert par les *reads*.

Délétion : Correspond à une perte de matériel génétique (de bases d'ADN).

Fichier BAM (*Binary of SAM*) : Le fichier BAM utilise les données du fichier SAM qu'il compresse à la façon d'un ZIP.

Fichier SAM (*Sequence Alignment Map*) : Le fichier SAM rassemble des séquences, les positions dans le génome de référence, des informations sur la qualité des séquences et d'autres informations concernant l'alignement.

Fichier VCF (*Variant calling format*) : Le Fichier VCF contient l'ensemble des variations retrouvées dans le génome de l'isolat comparé au génome de référence.

Flowcell : Une *flowcell* est le support de séquençage. L'ADN s'hybride sur la *flowcell* et la réaction de séquençage peut débuter.

Format FASTQ et FASTA : Le format FASTA est un fichier texte contenant la séquence des bases séquencées par *read*. Le « Q » de FASTQ signifie qu'un score de qualité (en Phred) est associé à chaque base séquencée. Cette information est essentielle pour interpréter les variations génétiques retrouvées.

GC% : Proportion de bases nucléotidiques du génome correspondant à une guanine (G) ou à une cytosine (C). Plus le GC% est élevé, plus le séquençage du génome est complexe.

Gène : Unité composée d'ADN localisée sur un chromosome et constituant le vecteur de l'hérédité. Un gène code pour une protéine, qui a une fonction dans l'organisme.

Génome : Le génome constitue l'ensemble du matériel génétique d'un organisme.

Génome de référence : Le génome de référence est utilisé comme « canevas » pour l'étape d'alignement et comme référence pour l'étape de *variant calling*.

Génotype : Le génotype d'un gène est sa composition allélique.

Indel : Mot-valise utilisé en génétique et en bio-informatique pour désigner une insertion ou une délétion dans une séquence biologique (acide nucléique ou protéine) par rapport à une séquence de référence. Ce terme désigne les petites insertions et délétions (<50 pb).

k-mers : Les k-mers sont une sous-séquence de longueur k d'une séquence d'ADN. Ils sont utilisés par les outils d'alignement de séquence dans le séquençage génomique.

Librairie : Préparation de l'ADN génomique qui sert de support au NGS (Illumina). La librairie est obtenue par fragmentation de l'ADN génomique afin d'obtenir des fragments d'une taille bien spécifique. Des adaptateurs sont ensuite ajoutés à chaque extrémité des fragments pour permettre le séquençage sur la *flowcell*.

MAPQ : MAPQ représente un score de qualité de l'alignement des lectures sur le génome de référence.

NGS (Next Generation Sequencing). Synonyme : Séquençage Haut Débit, ou séquençage massivement parallèle. Il s'agit de la nouvelle génération de séquençage. Il est actuellement basé majoritairement sur l'analyse du séquençage de courts fragments d'ADN (150 bases) (séquençage *short-read*, technologie Illumina).

Nucléotide : Un nucléotide est une molécule organique qui est l'élément de base d'un acide nucléique tel que l'ADN ou l'ARN.

PCR (Polymerase Chain Reaction) : Il s'agit d'un processus biochimique qui a révolutionné la génétique en permettant d'amplifier des séquences d'ADN. L'amplification de l'ADN a permis notamment de pouvoir le séquencer et de l'analyser à grande échelle.

Phénotype : Ensemble des caractères apparents (pour les bactéries, par exemple sensibilité à un antibiotique donné) (opposé au génotype).

Phred (score) : Les scores de qualité Phred sont utilisés pour l'estimation de la qualité des séquences.

Pipeline : Un *pipeline* est une succession de tâches. Ici, il s'agit de détecter et classer toutes les anomalies génétiques – appelées variants – de l'ADN, afin de trouver la (ou les) mutations responsable(s) du phénotype observé. Ces opérations sont réalisées en plusieurs étapes par une suite de logiciels de traitement automatique : le *pipeline* bio-informatique.

Profondeur : Locale, il s'agit du nombre de fois qu'une base du génome a été séquencée à une position donnée (nombre de *reads* qui couvrent cette position) ; plus la profondeur est importante, plus une

mutation identifiée sera fiable. La profondeur moyenne correspond au nombre total de bases séquencées pour une portion du génome considéré, par exemple sur le nombre de bases de la librairie.

Read (lecture) : Il s'agit du séquençage d'un fragment d'ADN.

Séquençage : Le séquençage de l'ADN consiste à déterminer l'ordre d'enchaînement des nucléotides pour un fragment d'ADN donné.

Séquençage en haute profondeur ou séquençage profond (*deep sequencing*) : Le séquençage en haute profondeur signifie qu'un très grand nombre de lecture de l'ADN est réalisée afin de pouvoir détecter des variations génétiques présentes dans l'échantillon à faible fréquence.

Séquençage Sanger : Le séquençage Sanger est une méthode historique de séquençage de l'ADN et a constitué la méthode de référence pendant environ 30 ans.

Séquenceur à lecture longue (*long read*) : Les séquenceurs à lecture longue constitue la 3ème génération de séquenceurs, succédant au séquençage massivement parallèle. Ils sont actuellement en développement et ont pour particularité de pouvoir séquencer de longues molécules d'ADN, et ainsi d'outrepasser la principale limitation technique du séquençage de 2ème génération (analyse des régions avec séquences répétées et recherche de variants structuraux). Par contre, ces technologies de séquençage génèrent un plus grand nombre d'erreurs de *base calling*.

SNP : *Single Nucleotide Polymorphism*

SNV : *Single Nucleotide Variant*, variation d'un seul nucléotide (variation ponctuelle) comparativement à une séquence de référence.

Targeted NGS (NGS ciblé) : NGS de régions spécifiques d'un génome donné. En général, cela correspond à un panel de gènes qui sont connus ou suspectés comme associés à un phénotype donné.

Variant : variation génétique par rapport à la séquence d'un génome de référence. Ce terme regroupe les SNV, les InDels, mais aussi les variants structuraux (délétion/insertion > 50 pb). Cette variation peut avoir ou non un impact fonctionnel.

Variation de structure (variant structural) : Une variation de structure est un type de variation génétique. Il s'agit d'une variation qui entraîne le changement de conformation structurelle de l'ADN, de taille plus grande que 50 paires de bases d'ADN.

Variation ponctuelle : Une variation ponctuelle est un type de variation génétique. Il s'agit d'un changement d'une ou de quelques bases de l'ADN.

WGS (*Whole genome Sequencing*) : séquençage du génome complet. Processus consistant à séquencer le génome entier d'un organisme donné en faisant appel au NGS.

AVANT-PROPOS

Ce projet s'inscrit dans les thématiques développées par l'équipe d'accueil en étroite collaboration avec le Centre National de Référence des Mycobactéries et de la Résistance des Mycobactéries aux Antituberculeux (CNR-MyRMA).

Par ailleurs, ce travail s'inscrivait dans un contexte où l'équipe d'accueil souhaitait (i) améliorer la lutte contre l'émergence et la dissémination des TB MDR et XDR et (ii) développer et accroître l'utilisation des approches génomiques au laboratoire.

Ainsi, les deux objectifs de ce travail entraient dans ce cadre :

1. permettre la mise en place d'un traitement efficace le plus rapidement possible pour limiter la durée de contagiosité des patients infectés avec les souches de *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) résistantes grâce à un diagnostic moléculaire précoce et fiable de la résistance aux antituberculeux,
2. comprendre les mécanismes de dissémination des souches et explorer les chaînes de transmission afin d'identifier des pistes pour stopper la dissémination.

Ce projet était aussi le fruit d'une étroite collaboration entre la directrice et le co-directeur de cette thèse, Alexandra Aubry et Wladimir Sougakoff. Ce dernier avait à cœur d'étendre les thématiques de recherche de l'équipe, jusque-là centrées sur l'étude des mécanismes d'action et de résistance aux antimycobactériens, vers l'étude de mécanismes de dissémination et de virulence de *Mtb*. Son décès, survenu au cours de ce travail de thèse, nous a fait envisager de focaliser ce manuscrit sur le premier objectif concernant la résistance. Cependant, bien que le travail concernant le deuxième objectif soit moins développé et moins abouti, nous avons tout de même souhaité le présenter dans ce manuscrit. La poursuite de cet objectif ambitieux nécessitera des travaux complémentaires.

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

1. *Mycobacterium tuberculosis complex* et tuberculose

1.1. Caractéristiques des mycobactéries

Les mycobactéries sont des bacilles fins (0,2 à 0,3 μm de large par 2 à 5 μm de long), légèrement incurvés, non sporulés, immobiles et aérobies. Plusieurs caractéristiques permettent de les différencier des autres bactéries :

1. **un temps de division plus long.** Celui-ci varie entre les espèces : allant de 3-4 heures pour *Mycobacterium smegmatis*, 24 heures pour *Mtb*, et jusqu'à 13 jours pour *Mycobacterium leprae* (versus 20 minutes pour *Escherichia coli*). La vitesse de croissance permet de classer les mycobactéries en deux groupes :
 - a. **mycobactéries à croissance lente**, pour lesquelles la durée nécessaire pour obtenir des colonies visibles sur un milieu de culture solide est supérieure à sept jours : *Mtb*, *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium avium complex*.
 - b. **mycobactéries à croissance rapide**, pour lesquelles cette durée est inférieure à sept jours. On peut citer parmi celles-ci *M. smegmatis*, *Mycobacterium fortuitum complex*, *Mycobacterium abscessus*, ou encore *Mycobacterium chelonae* ¹.
2. **une paroi particulièrement épaisse et de composition caractéristique (Figure 1).** Cela est lié à sa richesse en lipides de haut poids moléculaire, les acides mycoliques, qui représentent 30 à 40% du poids sec de la paroi. Cette composition particulière de la paroi des mycobactéries leur permet d'être imperméables à l'acide et à l'alcool (aspect de bacilles acido-alcool résistants (BAAR) à la coloration de Ziehl-Neelsen), mais aussi aux défenses bactéricides de l'hôte, aux désinfectants, à certains antibiotiques, et aux bases fortes. Comme nous le reverrons par la suite, cette paroi très épaisse complexifie aussi les processus d'extraction des acides nucléiques et des protéines (§ 2.7.2.3.3 Séquençage du génome complet)

3. **la nécessité de milieux de culture riches** (sérum, glycérine, de la pomme de terre glycérinée, œuf, albumine bovine, etc.) pour la croissance *in vitro*.
4. **un génome à GC% élevé**, compris entre 61 à 71% de G (guanine) + C (cytosine) contre 56% chez *E. coli*, à l'exception de *M. leprae* dont le GC% est de 57,8%, le plus bas du genre *Mycobacterium* ².

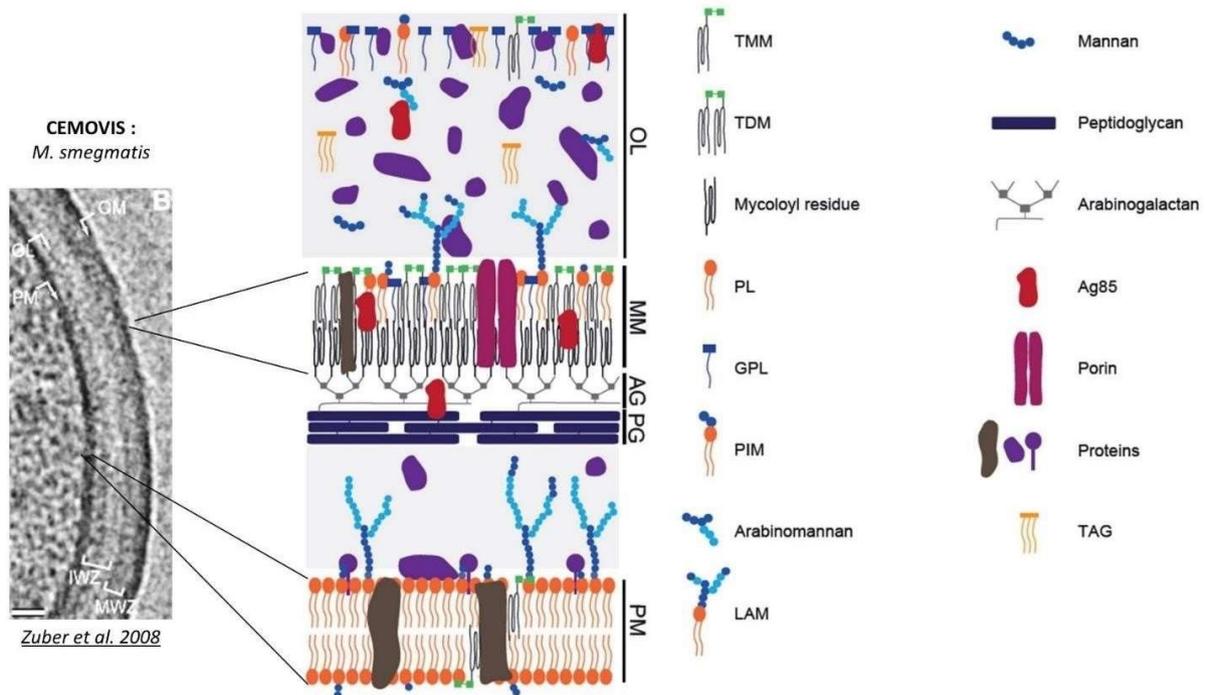


Figure 1- Représentation schématique de la paroi des mycobactéries, d'après ³.

L'image de la paroi mycobactérienne obtenue par cryo-électromicroscopie CEMOVIS montre deux membranes d'épaisseur similaire. La couche externe (OL) est constituée principalement de protéines, de peu de glucides et de lipides en très faible quantité. La paroi cellulaire est un complexe composé de la membrane externe, appelée mycomembrane (MM), d'arabinogalactane (AG) et de peptidoglycane (PG). Le feuillet interne de la MM est constitué d'acides gras à très longues chaînes (acides mycoliques) estérifiant l'AG, qui à son tour est fixé de manière covalente au PG. Le feuillet externe de la MM est vraisemblablement composé de lipides tels que des phospholipides, des mycolates de tréhalose, des glycopeptidolipides et des lipoglycane. Un espace périplasmique, composé de phospholipides et de protéines, sépare la paroi cellulaire de la membrane plasmique (PM) dont l'épaisseur est étonnamment similaire à celle de la MM, soit environ 7-8 nm, malgré la présence des acides mycoliques à très longues chaînes. Les tailles respectives des différents compartiments de l'enveloppe indiquées sur le schéma sont basées sur les données de CEMOVIS, sauf celle de l'OL, qui est adaptée de la cryo-microscopie. Pour plus de clarté, les molécules ne sont pas dessinées à l'échelle.

TMM : monomycolates de tréhalose ; TDM : tréhalose dimycolates ; GPL : glycopeptidolipides; PL : phospholipides ; PIM : phosphatidyl-myo-inositolmannosides LAM : lipoarabinomannanes ; TAG : triacylglycérols ; Ag85 : antigène 85.

1.2. Taxonomie et phylogénie au sein du genre *Mycobacterium*

Les mycobactéries font partie du domaine *Bacteria*, clade des *Terrabacteria*, phylum des *Actinobacteria*, classe des *Actinobacteria*, ordre des *Corynebacteriales* et famille des *Mycobacteriaceae*.

Jusqu'en 2018, toutes les mycobactéries appartenait au même genre, le genre *Mycobacterium*. En 2018, Gupta *et al.* a proposé une nouvelle taxonomie des mycobactéries, en utilisant la théorie des synapomorphies ⁴. Les synapomorphies sont des marqueurs moléculaires apparus précocement chez un ancêtre commun et qui se sont ensuite transmis verticalement aux descendants. Cinq genres distincts, dont quatre nouveaux genres comprenant uniquement des mycobactéries non tuberculeuses (MNT) sont proposés (**Figure 2**) :

- *Mycobacterium* (étendu), comprenant les espèces du complexe *tuberculosis*, du complexe *avium*, *M. xenopi* et *M. kansasii*,
- *Mycobacteroides* (par exemple *M. abscessus*),
- *Mycolicibacter* (par exemple *M. terrae*),
- *Mycolicibacterium* (par exemple *M. fortuitum*, *M. smegmatis*),
- *Mycolicibacillus* (par exemple *M. trivalis*).

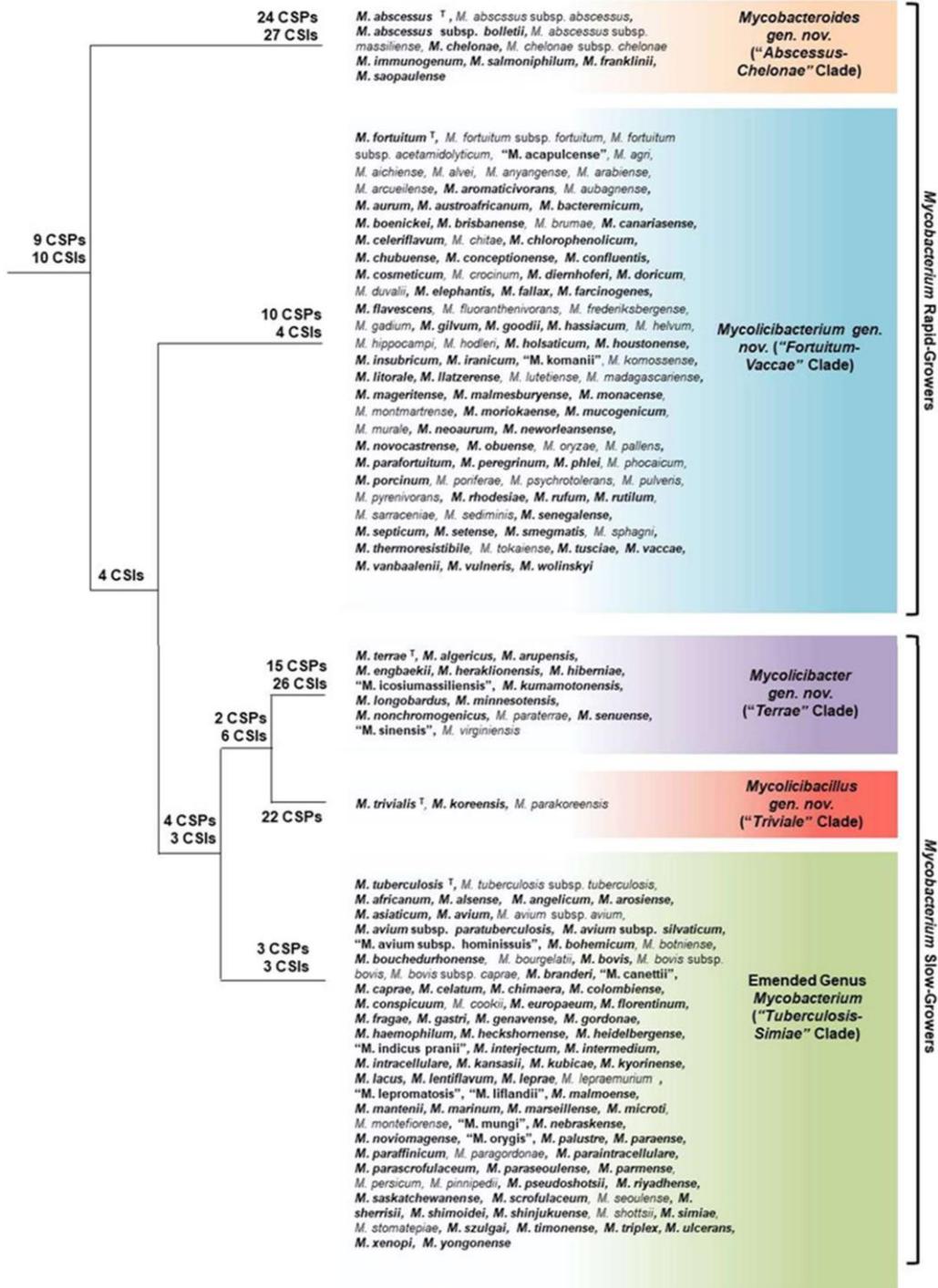


Figure 2- Arbre phylogénétique des nouveaux genres mycobactériens, basée sur une étude phylogénomique, d'après ⁴.

Cette étude est basée sur la théorie des synapomorphies, avec les numéros des CSIs (*Conserved Signature Indels*) et des CSPs (*Conserved Signature Proteins*) identifiés, spécifiques aux différents clades, indiqués sur les nœuds. Les noms des cinq genres (*Mycobacterium*, *Mycobacteroides*, *Mycolicibacter*, *Mycolicibacterium* et *Mycolicibacillus*) et des cinq clades dont ils découlent (*Tuberculosis-Simiae*, *Terrae*, *Triviale*, *Fortuitum-Vaccae* et *Abscessus-Cheloniae*), ainsi que les espèces appartenant à ces genres sont indiqués. Les espèces dont les génomes ont été analysés dans cette étude sont en gras. La lettre T en exposant à côté du nom d'une espèce signifie qu'il s'agit de l'espèce type du genre. Les espèces dont les noms ne sont pas en italique et qui sont placés entre guillemets n'avaient pas été encore publiées au moment de l'étude.

Bien que la méthodologie employée dans l'étude de Gupta *et al.* soit robuste, et que la phylogénie proposée soit superposable à celle établie par d'autres approches phylogénomiques dont celle de référence de Tortoli *et al.* ⁵ (**Figure 3**), certaines erreurs ont été relevées et des critiques formulées ⁶ :

- quatre génomes de cette étude n'étaient pas attribués à la bonne espèce mycobactérienne (*M. rhodesiae*, *M. szulgai*, *M. tusciae* and *M. vulneris*),
- cette nouvelle nomenclature se limite à 150 espèces dont Gupta *et al.* a étudié les génomes issus de NCBI,
- Cette nouvelle nomenclature n'apporte pas de bénéfice sur le plan de la mycobactériologie clinique, et au contraire, peut même potentiellement être source de confusion.

Du fait de ces limites, et bien que cette nouvelle nomenclature ait été reconnue par l'ICSP (*International Committee on Systematics of Prokaryotes*), cette nouvelle taxonomie n'est pas utilisée en routine par les microbiologistes, et encore moins par les cliniciens. Elle n'est d'ailleurs pas encore employée dans la database de MSP (spectre principal ou spectre de référence) de spectrométrie de masse Bruker, utilisée en mycobactériologie clinique pour l'identification, mais l'est dans certaines databases dont celle de GenBank.

Suivant le cadre nosologique, au sein des mycobactéries, on peut distinguer :

- les mycobactéries pathogènes strictes :
 - **mycobactéries du complexe *tuberculosis***, responsables de la tuberculose (TB). Ce complexe sera détaillé dans le paragraphe suivant.
 - ***M. leprae* et *Mycobacterium lepromatosis***, responsables de la lèpre. La lèpre est une maladie chronique, dont 80% des 200 000 cas mondiaux en 2019 étaient diagnostiqués au Brésil, en Inde et en Indonésie. Le nombre de cas a été drastiquement réduit grâce au traitement par l'association de plusieurs antibiotiques. L'OMS a ainsi qualifié la lèpre de maladie tropicale négligée ⁷. La lèpre affecte principalement la peau et les nerfs périphériques, *M. leprae* envahissant les histiocytes du derme et les cellules de Schwann des nerfs périphériques ⁸. L'analyse du génome de *M. leprae* a révélé un phénomène important d'évolution réductive, avec environ 1600 pseudogènes et la perte d'environ 50% des gènes ancestraux ². *M. lepromatosis* a été identifié en 2008 et se distingue de *M. leprae* par 9% de différence au niveau du génome ^{9,10}. Cet

espèce est endémique au Mexique ¹¹ mais a également été décrite à Singapour ¹² au Canada ¹³, et en Colombie ¹⁴.

- Les mycobactéries pathogènes opportunistes, aussi appelées **mycobactéries non tuberculeuses** (MNT), agents des mycobactérioses. On dénombre près de 200 espèces de MNT (**Figure 3**), dont une vingtaine environ ont été rapportées chez l'homme, le plus souvent à la faveur d'une immunodépression de l'hôte et/ou d'une maladie respiratoire chronique, et/ou d'une inoculation ¹⁵. Il n'existe pas de données chiffrées précises sur l'épidémiologie mondiale des infections à MNT, mais différentes études semblent montrer une augmentation des infections pulmonaires ^{16, 17, 18}. Le réservoir des MNT est principalement environnemental, et il n'y a pas de transmission interhumaine rapportée ¹⁹. Les mycobactérioses chez l'homme se manifestent principalement par des atteintes pulmonaires ou cutanées ¹⁵. Cependant, elles peuvent atteindre quasiment tous les organes et peuvent aussi se présenter sous la forme d'infections disséminées, notamment en cas d'immunodépression profonde, telle que rencontrée chez les patients au stade SIDA. Les MNT peuvent entraîner au départ une simple colonisation, ainsi le diagnostic de l'infection peut ne pas être aisé, la frontière pouvant être tenue entre infection et colonisation. Ainsi, des critères diagnostiques ont été établis pour les mycobactérioses respiratoires ; ceux-ci reposent sur un trépied d'arguments cliniques, radiologiques et microbiologiques ^{15, 20}. En effet, le diagnostic approprié de l'infection est crucial, car le traitement des mycobactérioses est long (en général durée d'un an après négativation des cultures), et nécessite l'association de plusieurs antibiotiques. Chez l'homme, les mycobactérioses sont le plus souvent provoquées par les espèces du complexe *M. avium* et du complexe *M. abscessus*, et plus rarement par *M. xenopi*, *M. simiae*, *M. szulgai*, *M. kansasii*, *M. chelonae*, *M. marinum*, *M. ulcerans*, et par le complexe *M. fortuitum* ²¹.



Figure 3- Arbre phylogénétique du genre *Mycobacterium* (méthode UPGMA) d'après. ⁵. La longueur des branches est basée sur la distance d'identité nucléotidique moyenne entre les génomes (*Average Nucleotide Identity (ANI)* by pairwise comparison).

1.3. Le complexe *Mycobacterium tuberculosis*

1.3.1. Présentation des espèces du complexe *tuberculosis*

Les caractéristiques des espèces du complexe sont présentées ci-après (**Figure 4**) :

- les espèces **adaptées à l'homme** :
 - principalement *Mycobacterium tuberculosis stricto sensu (Mtb)*, comprenant cinq lignées phylogénétiques majeures (lignées 1 à 4 et lignées 7 et 8) ^{22, 23}. Les lignées 7 et 8 sont des écotypes très particuliers limités à une région particulière du monde, principalement en Ethiopie pour la lignée 7 ²⁴, et dans la région des Grands Lacs Africains pour la lignée 8 ²³.
 - *Mycobacterium africanum*, qui comprend trois lignées (5, 6 et tout récemment identifiée la lignée 9) ^{22, 25}. *Mycobacterium africanum* (dénommé au départ « bacille tuberculeux de type africain »), a été découvert en 1966 par Castets chez des patients de Dakar ²⁶. Ce sont notamment les caractères cultureux intermédiaires entre *Mtb* et *Mycobacterium bovis* (vitesse de croissance lente, aspect des colonies, caractères biochimiques) qui ont conduit à l'individualisation de cette espèce, mais aussi un aspect épidémiologique, à savoir que *M. africanum* est identifié chez des patients nés ou en provenance d'Afrique de l'Ouest.
- les espèces **adaptées à l'animal** et pouvant infecter l'homme (zoonoses, 140 000 cas de TB d'origine zoonotique en 2019 selon l'OMS) ²⁷ :
 - celles qui sont isolées principalement chez des **mammifères domestiques** mais aussi chez des mammifères sauvages qui peuvent représenter des réservoirs ²⁸ : *M. bovis* et *Mycobacterium caprae*. *M. bovis* a été identifié chez le bétail (« bovine tubercle bacillus ») ²⁹, et a été déclarée espèce à part entière de *Mtb* en 1968 sur la base de sa vitesse de croissance plus lente, du caractère dysgonique des colonies et d'une pathogénicité accrue chez le lapin ^{30,31}. De plus, on note une résistance naturelle au pyrazinamide. *M. bovis* BCG (Bacille de Calmette et Guérin) regroupe un ensemble de souches vaccinales dérivant d'une souche de virulence atténuée de *M. bovis*, obtenue à l'issue de multiples passages *in vitro* durant les années 1908-1921 à l'Institut Pasteur de Lille ³². Cette virulence atténuée est liée à délétion de la région RD1 comprenant un système de virulence

majeur de *Mtb*, le système ESX-1^{33,34}. Ce système sera détaillé plus loin dans le **chapitre 3 Virulence de *M. tuberculosis***. *M. bovis* BCG est ainsi utilisée comme vaccin contre la TB (appelé communément le BCG), mais aussi en instillation vésicale en traitement adjuvant de certaines formes de cancer de vessie (BCG-thérapie)^{35,36}. Dans de rares cas, des infections disséminées à *M. bovis* BCG, appelées BCGites, peuvent survenir dans certaines conditions : (i) déficits immunitaires concernant la phagocytose, ou les voies de sécrétion de l'IFN γ , (ii) réactivation chez les patients infectés par le VIH, et (iii) après BCG-thérapie. De très rares cas d'infections nosocomiales à *M. bovis* BCG ont été rapportés^{37,38}, ou fortement suspectés³⁹ (**Publication 1**).

- Des cas exceptionnels de transmission à l'homme ont été rapportés avec *Mycobacterium pinnipedii*, qui infecte les phoques et les lions de mer. Ces cas correspondaient à des infections tuberculeuses latentes (ITL) chez des soigneurs travaillant dans un zoo aux Pays-Bas et qui étaient en contact avec des lions de mer. La voie suspectée de transmission serait une aérosolisation générée lors du nettoyage des enclos⁴⁰. De façon intéressante, la présence d'ADN de *M. pinnipedii* a été identifiée chez des sujets appartenant à plusieurs populations précoloniales sur le continent Américain. Il a été suspecté que la transmission se serait faite *via* un mécanisme zoonotique, mais la mise en évidence récente d'ADN de *M. pinnipedii* chez des individus de l'époque précoloniale et vivant dans l'intérieur des terres au Pérou et en Colombie semble remettre en question cette hypothèse, ou du moins suggère un scénario plus complexe⁴¹.

- Les espèces **strictement adaptées à l'animal (écotypes)**, ayant infecté de façon primaire des **mammifères sauvages** : *Mycobacterium microti* (campagnols) ⁴², *Mycobacterium orygis* (antilope) ⁴³ et le « *Dassie Bacillus* » (*Daman des rochers* ou *Procavia capensis*, appelé dassie en Afrique du Sud, petit mammifère retrouvé majoritairement en Afrique) ⁴⁴. Plus récemment, ont été mises en évidence des lignées proches du *Dassie Bacillus*, (i) *Mycobacterium mungi* (identifié chez des mangoustes au Botswana) ⁴⁵, et (ii) *Mycobacterium suricattae* (identifié chez le suricate dans le désert de Kalahari en Afrique du Sud) ⁴⁶, et enfin, (iii), le « *Chimpanzee Bacillus* », identifié en 2009 chez une femelle chimpanzé adulte dans le cadre d'un programme d'étude en Côte d'Ivoire, lignée « animale » la plus proche de la lignée 6 (*M. africanum*).
- Enfin, *Mycobacterium canetti*, ou « *smooth tubercle bacillus* », du fait de l'aspect lisse des colonies, **peut être classé à part**. En effet, il est considéré comme faisant partie du complexe *tuberculosis* du fait de son pourcentage d'identité nucléotidique. Cependant, il semble que son réservoir serait plutôt **environnemental** ⁴⁷ entraînant occasionnellement des infections opportunistes chez l'homme. L'hypothèse de ce réservoir environnemental est étayée par le fait que d'une part, aucun cas de transmission interhumaine n'a été rapporté avec *M. canetti*, et que d'autre part, il existe d'importants échanges génétiques horizontaux chez *M. canetti* ⁴⁸. *M. canetti* a été isolé pour la première fois chez un jeune fermier normand âgé de 20 ans atteint de TB pulmonaire et identifié par Georges Canetti en 1969. Cependant, cette origine ne peut être affirmée avec certitude, notamment car cette découverte n'a pas fait l'objet de description formelle (peut-être en raison du décès de Georges Canetti en 1971). Les descriptions cliniques de TB à *M. canetti* sont principalement issues de patients ayant séjourné dans la Corne de l'Afrique, en particulier à Djibouti. En 1987, l'étude de la composition de la paroi de *M. canetti* révèle la présence d'un lipide caractéristique (triglycosyl phenol-phthiocerol), absent chez *Mtb*, mais retrouvé chez *M. bovis* et *M. kansasii* ⁴⁹. La grande diversité génétique de *M. canetti* a pu être étudiée notamment grâce à la collection de souches isolées chez des militaires français stationnés à Djibouti, constituée par le Service de Santé des Armées, et par une étude génomique en 2013 ⁴⁸. En 2002, l'étude des délétions au sein du complexe *tuberculosis* menée par Brosch *et al.* a montré que *M. canetti* constitue un groupe à part ⁵⁰. Une étude phylogénomique a permis de monter 10 ans plus tard que les isolats de *M. canetti* présentaient une

ramification évolutive précoce, avec un génome de plus grande taille et des systèmes CRISPR-Cas différents comparativement à *Mtb* ⁴⁸. L'hypothèse a été soulevée que *Mtb* aurait ainsi évolué à partir de *M. canettii* via l'acquisition de facteurs de virulence et de persistance supplémentaires ⁵¹.

Il est à noter que les espèces du complexe *tuberculosis* pourrait être requalifiées en sous-espèces ou variants au sein d'une seule espèce, étant donné leur forte homologie ⁵². En effet, malgré les différences observées concernant les caractères biochimiques, cultureux, ou même de pouvoir pathogène entre les différents hôtes, la frontière entre ces différentes « espèces » s'est avérée être tenue ⁵³.

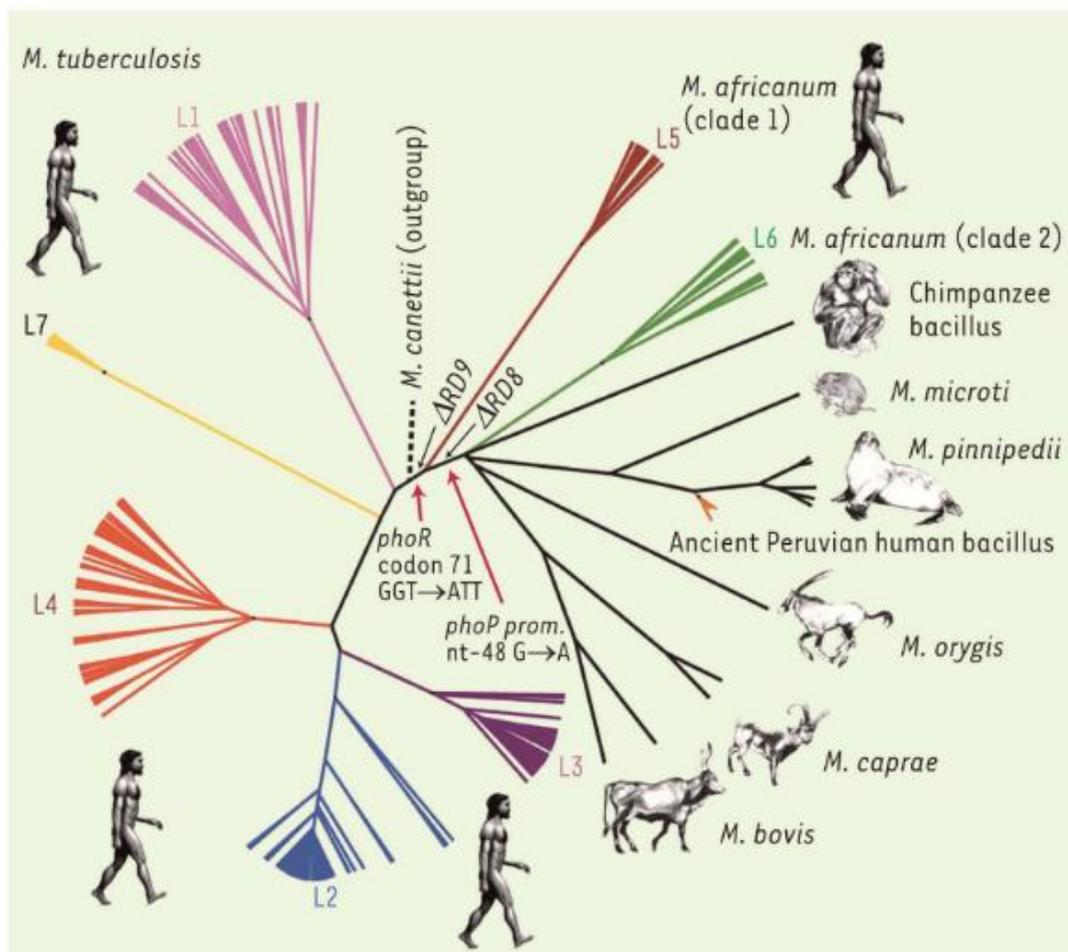


Figure 4- Phylogénie du complexe *tuberculosis*. Les lignées 7, 8 et 9 ne sont pas représentées ici. Les délétions spécifiques à l'animal et à *M. africanum* sont indiquées, ainsi que les mutations affectant le régulateur de virulence PhoP/R. D'après ⁵⁴.

1.3.2. Etude de la phylogénie du complexe *tuberculosis*

La différenciation entre les différentes lignées ou le génotypage des souches de *M. tuberculosis complex* (MTBC) est utile dans la lutte contre la dissémination de la TB, permettant entre autres d'identifier des chaînes de transmission de souches multirésistantes. Le génotypage peut être réalisé au moyen de différentes techniques, plus ou moins complexes à mettre en œuvre, plus ou moins reproductibles et possédant une résolution (c'est-à-dire un pouvoir discriminant) plus ou moins important. Ces différentes techniques ont généré des nomenclatures différentes, pouvant être source de confusion. Un tableau avec les correspondances entre les différentes nomenclatures est présenté ici (**Tableau 1**). On peut distinguer les méthodes utilisées avant l'avènement du séquençage génomique (WGS, *whole genome sequencing*) à haut débit (NGS, *next generation sequencing*) et celles basées sur le NGS.

1.3.2.1. Méthodes « pré-NGS »

Le génotypage a d'abord été réalisé par des méthodes telles que l'analyse des séquences d'insertion (IS6110 RFLP, *restriction length polymorphism*) ou des régions de différences (RD).

Ces méthodologies ont ensuite été relayées par celles basées sur la PCR. Parmi ces techniques, le spoligotypage a l'avantage d'être plus rapide, et d'être reproductible. Cette méthode peut être utilisée pour la phylogénie, mais aussi pour l'étude des chaînes de transmission. Elle est basée sur les polymorphismes dans les régions palindromiques courtes régulièrement espacées, les CRISPR. Plus précisément, la technique consiste à amplifier et à détecter la présence ou non de séquences non répétitives de 34 à 41 pb appelées « *spacers* », qui se trouvent entre des séquences conservées appelées « *direct repeats* » (DR) de la région CRISPR^{55,54}. Cette analyse permet de générer un code octal. La limite du spoligotypage est son manque de résolution, notamment pour la discrimination de souches de certaines lignées, telles que la lignée 2 (Beijing).

L'autre méthode de typage basée sur la PCR, le typage MLVA (*multilocus variable analysis*) MIRU (*mycobacterial interspersed repetitive units*)-VNTR (*Variable numbers of tandem repeats*), a un pouvoir discriminant supérieur au spoligotype, mais qui reste cependant insuffisant pour certains clades, notamment toujours au sein de la lignée 2 (Beijing), malgré l'ajout du MIRU hypervariable dans l'analyse. Tout comme le spoligotype, cette méthode peut être utilisée pour la phylogénie et l'étude des chaînes de transmission⁵⁵. La méthode repose sur

l'analyse des MIRU dispersés tout au long du génome de MTBC, avec un nombre variable de copies dans chaque locus ⁵⁶. Cette détermination permet de générer un code à 24 chiffres (24 loci sont étudiés) (+ 4 loci si détermination du MIRU hypervariable pour les souches Beijing), qui permet lui-même de déterminer le code MIRU. L'utilisation de valeurs numériques permet de standardiser facilement les résultats entre les différents laboratoires. Cet élément associé à son bon pouvoir discriminant ont fait que le typage MIRU-VNTR a été considéré jusqu'à peu comme la méthode de référence ⁵⁵.

1.3.2.2. Méthodes basées sur l'utilisation du NGS

Tout d'abord, il est à noter que le spoligotype (contrairement au MIRU-VNTR) peut être déterminé par WGS, ou même par la technique Deeplex Myc-TB[®], qui sera détaillée plus loin dans le manuscrit dans le **chapitre 2 Résistance de *Mycobacterium tuberculosis complex aux antituberculeux***.

L'avènement du séquençage génomique a permis d'apporter une résolution supérieure, aboutissant à une phylogénie et une nomenclature complexes avec la détermination de sous-lignées, qui est encore en évolution ^{54, 57, 58}. Cette phylogénie est illustrée par la **Figure 5** ⁵⁸. En effet, le WGS a permis de considérablement augmenter le nombre de souches étudiées, et ainsi d'explorer une distribution de zones géographiques plus large. Ainsi, de nouvelles lignées ont pu être mises en évidence récemment, telles que la lignée 8 pour *Mtb* ²³ et la lignée 9 pour *M. africanum* ²⁵.

Cependant, la puissance de discrimination plus forte du WGS pose aussi la question du problème de standardisation. La comparaison des souches par WGS peut être réalisée suivant deux approches : comparaison du *core genome*, notamment par la méthode du cgMLST ⁵⁹, ou comparaison basée sur le nombre de SNP de différence. Dans le cadre de cette dernière approche et dans un souci de standardisation, Coll *et al.* a proposé une liste de 62 SNP (*single nucleotide polymorphisms*) (*SNP barcoding*), permettant de classer les isolats dans les sept grandes lignées de MTBC adaptées à l'homme (lignées 8 et 9 non identifiées à l'époque) et 64 sous-lignées ⁵⁷. En 2020, Napier *et al.* ont proposé d'étendre cette liste à 90 SNP, permettant de couvrir les neuf lignées adaptées à l'homme, les lignées animales *M. bovis*, *M. caprae* et *M. orygis*, ainsi que 90 sous-lignées, en étudiant plus de 35 000 isolats ⁵⁸.

Tableau 1- Correspondances entre les différentes nomenclatures utilisées pour la phylogénie de MTBC, pour les lignées adaptées à l'homme. Basé sur 54, 60, 57, 23, 25, 61.

Ancienneté	Lignée (RD, SNP ^a)	Distribution géographique	RD et principales variations génétiques	Sous-lignée ^a (RD associées)	Spoligotype ^b	MIRU-VNTR			
Ancienne	L1 (Indo-Océanique)	Asie du Sud et du Sud Est Afrique de l'Est et Centrale	RD239	1.1	1.1.1	EAI4_VNM et EAI5	EAI		
					1.1.1.1	EAI4_VNM			
					1.1.2	EAI5 et EAI3_IND			
				1.1.3	EAI6 et EAI7				
				1.2	1.2.1	EAI2_MANILLA			
					1.2.2	EAI1_SOM			
Moderne	L2 (Est Asiatique) dont Beijing	Asie Centrale et de l'Est Europe de l'Est Afrique du Sud	TbD1 Souches Beijing modernes: insertion IS6110 dans région NTF, délétion dans <i>ppe38</i>	2.1 (non Beijing)		MANU et proto Beijing	Beijing		
				2.2 (RD105 RD207)	2.2.1			Beijing	
					2.2.1.1 (RD150)				
					2.2.1.2 (RD142)				
	L3 (Est Africaine-Indienne)	Afrique de l'Est et Centrale Asie du Sud et du Sud Est	TbD1, RD750	3		CAS1_DEHLI	Dehli/CAS		
				3.1		CAS sauf CAS1_DEHLI			
				3.1.1	CAS1-Kili				
					3.1.2	3.1.2.1		CAS2	
					3.1.2.2	CAS			
	L4 (Euro-Américaine)	Europe, Asie, Afrique, et continent Américain	TbD1, <i>pks15/1</i>	4		T1			
				4.1 (X-type)	4.1.1	4.1.1.1 (RD183)	X2	X	
						4.1.1.2	X1		
						4.1.1.3 (RD193)	X3 et X1		
				4.1.2	T1 et H1		Haarlem		
					4.1.2.1 (Haarlem) (RD182)	T1 et H1			
				4.2	4.2.1 (Ural)	H3 et H4		URAL	
					4.2.2	LAM7-TUR et T1			
					4.2.2.1 (TUR) (RD182)	LAM7-TUR		TUR	
				4.3 (LAM)	4.3.1	LAM9		LAM	
					4.3.2	LAM3			
						4.3.2.1 (RD761)	LAM3		
					4.3.3 (RD115)	LAM9 et T5			
					4.3.4 (RD174)	4.3.4.1	LAM1		
				4.3.4.2		LAM11-ZWE, LAM9, LAM1 et LAM4			
					4.3.4.2.1	LAM11-ZWE			
				4.4	4.4.1	4.4.1.1 (S-type)	S		S
						4.4.1.2	T1		
					4.4.2	T1 et T2			
				4.5		H3, H4 et T1			
				4.6	4.6.1 (RD724)	4.6.1.1	T2-Uganda		UgandaI-II
						4.6.1.2	T2		
						4.6.2	T3		
					4.6.2.1	T3			
		4.6.2.2 (Cameroon)	LAM10-CAM		Cameroon				
	4.7		T1 et T5						
	4.8 (RD219)		T1, T2, T3, T4_CEU et T5						
4.9 (H37Rv-like)		T1		H37Rv					
Ancienne	L5 (Ouest Africaine 1, <i>M. africanum</i>)	Afrique de l'Ouest	RD9, RD711		AFRI_2 et AFRI_3	West African 1			
	L6 (Ouest Africaine 2, <i>M. africanum</i>)	Afrique de l'Ouest	RD9, RD7, RD8, RD10, RD702, SNP dans <i>phoP</i>		AFRI et AFRI_1	West African 2			
Intermédiaire	L7 (Ethiopienne)	Ethiopie, Djibouti	RD3, RD11						
	L8	Région des Grands Lacs	RD3, RD5, RD14, <i>cobF</i>						
	L9 (<i>M. africanum</i>)	Afrique de l'Est	RD9, RD7, RD8, RD10						

^a Définis par Coll *et al.* 57; ^b D'après SITVITWEB ; RD : région de différence ; SNP : single nucleotide polymorphism

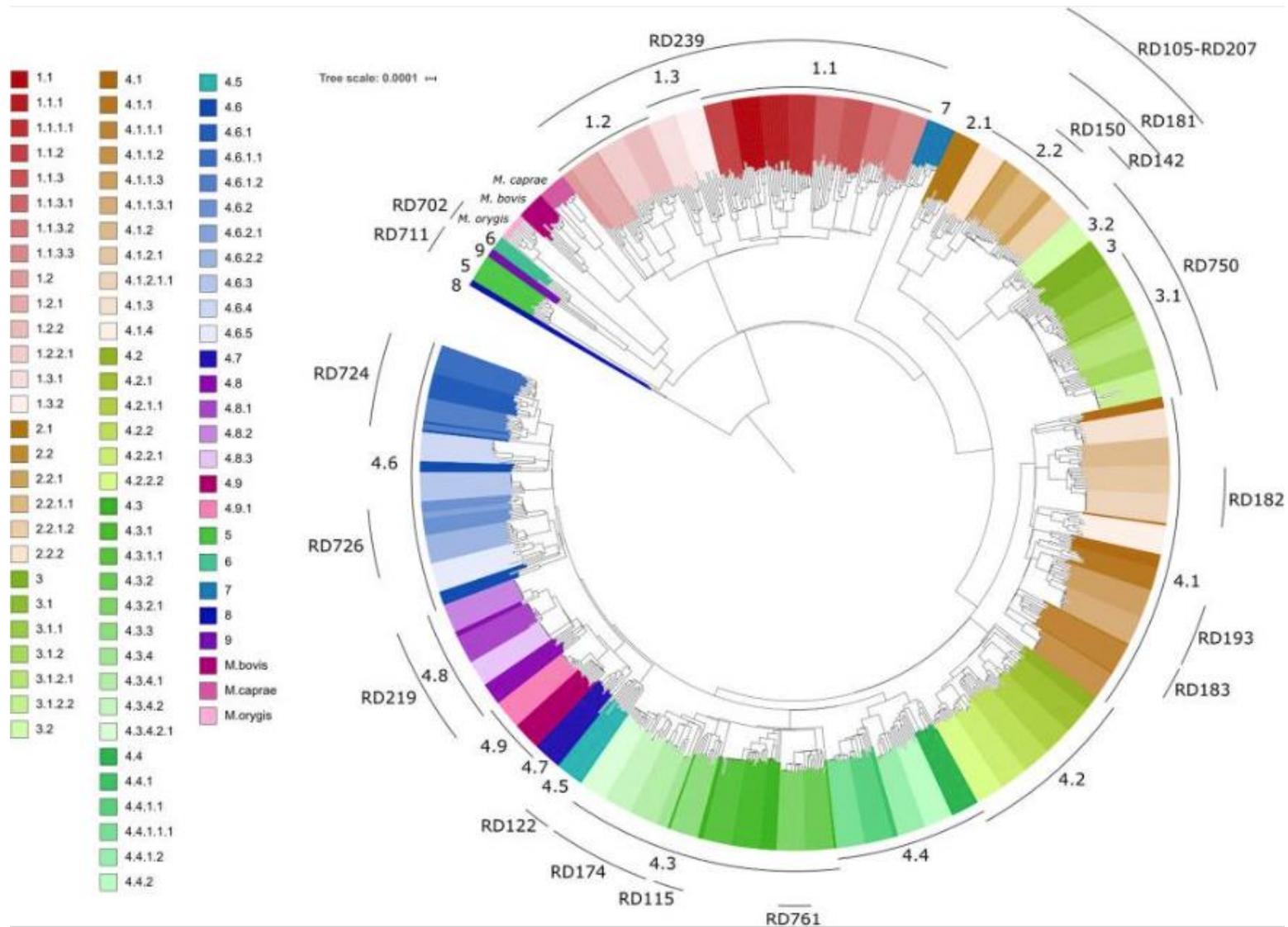


Figure 5- Arbre phylogénétique de MTBC. Les régions de différence majeure (RD) permettant de distinguer les différentes lignées sont indiquées. D'après ⁵⁸

1.4. Tuberculose humaine

1.4.1. Epidémiologie de la tuberculose

1.4.1.1. Mondiale

Dans l'ère pré-COVID-19, la TB était la première cause de décès par maladie infectieuse au niveau mondial. La TB est ainsi devenue la deuxième cause de mortalité par maladie infectieuse et fait partie des dix premières causes de décès à l'échelle mondiale. La pandémie due au SARS-CoV-2 a réorienté les priorités des autorités sanitaires, réduisant les moyens alloués au diagnostic et à la surveillance de la TB. **Ainsi, en 2020, une chute importante du nombre déclaré de cas nouvellement diagnostiqués a été constatée par rapport à 2019 : 5,8 millions de cas en 2020 versus 7,1 millions en 2019 (-18%),** avec 41% de cas déclarés en moins en Inde. Ainsi, le nombre de personnes atteintes d'une TB non diagnostiquée et non traitée a augmenté, bien qu'on assiste à une réascension du nombre de cas déclarés en 2021, mais qui reste bien inférieur au niveau de 2019 (**Figure 6**). Les conflits actuellement en cours en Ukraine, en Afrique et au Moyen-Orient aggravent également cette situation.

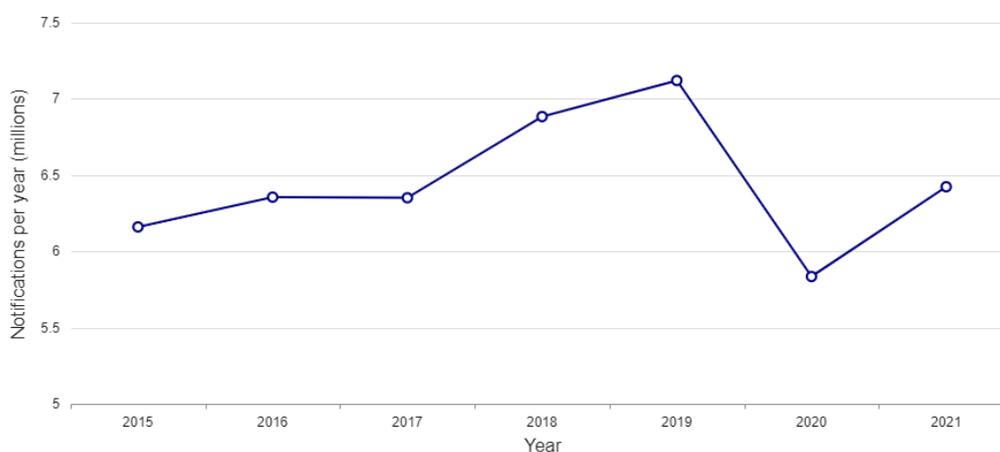


Figure 6- Nombre de notifications de cas de TB nouvellement diagnostiqués (en millions) sur la période 2015-2021, données OMS 2022, d'après ⁶²

Ainsi, pour l'année 2021, L'OMS estimait qu'il y avait 10.6 millions de nouveaux cas de TB dans le monde, soit une augmentation de 4.5% par rapport à 2020 et 1,6 millions de morts imputables à la TB (contre 1,5 millions en 2020) ⁶². C'est la deuxième année consécutive

depuis 2005, qu'un rebond du nombre de décès liés à la TB est rapporté par rapport à l'année précédente (il y avait déjà une augmentation en 2020 par rapport à 2019 : 1.5 millions de décès versus 1.4 millions en 2019).

Les deux tiers des cas incidents mondiaux se concentrent dans seulement huit pays, dont presque un tiers en Inde (**Figure 7**). Parmi l'ensemble des cas de TB, 6,7 % concernaient des patients atteints du VIH ⁶². La proportion de co-infection par le VIH était la plus élevée en Afrique, dépassant 50 % dans certaines parties de l'Afrique Sub-Saharienne. Les hommes adultes représentent 56% des cas de TB en 2020 contre 33% chez les femmes et 11% chez les enfants de moins de 15 ans. Cette proportion plus élevée de cas de TB chez les hommes est conforme aux résultats des enquêtes de prévalence, qui montrent que la TB touche davantage les hommes que les femmes ⁶³.

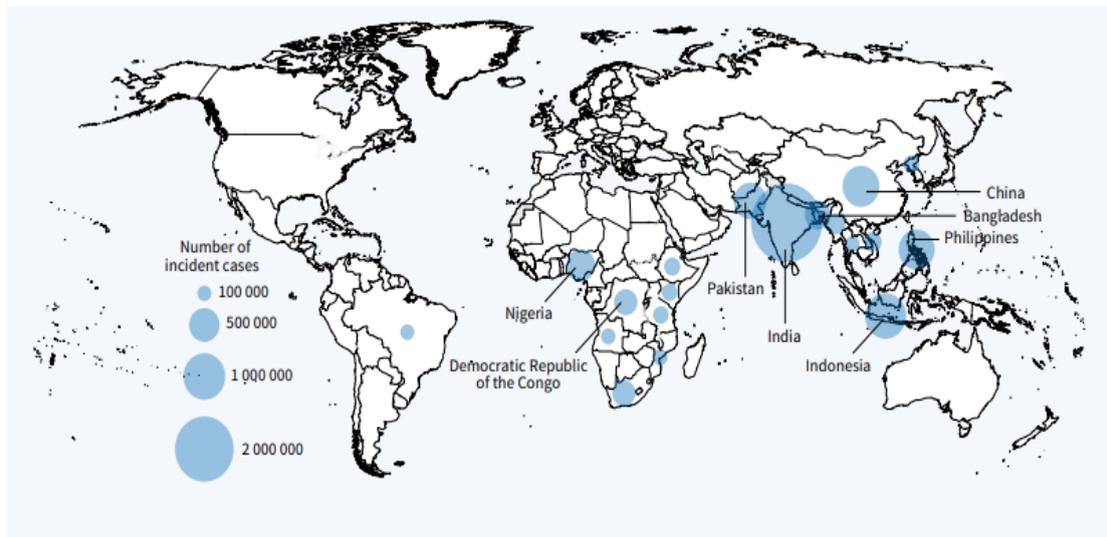


Figure 7- Estimation de l'incidence de la TB en 2021, pour les pays comptant au moins 100 000 cas incidents. Les huit pays qui se classent de la 1^{ère} à la 8^{ème} place en termes de nombre de cas, et qui représentaient deux tiers des cas mondiaux en 2021, sont étiquetés. D'après ⁶²

1.4.1.2. Française

En France, la TB est une maladie à déclaration obligatoire, ce qui permet un suivi de son épidémiologie plus exhaustif que celui réalisé au niveau mondial. Selon ces données, en 2021, l'incidence de la TB poursuivait une baisse déjà amorcée en 2020 : 4200 cas contre 4600 cas en 2020 (déjà en baisse de 10% par rapport à 2019). Cette diminution des cas peut être indirectement associée à la pandémie de COVID-19.

La France est un **pays à faible incidence tuberculeuse**, inférieure à 10 cas/100 000 habitants/an depuis plus de 10 ans avec cependant une légère augmentation de 2016 à 2018. Bien que l'incidence de la TB soit faible en France, les fortes disparités géographiques et sociodémographiques sont telles qu'on retrouve des taux de pays à forte incidence sur certaines populations. En effet, on retrouve une très forte incidence chez les personnes nées hors de France (38,5 cas/100 000 habitants), de dix fois supérieure à celle des personnes nées en France. On observe également une forte incidence chez les personnes sans domicile fixe (222 cas/100 000 habitants) ainsi que chez les personnes incarcérées (58 cas/100 000 habitants). La TB touche également plus les hommes (67% en 2018) que les femmes et la tranche d'âge la plus affectée est celle des 25 à 44 ans (36,7% en 2018 ; âge médian 38 ans) ⁶⁴.

1.4.2. Etapes de l'infection tuberculeuse

La transmission de la TB est essentiellement interhumaine. Il est à noter qu'il existe également des cas de transmission zoonotique : (i) la plus décrite est celle du bovin vers l'homme impliquant *M. bovis* par consommation de lait non pasteurisé produit par une vache atteinte de mammite tuberculeuse ⁶⁵ et (ii), dans des cas exceptionnels, des caprins vers l'homme impliquant *M. caprae* ⁶⁶ et des lions de mer vers l'homme impliquant *M. pinnepidii* ⁴⁰.

La transmission interhumaine est directe, par voie respiratoire. Un patient atteint de TB pulmonaire, émet des aérosols de fines gouttelettes (1 à 5 µm) contenant des bacilles, qu'on appelle gouttelettes de Pflügge. Ces dernières, une fois dispersées dans l'air, se dessèchent et forment des noyaux de gouttelette appelés « *droplet nuclei* » qui peuvent rester plusieurs heures en suspension dans l'air. Les *droplet nuclei* vont ensuite pouvoir être inhalés par un autre individu. Le faible nombre de bactéries nécessaires à la transmission de la maladie (un seul bacille est suffisant pour infecter) a motivé le classement de *Mtb* en agent de classe 3 (agent hautement infectieux). Environ 50 % des personnes ayant une TB pulmonaire sont contagieuses. Il est à noter que les atteintes tuberculeuses de la sphère ORL sont également contagieuses (TB du larynx, TB du cavum...). Ces gouttelettes chargées de bacilles restent en suspension sous forme d'aérosol et, une fois inhalées, vont soit être arrêtées par l'appareil mucociliaire, soit atteindre les alvéoles pulmonaires, et initier l'infection tuberculeuse. Selon l'âge et l'état du système immunitaire, l'hôte réagira de trois manières différentes face à l'infection tuberculeuse (**Figure 8**) :

dans 90-95 % des cas, l'infection est contrôlée par le système immunitaire, ainsi les bacilles tuberculeux sont contenus au sein de structures complexes multicellulaires, les granulomes épithélioïdes et géantocellulaires, composés du centre vers la périphérie de nécrose caséuse, de macrophages immatures infectés, de macrophage spumeux (cellules géantes avec contenu riche en lipide mycobactérien), de macrophages activés, de tissus conjonctif et enfin de lymphocytes T CD4 et CD8. Le confinement de ces bacilles par le système immunitaire est une période d'équilibre entre l'hôte et le pathogène appelée phase de latence pendant laquelle l'individu infecté n'est ni malade, ni contagieux. On parle ainsi d'**infection tuberculeuse latente (ITL)**. Néanmoins, certains facteurs, comme une immunodépression, peuvent déstabiliser cet équilibre entraînant un développement de la TB maladie^{55,56}. Le caractère latent de cette pathologie, le mode de transmission et la contagiosité du bacille expliquent l'existence de très nombreux « porteurs sains », estimé à un quart de la population mondiale ;

- les personnes primo-infectées sont incapables de contenir l'infection et développent directement la maladie (**TB maladie**) ;
- le système immunitaire combat l'infection et le bacille tuberculeux est éradiqué, il s'agit d'une **guérison spontanée**.

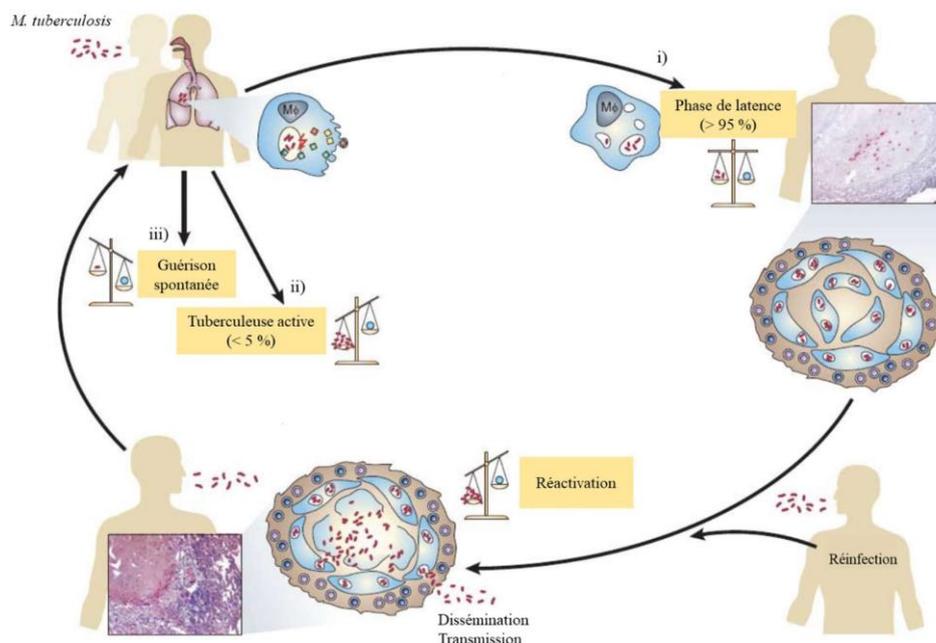


Figure 8- Pathogénicité de *Mtb*. D'après⁶⁷

En 2018 a été proposée une nouvelle classification des formes de TB, introduisant deux nouvelles entités cliniques : l'infection tuberculeuse naissante (« *incipient tuberculosis infection* ») et la TB subclinique ⁶¹. Cette nouvelle classification comprend cinq voies évolutives de l'infection tuberculeuse (**Figure 9**) :

- **l'infection tuberculeuse guérie** : individu ayant été infecté par *Mtb*, qui a soit guérit spontanément grâce à une réponse immunitaire adaptée ou qui a été guérit grâce à un traitement antituberculeux. Absence de bacilles viables de *Mtb*,
- **l'infection tuberculeuse latente (ITL)** : infection par *Mtb* viable pour laquelle la progression vers la TB maladie n'est pas attendue dans un avenir proche en l'absence d'immunodépression,
- **l'infection tuberculeuse naissante** est une infection par *Mtb* qui est susceptible d'évoluer vers une maladie active en l'absence de traitement, mais qui n'a pas encore induit de symptômes cliniques, d'anomalies radiographiques ou de preuves microbiologiques compatibles avec une TB active,
- **la TB maladie subclinique** : pas de symptômes cliniques liés à la TB, mais présence d'autres anomalies qui peuvent être détectées à l'aide des tests radiologiques ou microbiologiques,
- **la TB active** : symptômes cliniques avec des anomalies radiographiques ou la présence de *Mtb* dans les prélèvements.

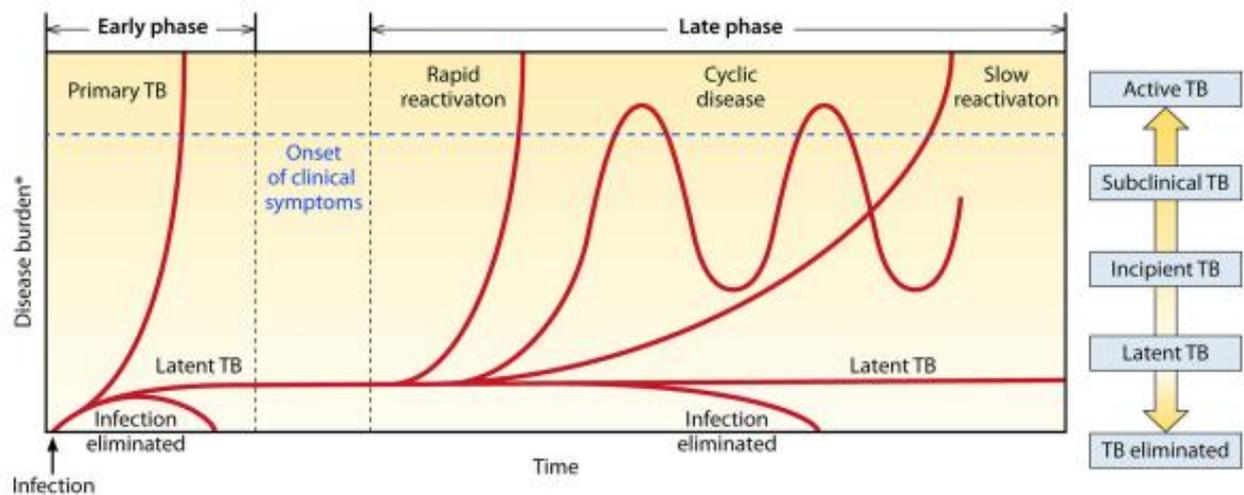


Figure 9- Les cinq voies d'évolution de l'infection tuberculeuse. D'après ⁶¹

1.4.3. Formes cliniques de la tuberculose maladie

Concernant la TB maladie, tous les organes peuvent être atteints, mais la forme clinique la plus fréquente est la **TB pulmonaire**, qui concerne plus de 80% des patients. Le diagnostic est classiquement suspecté devant une altération de l'état général (asthénie, amaigrissement et fièvre) associée à des signes respiratoires (toux chronique, hémoptysie). L'imagerie thoracique met en évidence des lésions parenchymateuses prédominantes aux régions apicales (les plus ventilées) qui associent des nodules, infiltrats et lésions excavées (cavernes).

Dans 20% des cas, la TB est **extra-pulmonaire**, et peut atteindre de nombreux organes, tels que les ganglions, l'os (spondylodiscite tuberculeuse ou mal de Pott), le système nerveux central (méningite, tuberculome), les séreuses et les voies urinaires. Cela est notamment le cas chez les patients immunodéprimés, après dissémination hématogène des bacilles tuberculeux. En cas de d'atteinte disséminée, on parle de « miliaire » tuberculeuse, qui est une forme grave et mortelle en l'absence de traitement antibiotique.

1.4.4. Diagnostic de la tuberculose maladie

1.4.4.1. Stratégie de prélèvement pour le diagnostic de la tuberculose pulmonaire

La stratégie de prélèvement pour l'analyse microbiologique a un impact sur la rentabilité diagnostique, comme cela a été montré à partir d'une collection de 6267 prélèvements issus de 2187 patients suspects de TB pulmonaire dans une étude réalisée au CNR-MyRMA ⁶⁸ (**Publication 2**). Les expectorations seules, permettaient de diagnostiquer 63,5% des TB, alors que les prélèvements réalisés par fibroscopie bronchique et les tubages gastriques étaient nécessaires chez respectivement 29,5% et 7% des cas. Des expectorations itératives sont donc à réaliser en priorité, et si l'examen microscopique s'avère négatif, la réalisation d'une fibroscopie bronchique doit être préférée à celle de tubages gastriques. Il est crucial de rentabiliser le geste invasif de la fibroscopie par la réalisation de tous les prélèvements accessibles, en particulier la ponction ganglionnaire, l'aspiration bronchique et l'expectoration post fibroscopie.

1.4.4.2. Diagnostic microbiologique

La mise en évidence des bacilles tuberculeux dans un prélèvement clinique constitue le **diagnostic de certitude** de la TB maladie.

Mtb est un **agent biologique de classe 3**, conformément aux dispositions de l'article R. 4421-3 du Code du travail, qui classe les agents biologiques en quatre groupes (1, 2, 3, 4), en fonction de la gravité croissante du risque d'infection et de propagation dans la collectivité qu'ils représentent pour l'homme. Ainsi, une partie des étapes du diagnostic microbiologique nécessitent d'être réalisées dans un laboratoire de sécurité microbiologique de niveau L3. Les techniques de biologie moléculaire peuvent être réalisées en dehors du L3, après respect strict du protocole d'inactivation.

Les moyens diagnostiques de la TB maladie, qui sont détaillés dans les paragraphes suivants, ont des seuils de détection différents (**Figure 10**). Il s'agit de l'examen microscopique, de la culture et de la biologie moléculaire.

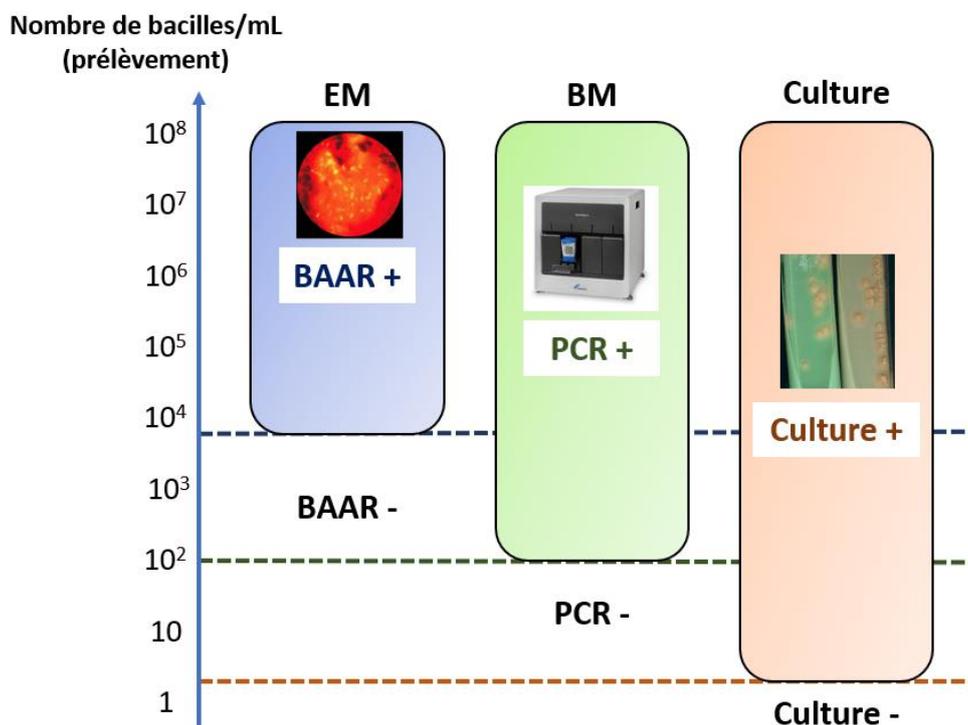


Figure 10- Seuils de détection des méthodes diagnostiques de la TB.

BAAR : bacilles acido-alooolo résistants ; BM : biologie moléculaire ; EM : examen microscopique ; PCR : polymérase chain reaction ; - : négatif ; + : positif.

1.4.4.2.1. Examen microscopique sur prélèvement

La mise en évidence des bacilles tuberculeux, et des mycobactéries au sens large, peut-être réalisée par la **coloration de Ziehl-Neelsen** par la visualisation de **BAAR (Figure 11)**. Cette coloration est observée à l'objectif x100 et permet d'apprécier finement la morphologie des bacilles. Cependant, dans la pratique de routine, **la coloration à l'auramine** est utilisée sur les prélèvements, étant plus aisée et rapide (lecture à un grossissement plus faible) pour la lecture (**Figure 11**). Néanmoins, la lecture demeure fastidieuse et nécessite d'être expérimenté, la distinction avec des artéfacts pouvant ne pas être aisée au départ. Lorsque des BAAR sont visualisés à l'examen microscopique, on parle de prélèvement « BAAR + » ou « microscope + ». La limite de détection de l'examen microscopique est estimée à **10⁴ bacilles par mL**, et sa sensibilité pour le diagnostic de la TB est de 63%⁶⁹ (**Figure 10**).

1.4.4.2.2. Culture

Les mycobactéries sont des bactéries exigeantes qui requièrent l'utilisation de **milieu enrichis** en protéines pour leur croissance *in vitro*. Les milieux de cultures les plus utilisés sont les milieux solides à l'œuf de Löwenstein-Jensen (LJ) et les milieux gélosés ou liquides de Middlebrook (7H9, 7H10, 7H11) supplémentés par de l'OADC (acide oléique, albumine, dextrose et catalase). Il est à noter que *M. leprae* est la seule espèce qui n'est pas cultivable *in vitro*⁷⁰.

Les colonies de *Mtb* ont un **aspect rugueux**, dit en « chou-fleur », de couleur blanc crème sur les milieux de culture solides. Elles apparaissent trois semaines environ après incubation à 37°C en atmosphère aérobie. Les délais de croissance sont plus longs pour *M. africanum* et *M. bovis* (six semaines en moyenne). L'aspect macroscopique rugueux est en partie lié à un facteur de virulence, le « *cord factor* », favorisant l'agrégation des bacilles entre eux et leur résistance à la phagocytose⁷¹. Cela peut être visualisé par l'aspect en « cordes » à la coloration de Ziehl-Neelsen sur colonies. *M. canetti* se distingue des autres membres de MTBC notamment par ces caractères culturaux : colonies d'aspect lisse, capacité de croître sur des milieux non enrichis et à 30°C⁴⁷ (**Figure 12**).

La **culture en milieu liquide** s'est particulièrement développée ces dernières années, notamment grâce au système automatisé BACTEC-MGIT (*mycobacterial growth indicator tube*). La détection de la croissance bactérienne est réalisée par des mesures séquentielles de la fluorescence dans le tube (intensité de la fluorescence exprimée en UC). En effet, chaque tube

contient un détecteur fluorescent qui réagit en fonction de la concentration en oxygène du milieu de culture, qui est directement reliée à la quantité d'oxygène consommée par les bactéries. La culture en milieu liquide est intéressante car elle permet de réduire de moitié le délai d'obtention d'une culture positive, passant de trois semaines à dix jours en moyenne. L'inconvénient est que la morphologie des colonies n'est pas observable, et un repiquage en milieu solide est nécessaire en cas de doute sur la pureté de la culture.

En cas de culture positive, le **test antigénique rapide** (résultats en 10-15 minutes) **MPT64** permet de distinguer les MNT de MTBC. En effet, l'antigène MPT64 est un facteur de virulence présent chez MTBC et absent chez les MNT. Ce test immuno-chromatographique est très simple, et peut être réalisé à partir de colonies isolées sur milieu solide ou à partir d'un milieu liquide. Il existe cependant des cas où le test est négatif alors qu'il s'agit de MTBC : (i) les souches les plus « récentes » de *M. bovis* BCG (obtenues après 1931, telles que la BCG-Pasteur ou la BCG-Tice)⁷², (ii) certaines souches de *M. africanum*, (iii) certaines souches de *Mtb* de la lignée 4, (iv) souches dont le gène codant l'antigène MPT64 est muté, et enfin (v) une culture en milieu liquide trop précoce, n'ayant pas encore atteint l'inoculum suffisant pour la détection (seuil de 10^{5-6} CFU/mL). Dans le dernier cas, il faut répéter le test après 24-48 heures d'incubation supplémentaires du tube de culture.

La culture est l'examen ayant le seuil de détection le plus bas (1-10 bacilles/mL) (Figure 10). Cependant, une quantité suffisante de prélèvement à ensemercer est nécessaire, d'autant plus dans les formes pauci-bacillaires, telles que la méningite tuberculeuse ou encore la TB urinaire. C'est pourquoi un volume de plus de 5 mL est recommandé pour les expectorations, la sensibilité passant de 92% à 72% en cas de volume inférieur⁷³.



Figure 11- Aspects des BAAR à l'examen microscopique : coloration de Ziehl-Neelsen (en haut) et coloration à l'auramine (en bas). Crédits photographiques : <http://www.microbes-edu.org/>

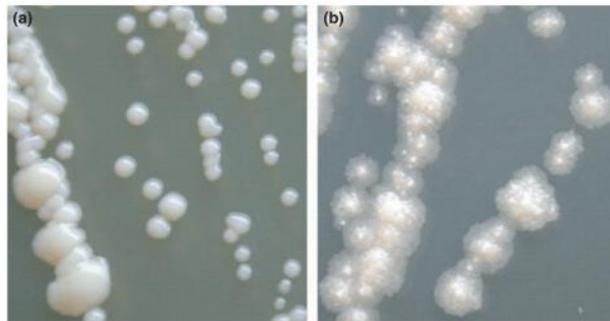


Figure 12- Aspect des colonies de *M. canettii* (lisses) (a), versus aspect rugueux des colonies d'une souche de *Mtb stricto sensu* (b) sur gélose Middlebrook 7H11, D'après ⁴⁷

1.4.4.2.3. Biologie moléculaire

La revue à laquelle j'ai participé pour la Revue des Maladies Respiratoires résume les principes du diagnostic moléculaire de la TB (**Publication 3**). Les tests d'amplification des acides nucléiques (TAANs) ont pris une part importante dans le diagnostic, car (i) ils permettent une détection plus rapide de MTBC (compte tenu de sa vitesse de croissance lente) et (ii) ont un seuil de détection plus bas que l'examen microscopique. Deux technologies d'identification différentes sont utilisées :

- **la PCR en temps réel (RT-PCR).** Une multitude de tests existent actuellement. Ces tests, faciles à mettre en œuvre, permettent pour la plupart de réaliser la détection couplée de la résistance au moins à la rifampicine. Parmi ceux-ci on peut citer :
 - le test **Xpert® MTB/RIF (Cepheid)** est le plus répandu du fait de sa grande simplicité de mise en œuvre. En effet, il intègre la lyse bactérienne, l'extraction des acides nucléiques, l'amplification et la détection de l'amplicon en deux heures sans nécessiter un environnement de type L3 ⁷⁴. La dernière version, (Xpert Ultra), détecte MTBC par l'amplification des éléments transposables spécifiques *IS6110* et *IS1081*, présents en plusieurs copies dans le génome de MTBC. La détection de ces éléments a permis d'augmenter la sensibilité du test. Les performances de détection de MTBC du test Xpert® MTB/RIF sont détaillées dans la **publication 3** ⁷⁵. Deux revues Cochrane publiées récemment ont comparé les performances des deux versions du test Xpert® MTB/RIF pour le diagnostic de la TB pulmonaire ⁷⁶ et extrapulmonaire ⁷⁷ (**Tableau 2**). Le test Xpert® MTB/RIF détecte de façon couplée la résistance à la rifampicine, en amplifiant une portion du gène *rpoB* (§ 2.7 Diagnostic de la résistance). L'OMS recommande d'utiliser le test Xpert® MTB/RIF en test diagnostic initial pour le diagnostic microbiologique de la TB chez les adultes et les enfants présentant des symptômes de TB pulmonaire ou extrapulmonaire, plutôt que d'utiliser la microscopie ⁷⁸.
 - le **coffret MDR/MTB ELITE MGB® (ELITech)** réalisé sur la plateforme ELITE InGenius®, qui permet de réaliser une extraction automatisée sur des matrices de prélèvement très variées. Ce coffret a été évalué par plusieurs équipes, dont celle du CNR-MyRMA, et a montré d'excellentes performances pour la détection de MTBC, mais aussi pour le diagnostic couplé de la résistance génotypique à la rifampicine et à l'isoniazide (§ 2.7 Diagnostic de la résistance) (**Publication 4**) ^{79,80}.
- **l'amplification isotherme médiée par boucle (LAMP)** ^{81,82}. L'utilisation de ce test est recommandée depuis 2016 par l'OMS, pour détecter MTBC directement dans les expectorations, et peut être utilisé en remplacement de la microscopie pour le diagnostic de la TB pulmonaire chez les adultes présentant des symptômes ⁷⁸. Ce test, dont le principe repose sur l'amplification de l'*IS6110*, est réalisable en moins d'une heure. La

sensibilité de ce test dépasse celle de l'examen microscopique (sensibilité de 63%)⁸³.

Par contre, ce test ne réalise pas la détection de la résistance à la rifampicine.

Les performances diagnostiques de ces tests moléculaires sont diminuées chez les sujets vivant avec le VIH et chutent lorsqu'ils sont réalisés sur prélèvement BAAR négatifs et/ou sur prélèvement extrapulmonaire (**Publication 3**), (**Tableau 2**).

Tableau 2- Performances de détection de MTBC dans les prélèvements comparativement à la culture.

C : culture ; EM : examen microscopique ; LCR : liquide céphalo rachidien ; Se : sensibilité ; Sp : spécificité ; - : négatif ; + : positif

Test	Tous cas confondus		Pulmonaire (EM + EM-)		Extrapulmonaire												EM – C+		Sujets VIH+		Références
					Tous sites confondus		LCR			Liquide pleural			Ponction ganglionnaire								
	Se (%)	Sp (%)	Se (%)	Sp (%)	Se (%)	Nb études	Se (%)	Sp (%)	Nb études	Se (%)	Sp (%)	Nb études	Se (%)	Sp (%)	Nb études	Se (%)	Sp (%)	Se (%)	Sp (%)		
Xpert® MTB/RIF			84,7	98,4			71.0	97.0	30	50.0	99.0	25	82.0	96.0	4	60,6	98,8	74.9	99.7	76	
Xpert® MTB/RIF Ultra			90,9	95,6			89.0	91.0	6	75.0	87.0	4	70.0	100	1	77,5	95,8	87.6	92.8	77	
MDR/MTB ELITe MGB®	80-90.9	97.5-100	86.5		50	1	Pas de données									69.0-73.5	92.3	Pas de données		79 80	
LAMP			78.0	98.0	Pas de données												42.1	98.4	63.8	98.8	83

Une technologie développée récemment aurait un seuil de détection extrêmement bas d'environ 2 copies/15µL, la **droplet digital PCR (ddPCR)**. Cette technique associe la technologie microfluidique à la PCR, ce qui permet la quantification précise d'une seule copie d'ADN. Le prélèvement est séparé en milliers de gouttes avec des sous-réactions de PCR indépendantes dans un système de partition. Après la réaction PCR, le signal de fluorescence est détecté dans chaque gouttelette. Une analyse statistique de Poisson est effectuée sur la proportion de gouttelettes positives afin d'obtenir une quantification précise de la séquence cible (**Figure 13**). Cette méthodologie reste encore du domaine de la recherche translationnelle pour ce qui concerne la TB ^{84,85}, mais est déjà employée en routine dans certains champs d'application tels que l'oncologie et la génétique médicale. De plus, le coût de l'instrument et des réactifs reste encore beaucoup plus élevé que ceux utilisés pour la RT-PCR. Cependant, cette technologie représente une perspective très intéressante à développer à court terme pour la détection de MTBC en routine. Une étude publiée en 2022 réalisée sur 605 patients suspects de TB pulmonaire confirmée chez 263 patients (dont près de 85% avec examen microscopique négatif) a d'ailleurs mis en évidence de bonnes performances : sensibilité et spécificité de la ddPCR (utilisant la cible IS6110) de 61,22 % et de 95,03 % tous cas confondus et de 57,92 % et 94,57 % respectivement pour les cas de TB avec examen microscopique négatif ⁸⁶. Le test ddPCR était significativement plus performant que le test Xpert MTB/RIF (53,08 % contre 28,46 %, p = 0,020) pour la détection de MTBC en cas d'examen microscopique négatif dans la population testée dans cette étude.

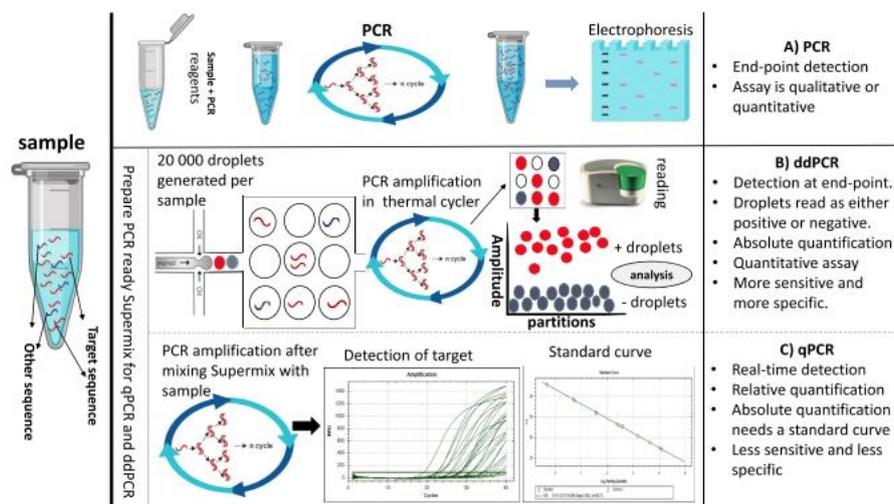


Figure 13- Présentation des différentes technologies de PCR disponibles actuellement avec leurs avantages et inconvénients. D'après ⁸⁴

1.4.5. Traitement des tuberculoses à bacilles sensibles : antituberculeux de première ligne

Dès l'utilisation du premier antituberculeux, il est paru indispensable de traiter une TB par plusieurs antibiotiques pour permettre la guérison et l'absence de sélection de souches résistantes.

Actuellement, le traitement de la TB dite « sensible », recommandé par l'OMS, fait appel aux antibiotiques dits de « première ligne » que sont la rifampicine, l'isoniazide, le pyrazinamide et l'éthambutol. La durée du traitement standard est de six mois et comporte deux phases successives. La phase initiale dure deux mois et consiste en l'administration des quatre antibiotiques. Elle permet de diminuer la charge bactérienne, ce qui est capital pour prévenir l'apparition de mutants résistants, et permet également de réduire rapidement la contagiosité du patient. La deuxième phase, appelée aussi phase de continuation, dure quatre mois et consiste en l'administration d'isoniazide et de rifampicine. Elle a pour but d'éliminer les bacilles restants en stérilisant les lésions et ainsi de prévenir toute rechute.

En cas d'intolérance aux antituberculeux de première ligne, ceux de deuxième ligne peuvent être employés. Ceux-ci sont répertoriés dans le chapitre **2.10 Traitement des tuberculoses à bacilles résistants**.

2. Résistance de *Mycobacterium tuberculosis complex* aux antituberculeux

2.1. Définitions

Dès la première utilisation de la streptomycine comme traitement des TB pulmonaires en 1948, il a été constaté qu'après une phase transitoire d'amélioration, les patients récidivaient avec des bacilles devenus résistants à cet antibiotique^{87,88}. En théorie, une association d'antibiotiques prévient la sélection de mutants résistants. Cependant, le mésusage des antibiotiques a favorisé l'émergence de bacilles résistants aux principaux antituberculeux. Dans les années 1990, des TB à bacilles résistants à l'isoniazide et la rifampicine, dites **multirésistantes (MDR)** ont été décrites. Elles ont été traitées par des antituberculeux de deuxième intention ce qui a conduit à l'apparition de TB **ultrarésistantes (XDR)**. Avant 2021, l'ultrarésistance était définie par la MDR avec une résistance ajoutée aux FQ et aux injectables de seconde ligne (amikacine et/ou kanamycine et/ou capréomycine). En 2021, l'OMS a proposé une nouvelle définition de l'ultrarésistance en cohérence avec les nouvelles recommandations thérapeutiques rétrogradant les aminosides dans le classement des molécules de seconde ligne au profit des nouveaux antituberculeux comme la bédaquiline (BDQ) et le linézolide (**Tableau 3**)^{89, 90}. Ainsi, l'ultrarésistance est aujourd'hui définie comme une TB MDR avec une résistance ajoutée aux FQ et à au moins l'un des autres antibiotiques du groupe A (à savoir, linézolide et/ou à la BDQ)⁹¹ (**Tableau 3**), et les TB « **pré-XDR** », comme des TB MDR avec résistance ajoutée aux FQ⁹².

Tableau 3- Régime des TB à bacilles MDR et XDR selon les recommandations de l’OMS. D’après ⁹¹

Groupe de molécule (par ordre de priorité)	Antituberculeux
	-Lévofloxacine ou moxifloxacine
Groupe A : Ajouter en priorité ces trois molécules	-Bédaquiline -Linézolide
Groupe B : Compléter par ces molécules	-Clofazimine -Cyclosérine
Groupe C : Compléter par ces molécules si besoin (résistance ou intolérance aux molécules des groupes précédents).	-Ethambutol -Délamanide -Pyrazinamide -Imipénème ou Méropénème -Amikacine -Ethionamide ou prothionamide -Acide para-aminosalicylique

Une souche de *Mtb* résistante isolée d’un patient qui n’a jamais été traité pour une TB auparavant, est considérée comme une « **résistance primaire** ». En revanche, une souche de *Mtb* résistante provenant d’un patient traité précédemment pour une TB, pendant au moins un mois, est probablement devenue résistante chez ce patient, et est de ce fait considérée comme une souche de « **résistance secondaire ou acquise** ». L’OMS propose de ne plus utiliser le terme de « résistance acquise » car cette catégorie englobe à la fois les patients qui ont en effet développé une TB avec l’émergence d’une souche résistante, mais aussi ceux, qui après traitement, ont été réinfectés avec une souche de *Mtb* résistante. Pour lever cette ambiguïté, l’OMS recommande les terminologies « **résistance parmi les nouveaux cas** » à la place de « résistance primaire » et « **résistance parmi des cas précédemment traités** » à la place de « résistance acquise » ⁹³.

Enfin, on distingue deux types de résistance aux antibiotiques : la **résistance naturelle** qui concerne de nombreuses familles d’antibiotiques chez *Mtb* et qui est due à des caractéristiques structurelles et fonctionnelles comme (i) l’impermeabilité de la paroi (béta-

lactamines, glycopeptides, macrolides, cyclines...), (ii) la production d'enzymes inactivatrices (bêta-lactamases, aminoside acétyltransférases ...), (iii) la présence de pompes d'efflux (cyclines ...), ou encore (iv) la moindre affinité pour la cible (quinolones)⁹⁴ ; et la **résistance acquise**. Nous n'aborderons que la résistance acquise dans ce manuscrit.

2.2. Epidémiologie de la résistance aux antituberculeux

2.2.1. Epidémiologie de la tuberculose résistante dans le monde

La **TB résistante aux antibiotiques** continue l'une des principales menaces à la lutte antituberculeuse mondiale. Du fait de la réaffectation des ressources humaines et financières dédiées à la TB à la lutte contre la pandémie de COVID-19, une sous déclaration des cas de TB est observée depuis 2020. Les derniers chiffres les plus fiables et complets concernant l'épidémiologie de la résistance se trouvent dans le rapport de l'OMS 2020. En 2021, l'OMS estime qu'environ 450 000 patients dans le monde ont développé une TB à bacilles résistants à la rifampicine⁶² (**Figure 14**). L'Inde (26%), la Fédération de Russie (8,5%) et le Pakistan (7,9%) regroupent 42% des cas de TB MDR en 2021 (**Figure 15**). Les proportions de résistance à la rifampicine sont très variables selon les pays ; de façon globale, l'OMS estime cette résistance à 3,6% chez les nouveaux cas de TB et à 18% chez des patients déjà traités pour une TB. La proportion de MDR secondaire est la plus élevée (>50%) dans les pays de l'ex-Union soviétique⁶².

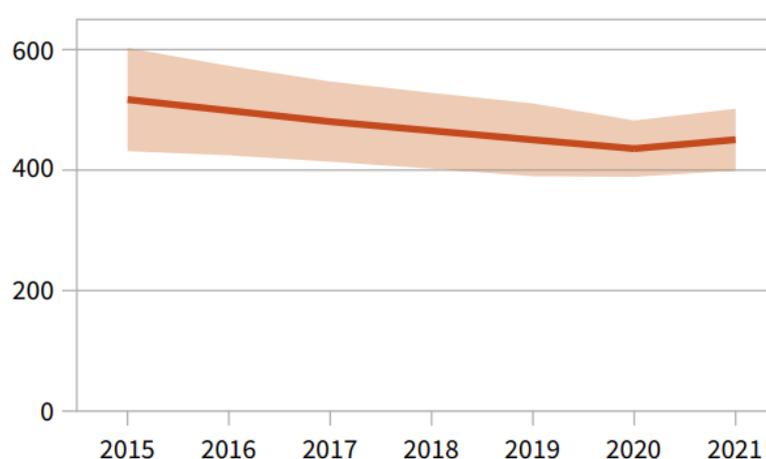


Figure 14- Estimation du nombre de cas incidents de TB résistante à la rifampicine (en milliers/an), tendances 2015-2021. Données de l'OMS, d'après⁶².

Concernant les TB XDR, aucun chiffre n'est disponible pour les TB XDR « nouvelle définition » ; tandis que l'OMS estime à environ 25 000 par an le nombre de cas de TB préXDR et XDR « ancienne définition »⁶². En 2019, les régions dénombrant le plus grand nombre de cas sont l'Europe (69%), l'Asie du Sud-Est (20%) et l'Afrique (5%)²⁷.

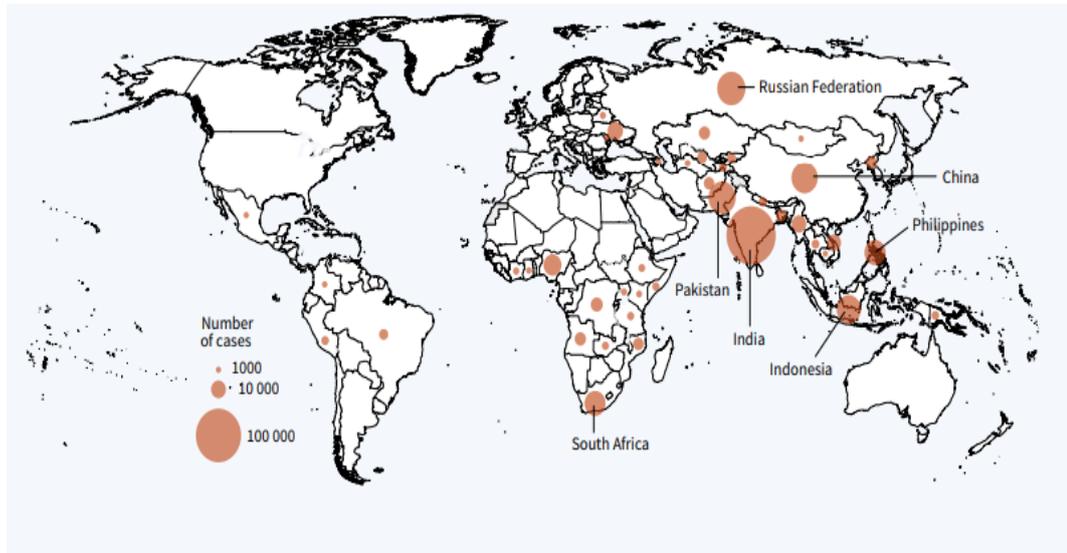


Figure 15- Estimation de l'incidence de la TB MDR en 2021, pour les pays comptant au moins 1000 cas incidents. Les sept pays qui représentent les deux tiers des cas de TB MDR/RR dans le monde en 2021 sont indiqués. Données de l'OMS, d'après⁶²

2.2.2. Epidémiologie de la tuberculose résistante en France

En France également, la pandémie de COVID-19 a eu un impact sur le **nombre de TB résistantes** déclarées (**Figure 16**). Ainsi, en 2021 le nombre de TB MDR recensées par le CNR-MyRMA était de 53 alors qu'il était entre 71 et 111 avant 2020. Un autre fait notable est la diminution très importante du nombre de **TB XDR « ancienne définition »** dont la proportion parmi les cas de TB MDR est très net recul par rapport aux années antérieures (1,9 % en 2021 *versus* aux alentours de 10% depuis 2015). Ces diminutions semblent principalement liées à la baisse du nombre de cas de TB résistantes chez des patients nés dans les pays de l'Europe de l'Est et de l'ex-URSS depuis 2020 (**Figure 16**). Cette tendance semble s'inverser en 2022 puisqu'un rebond du nombre de TB MDR a été observé à partir du 2^{ème} trimestre, notamment lié à une ré-augmentation du nombre de patients nés en Géorgie et en Ukraine (**Figure 16**). Dans un travail auquel j'ai participé, nous avons évalué l'impact de la révision de la définition des TB XDR en France et montré que (i) la proportion des **TB XDR « nouvelle définition »** parmi les cas de TB MDR chutait considérablement (2% versus 13% sur la période 2017-2020) et que (ii) les cas « nouvelle définition » étaient aussi des TB XDR selon l'ancienne définition (**Publication 5**)⁹⁵. Il est important de noter que l'Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé (ANSM) n'a pas actualisé la définition du MOT (micro-organismes et toxines hautement pathogènes) TB XDR et considère comme des MOT les TB XDR « ancienne définition » (<https://www.legifrance.gouv.fr/loda/id/JORFTEXT000025837146>).

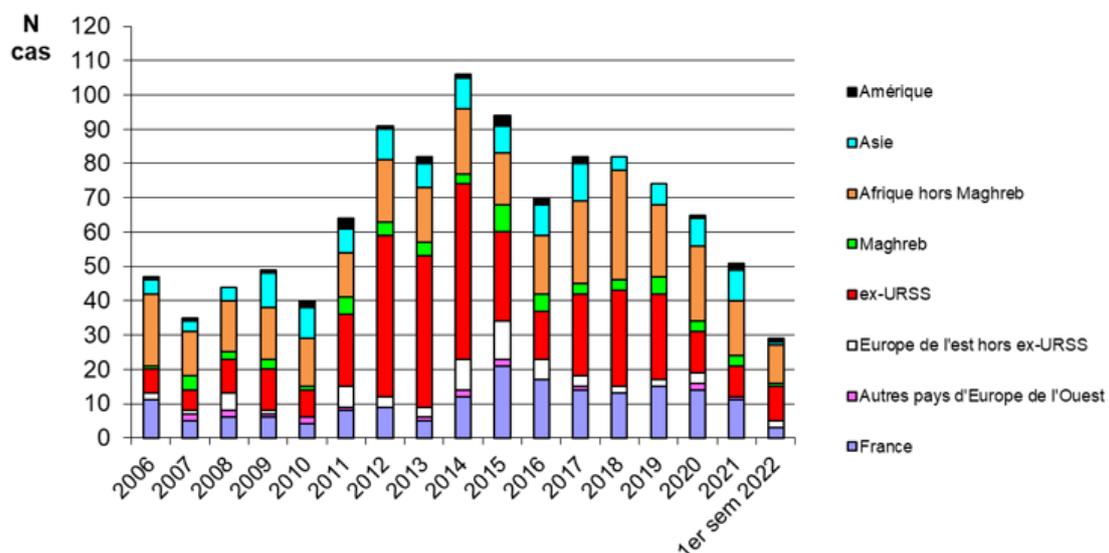


Figure 16- Répartition par groupe de pays de naissance des cas de TB MDR (souches reçues au CNR-MyRMA de 2006 au 1er semestre 2022).

2.3. Mécanismes généraux de résistance aux antituberculeux

Contrairement à la plupart des autres bactéries d'intérêt médical, l'acquisition de la résistance aux antibiotiques par transfert horizontal d'ADN extra chromosomique (plasmides, intégrons ou transposons) n'a pas été observé chez *Mtb*⁹⁶. Ainsi, la **résistance acquise aux antibiotiques chez *Mtb* est principalement due à des altérations chromosomiques** qui surviennent dans (i) des gènes codant les cibles d'antituberculeux, modifiant ainsi la cible (ex. *gyrA* et *gyrB* pour les FQ), (ii) des gènes codant des enzymes impliquées dans l'activation des antituberculeux qui sont des prodrogues, diminuant ainsi leur bioactivation (ex. *ddn* pour le délamanide et le prétomanide, concerne aussi l'isoniazide, le pyrazinamide et l'éthionamide), et (iii), des gènes codant des promoteurs de pompes d'efflux ou des régulateurs transcriptionnels entraînant la surexpression de celles-ci (ex. *Rv0678* pour la BDQ et la clofazimine)^{97,98,96,99,96,100}.

Cependant, contrairement aux autres bactéries pathogènes pour lesquelles le rôle des pompes d'efflux dans la résistance aux antibiotiques est clairement établi, cela est moins clair chez MTBC^{99,96,100}. Il a notamment été mis en évidence que des molécules supposées être des inhibiteurs de pompes d'efflux chez MTBC, auraient en fait un autre mécanisme d'action ; notamment, le vérapamil agirait plutôt sur la force protomotrice et donc sur le potentiel membranaire^{101,100}. De nombreuses pompes d'efflux ont été décrites chez *Mtb* et ont fait l'objet d'une revue récente¹⁰². Elles appartiennent à différentes superfamilles, telles qu'ABC (ATP-binding cassette), MFS (Major Facilitator Superfamily), SMR (Small Multidrug Resistance) et RND (Resistance-Nodulation-cell Division) (**Figure 17**).

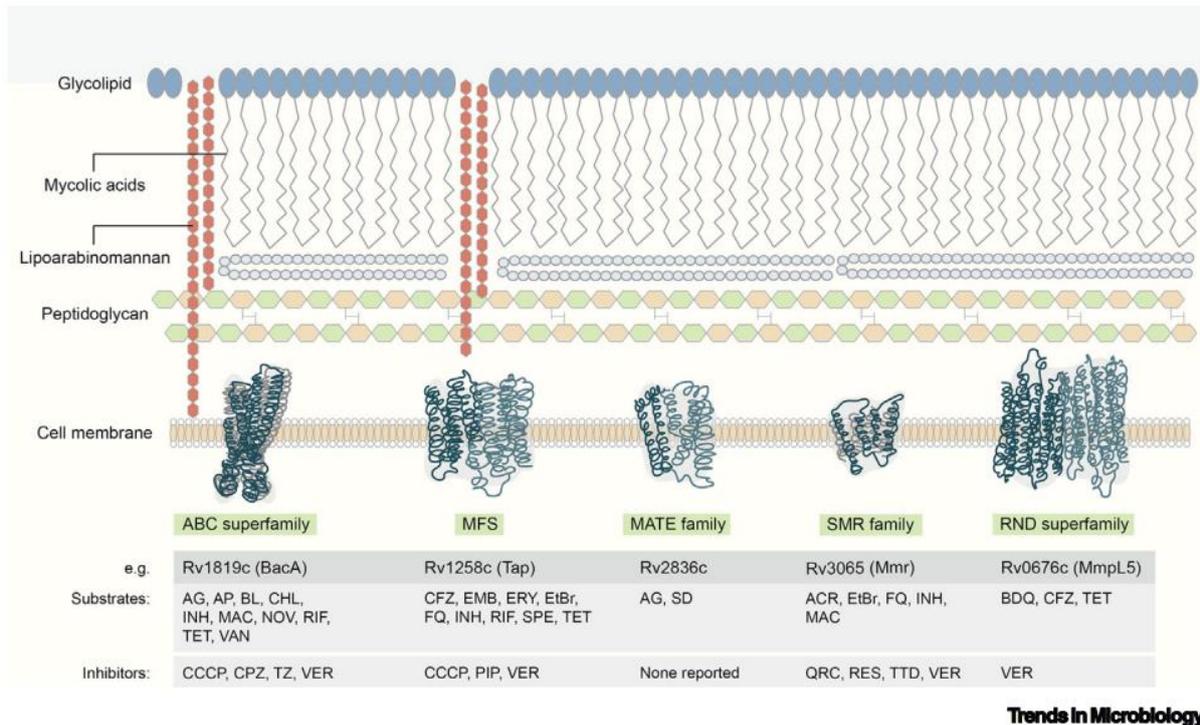


Figure 17- Structures représentatives de pompes d'efflux identifiées chez *Mtb*, appartenant aux familles ABC (*ATP-binding cassette*), MFS (*major facilitator superfamily*), MATE (*multidrug and toxic compound extrusion*), SMR (*small multidrug resistance*), et RND (*resistance-nodulation-cell-division*), avec des exemples de chacune d'elles ainsi que leurs substrats et inhibiteurs connus. D'après ¹⁰⁰

ACR, acriflavine ; AG, aminoglycoside ; AP, peptide antimicrobien ; BDQ, bédaquiline ; BL, β -lactame ; CCCP, carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazone ; CFZ, clofazimine ; CHL, chloramphénicol ; EMB, éthambutol ; ERY, érythromycine ; EtBr, bromure d'éthidium ; FQ, fluoroquinolone ; INH, isoniazide ; MAC, macrolide ; NOV, novobiocine ; PIP, pipérine ; QRC, quercétine ; RES, réserpine ; RIF, rifampicine ; SPE, spectinomycine ; TET, tétracycline ; TTD, tétrandrine ; TZ, thioridazine ; VAN, vancomycine ; VER, vérapamil. D'après ¹⁰².

Les **altérations chromosomiques peuvent être de différentes nature** : (i) mutations ponctuelles non-synonymes (*Single Nucleotide Variant, SNV*), (ii) petites délétions ou insertions (<50 bp) (*InDels*) dues à des erreurs de répliation de l'ADN ^{103,104 96}, plus rarement (iii) variants structuraux à type de grandes délétions (>50 pb), décrites pour la résistance au pyrazinamide, au PAS, ou encore à la streptomycine ¹⁰⁵, ou à type d'insertion d'une séquence d'insertion répétée (ex. *IS6110*) au sein de gènes impliqués dans la résistance ^{98, 106}. Ce dernier mécanisme a été décrit chez des mutants sélectionnés chez la souris ¹⁰⁷ et des souches cliniques résistantes à la BDQ (insertion de *IS6110* dans *Rv0678*) ^{98, 106}.

Si ces altérations chromosomiques apparaissent durant la phase de répliation active des bacilles, elles peuvent aussi apparaître durant la phase de latence et seraient alors la conséquence de l'altération de l'ADN du au stress oxydatif ¹⁰⁸.

2.4. Mécanismes de sélection et d'acquisition de la résistance aux antituberculeux

Bien que *Mtb* se caractérise par un taux de mutation très faible par rapport aux autres bactéries d'intérêt médical (**Figure 18**) la résistance acquise de *Mtb* aux antibiotiques est en général secondaire à la sélection de mutants résistants lorsqu'un schéma thérapeutique suboptimal est employé^{109, 110, 111, 112}. Cette sélection s'opère lorsque deux conditions sont réunies : (i) un inoculum important et (ii) un seul antibiotique actif. La première condition est remplie dans la TB cavitaire pulmonaire, au début du traitement, où les bacilles sont dans des conditions de multiplication intense en raison de la bonne oxygénation de la caverne. Dans ce type de lésion, la population bacillaire atteint en moyenne 10^8 unités¹¹³. La seconde condition est remplie lorsque le malade reçoit une monothérapie efficace suite à la prescription ou la prise d'un seul antituberculeux (du fait de la prescription d'une monothérapie effective ou de difficultés d'approvisionnement en antituberculeux), ou la mauvaise diffusion des antibiotiques aboutissant à une monothérapie locale dans certains sites.

Comme dans toute population bactérienne, il existe, au sein des populations de bacilles tuberculeux sensibles (ou sauvages), des mutants résistants dont la proportion varie selon l'antibiotique **Figure 19**^{114, 115}. Généralement, on estime que la probabilité d'acquérir une mutation associée à la résistance à un antituberculeux est de l'ordre de 10^{-7} par évènement. Cela veut dire qu'au sein d'une caverne tuberculeuse qui contient 10^8 bacilles, il y a théoriquement, avant tout traitement, des mutants résistants à chaque antibiotique : en moyenne 10 bacilles résistants à un antibiotique donné ($10^8 \times 10^{-7}$). Le traitement par un seul antituberculeux conduit donc presque inéluctablement à la sélection de mutants résistants. La survenue de chaque mutant étant indépendante, la probabilité de développer un double mutant résistant à une bithérapie est égale au produit des fréquences de chaque mutant pris isolément, soit de l'ordre de 10^{-14} , ce qui en fait un évènement très peu probable. L'administration simultanée d'antituberculeux permet donc, à priori, d'éviter une telle sélection lorsque la population est initialement sensible à ces deux molécules.

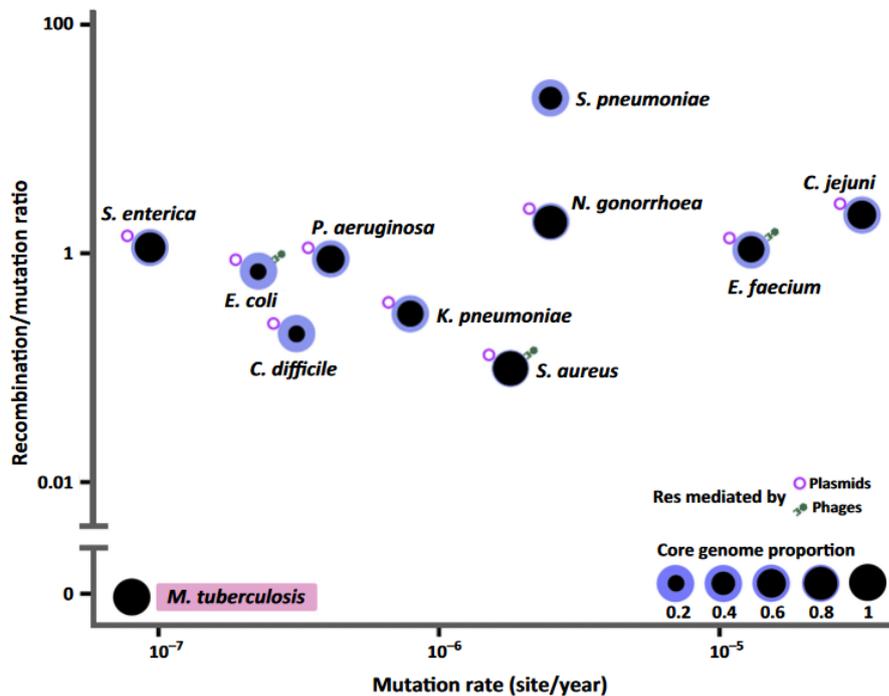


Figure 18- Caractéristiques génomiques des principales espèces bactériennes médiant la résistance aux antibiotiques. La proportion du *core genome* indique la proportion de génomes individuels qui sont communs à tous les membres de l'espèce. Les taux de mutation sont basés sur des analyses phylogénétiques du *core genome* d'isolats cliniques. La présence d'une résistance à médiation plasmidique ou phagique (Res) est indiquée dans la figure. D'après ¹¹⁶

C. difficile, *Clostridium difficile* ; *C. jejuni*, *Campylobacter jejuni* ; *E. faecium*, *Enterococcus faecium* ; *E. coli*, *Escherichia coli* ; *K. pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae* ; *M. tuberculosis*, *Mycobacterium tuberculosis* ; *N. gonorrhoeae*, *Neisseria gonorrhoeae* ; *P. aeruginosa*, *Pseudomonas aeruginosa* ; *S. enterica*, *Salmonella enterica* ; *S. aureus*, *Staphylococcus aureus* ; *S. pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*.

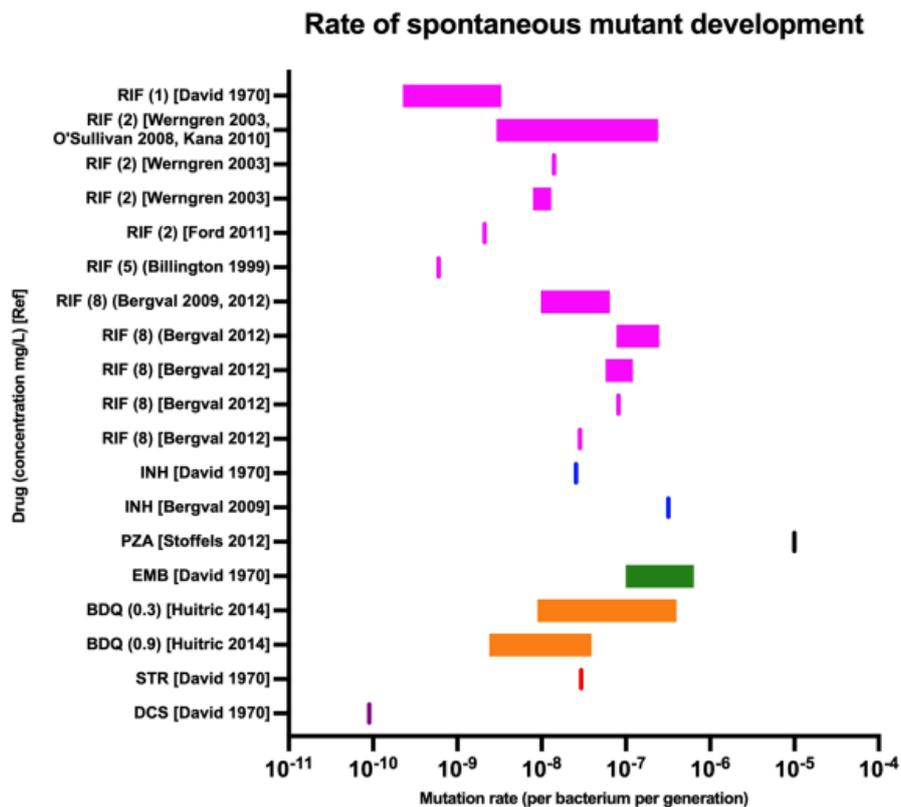


Figure 19- Taux de mutation spontanée *in vitro* pour les principaux antituberculeux. Les taux ont été mesurés dans une variété de souches de laboratoire et cliniques provenant de diverses lignées. D'après ¹¹⁵

RIF, rifampicine ; INH, isoniazide ; PZA, pyrazinamide ; EMB, éthambutol ; BDQ, bédaquiline ; STR, streptomycine ; DCS, D-cyclosérine. Les concentrations en mg/L sont indiquées entre parenthèses et suivies de la référence originale.

2.5. Paramètres autres que la proportion naturelle de mutants résistants impliqués dans la résistance aux antituberculeux

L'émergence de mutants résistants qui peuvent être sélectionnés par un traitement antibiotique comme décrit dans le paragraphe précédent est un phénomène classiquement considéré comme aléatoire et survenant à faible fréquence. Des données récentes montrent que cette **émergence de mutants résistants est en réalité un phénomène complexe dans lequel interviennent de multiples paramètres**, dont des facteurs liés à l'évolution génétique des souches (fond génétique de MTBC (lignées), hétérorésistance), des mécanismes moléculaires qui sont liés à la bactérie (pompes d'efflux, mécanismes de réparation de l'ADN, tolérance, persistance, épistasie et mutations compensatoires), des facteurs liés à l'hôte (immunodéficience comme l'infection par le VIH, diabète de type 2 et TB cavitaires ¹¹⁷ et des

facteurs liés à l'environnement de la bactérie (stress oxydatif). Seuls les facteurs liés à la bactérie seront détaillés ci-après.

2.5.1. Influence de la lignée phylogénétique

Certaines études ont mis en évidence que le taux de mutations varie selon la lignée^{118, 119, 120}. Si les lignées 2 et 4 ont été souvent rapportées comme étant plus fréquemment que les autres associées à la résistance aux antituberculeux, certaines publications ont au contraire rapporté des taux et fréquences de mutations semblables quelle que soit la lignée¹²¹.

Il est supposé que ces différences soient dues à (i) la différence d'inoculum induit par ces souches chez l'hôte, (ii) la présence de mutations augmentant la proportion de mutants dans les gènes impliqués dans la réplication, réparation et recombinaison de l'ADN (observé pour la lignée 2 en particulier), et (iii) la différence d'impact sur le fitness des mutations de résistance du fait d'existence de mutations compensatoires qui seraient spécifiques de ces lignées⁹⁶. Cependant, aucune de ces hypothèses n'a été démontrée formellement et les bases moléculaires expliquant les différences observées entre les lignées demeurent largement inexpliquées.

2.5.2. Hétérorésistance

Le terme d'hétérorésistance est utilisé pour définir l'existence au sein d'un hôte de différentes populations bactériennes ; cela peut correspondre à des cas de figures très différents chez un même patient : (i) infection polyclonale due à une infection mixte (c'est-à-dire une infection par deux souches différentes au même moment) ou une superinfection (c'est-à-dire patient infecté avec nouvelle souche de *Mtb* alors qu'il était déjà infecté par une autre souche) ou (ii) émergence spontanée de clone(s) présentant un ou des variants associés à la résistance (Resistance-Associated Variant, RAV) en mélange avec une population monoclonale, sensible ou non aux antibiotiques¹²² (Figure 20).

Dans certains pays comme la Chine, les superinfections avec des souches résistantes ont été rapportées comme étant majoritairement impliquées dans l'acquisition de résistances additionnelles aux antituberculeux de seconde ligne chez des patients traités pour une TB MDR, soulignant l'importance de la détection et de l'isolement précoces de ces patients, en particulier dans les pays à forte endémie tuberculeuse¹¹⁷. Les méthodes moléculaires permettent de diagnostiquer l'hétérorésistance, mais les seuils définissant une infection polyclonale varient

d'une étude à l'autre. Le plus souvent, une différence de plus de 100 SNP entre 2 clones présents chez un même patient est proposée pour définir une infection polyclonale ¹¹⁷.

L'hétérorésistance correspondant à la présence d'une sous-population bactérienne présentant un **RAV** est catégorisée en différentes classes selon le pourcentage que représente la population possédant le RAV parmi la population bactérienne étudiée (c'est-à-dire la **fréquence allélique**) : la **microhétérorésistance** (<5%) et la **macrohétérorésistance** (5-95%). Au-delà de 95%, on parle de résistance complète ou de mutation fixée dans la population ¹²³.

Un facteur de complexité supplémentaire s'ajoute aux notions d'hétérorésistance telles que définies ci-avant. En effet, sous l'effet de la forte pression de sélection d'un traitement antituberculeux, des **sous-populations hétérogènes variées, c'est-à-dire possédant des RAV différents, peuvent apparaître chez un même individu (Figure 21)** ¹²². Les variations qui existent entre les différents antituberculeux en termes de pharmacocinétique et de pénétration au sein des différentes lésions participent à ce phénomène ¹²². Plusieurs études ont décrit ce phénomène, aussi nommée spatialité des lésions ¹²² où bien qu'un clone soit présent de façon fixée dans un échantillon donné d'un patient, d'autres échantillons prélevés chez le même patient au cours de la séquence thérapeutique peuvent révéler la présence d'autres clones possédant d'autres RAV en émergence ²².

La prévalence et l'ampleur de l'hétérorésistance peuvent être modulées par quatre facteurs : (i) le taux de mutation, (ii) la taille de l'inoculum bactérien, (iii) la diversité des mutations associées à la résistance pour un antituberculeux donné (aussi appelé spectre mutationnel) et (iv) le coût en fitness engendré par les mutations associées à la résistance et (v) l'épistasie **(Figure 20)** ¹²².

Si le phénomène d'hétérorésistance a été décrit pour pratiquement tous les antituberculeux (streptomycine ¹²⁴, isoniazide ^{123,125}, rifampicine ^{123,125}, pyrazinamide ¹²⁶, éthambutol ^{126,127}, injectables de seconde ligne ^{126,123}, et délamanide ¹¹²), il semble plus fréquent pour les FQ^{128,126,123,129} et la BDQ^{130 127}.

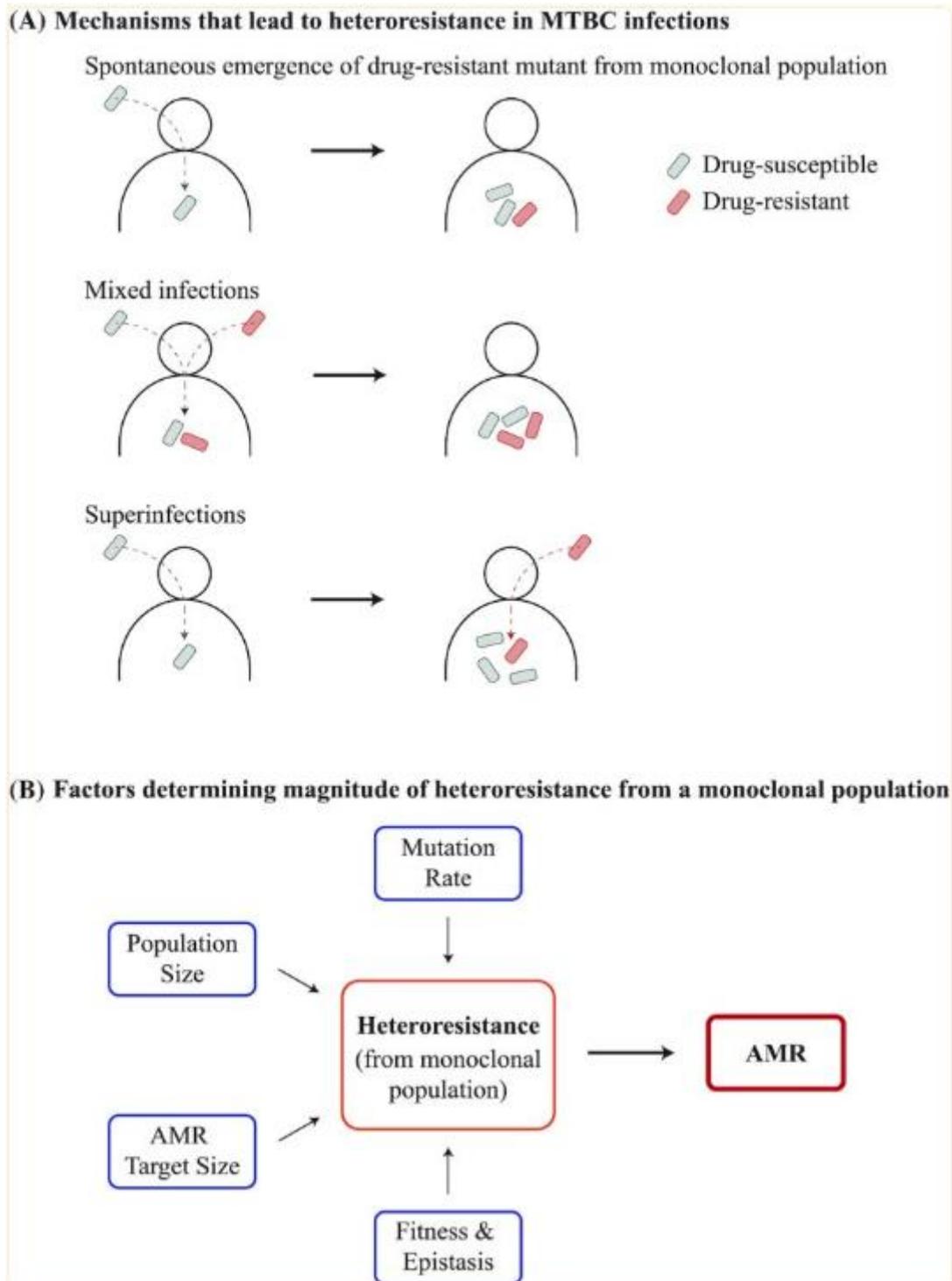


Figure 20- (A) Mécanismes conduisant à l'apparition de l'hétérorésistance (MTBC : *Mtb* complex). (B) Facteurs influençant le degré de l'hétérorésistance (AMR : AntiMicrobial Resistance). D'après¹²²

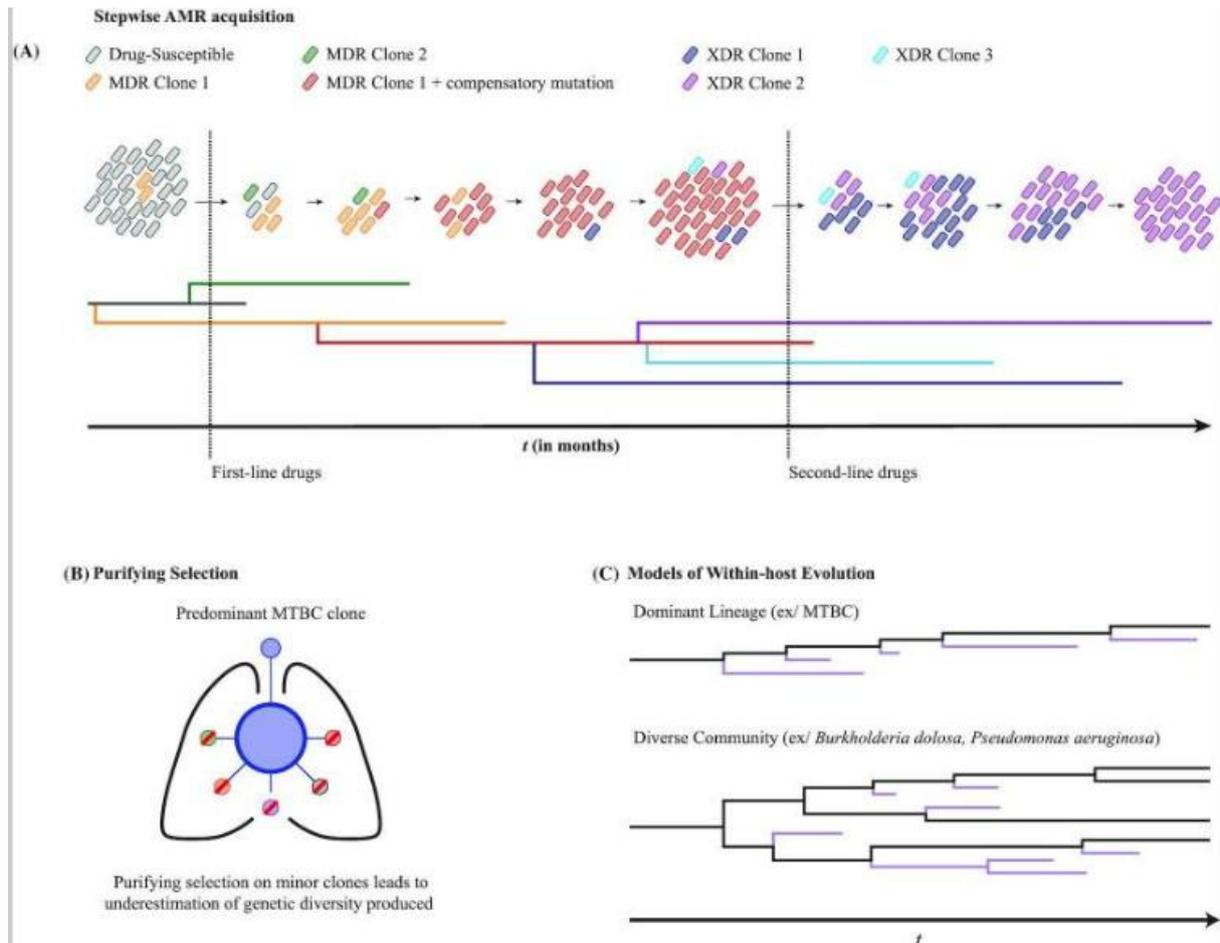


Figure 21- Dynamique d'acquisition de la diversité génétique dans le contexte du traitement antimicrobien. D'après ¹²²

2.5.3. Tolérance et persistance et les gènes qui leur sont associés, le tolérome

La tolérance est associée à l'échec et aux rechutes de traitement de nombreuses infections bactériennes, dont la TB ¹³¹. Ainsi le fait que 5 à 10% des patients rechutent après avoir achevé un schéma thérapeutique complet avec des bacilles sensibles ¹³², a fait suspecter la présence de bacilles tolérants. D'ailleurs les bacilles présents dans le caséum (en extracellulaire), la plupart du temps en phase non-répliquative, ont un haut niveau de tolérance ¹³³.

Tandis que la **résistance** est définie par la capacité d'une bactérie à croître en présence de fortes concentrations d'antibiotique, quelle que soit la durée d'exposition à cet antibiotique, et quantifiée par la CMI de cet antibiotique, la **tolérance** est définie par la capacité d'une bactérie à croître en présence de fortes concentrations d'antibiotiques, mais de façon transitoire, aussi

ne peut-elle pas être quantifiée par la CMI qui demeure inchangée. Alors que résistance et tolérance concernent une population bactérienne entière, la **persistance** est définie par l'existence dans la population bactérienne d'une sous population tolérante (**Figure 22**)¹³¹. La **dormance** peut être vue comme un stade extrême de ralentissement de croissance, la dormance induisant la tolérance étant alors définie comme « indifférence aux antibiotiques ». La quantification de la tolérance et de la persistance ne peut se faire qu'en mesurant des temps minimums pour attendre la bactéricidie (ou MDK « Minimum Duration Killing ») (**Figure 22**)¹³¹. La tolérance et la persistance ne concernent que les antibiotiques bactéricides, contrairement à la résistance qui concerne à la fois antibiotiques bactéricides et bactériostatiques.

Si la résistance est médiée uniquement par des altérations génétiques spécifiques d'une classe d'antibiotique (appelé « **résistome** ») et transmises aux cellules filles, la tolérance et la persistance peuvent être dues à des altérations génétiques non spécifiques d'une classe d'antibiotique (appelé « **persistome** ») ou des conditions environnementales particulières qui ne sont pas transmises aux cellules filles.

On distingue **deux formes de tolérance** : tolérance **associée au ralentissement de croissance** et tolérance associée à un **décalage de croissance**. La tolérance liée au ralentissement de la croissance ne concerne que les antibiotiques bactéricides actifs sur les bactéries en phase de multiplication (bêta-lactamines et FQ), et est due à la fois à des facteurs liés à la bactérie (temps de division) et des facteurs non liés à la bactérie, induisant un stress oxydatif (croissance en milieu appauvri, biofilm ou vie intracellulaire, réponse immunitaire de l'hôte, antibiotique comme les FQ, bactéricides en induisant une réponse au stress)^{134, 135}, et des erreurs de traduction entraînant une tolérance accrue à la rifampicine¹³⁶.

Le « spectre mutationnel » conduisant à la persistance étant plus large que celui de la résistance¹³⁷, les mutations conduisant à un haut niveau de persistance pourraient représenter un « tremplin » (« *stepping stone* ») et ainsi faciliter l'acquisition de mutations associées à la résistance et donc le développement de l'hétérorésistance puis de la résistance complète¹³⁸. Cependant, cette hypothèse n'a cependant pas été démontrée chez des souches cliniques de *Mtb*. Plusieurs études ont montré chez *Mtb* que des mutations entraînant un décalage du cadre de lecture dans le gène *glpK*, qui code une glycerol-3-kinase, pourraient avoir un rôle dans la tolérance^{139,140}. Ces mutations entraînent un ralentissement de la croissance bacillaire, et une sensibilité diminuée à l'isoniazide, à la rifampicine et à la moxifloxacine en induisant un phénotype tolérant^{139,140}. Ces mutations apparaissent être transitoires, conduisant à un mode

« on/off » du phénotype tolérant ^{139,140}. Il faudrait cependant confirmer cela par séquençage directement à partir de l'échantillon du patient, car la mise en culture des isolats cliniques dans des milieux contenant du glycérol pourrait représenter un biais important ¹⁴¹. Un autre mécanisme moléculaire est suspecté d'induire la tolérance chez *Mtb*, à savoir des mutations au sein du gène *prpR*, qui code la synthèse d'un activateur transcriptionnel de l'opéron *prpDC* ¹⁴². Il a été montré que des mutants dans ce gène avaient une survie augmentée dans un modèle macrophage, avec traitement par isoniazide, rifampicine ou ofloxacine ¹⁴². Enfin, les données issues d'une étude de type GWAS ont montré une association entre les mutations avec décalage du cadre de lecture dans *glpK* et les mutations *prpR* et la multirésistance, ce qui constitue une preuve indirecte du rôle de « tremplin » de ces mécanismes mutationnels induisant la tolérance/persistence dans l'évolution de la résistance ¹³⁹. Des études complémentaires sont donc nécessaires pour déterminer le « tolérome » de *Mtb*, c'est-à-dire les gènes qui interviennent dans le mécanisme de tolérance/persistence.

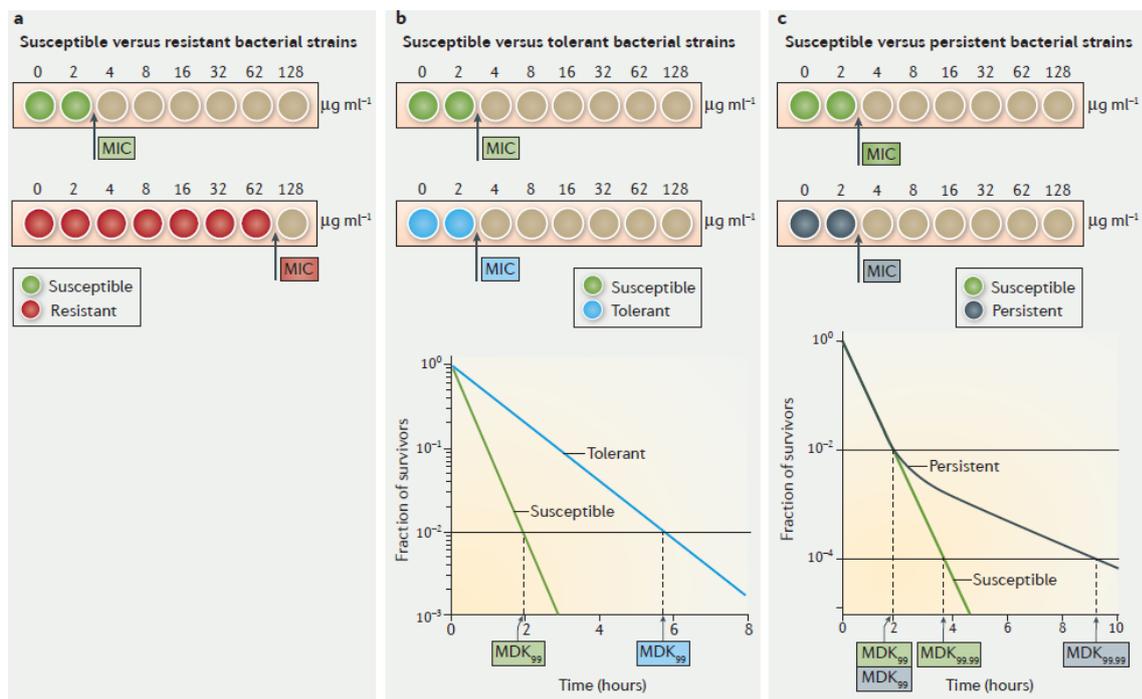


Figure 22- Distinction entre résistance (a), tolérance (b) et persistance (c). MDK : Minimum Duration Killing D'après ¹³¹

2.5.4. Fitness, mutations compensatoires et épistase

Les altérations chromosomiques impliquées dans la résistance aux antibiotiques peuvent avoir des conséquences sur le fitness des bactéries ; le « **fitness** » d'une bactérie étant défini par sa capacité à survivre, à se reproduire et à être transmise, y compris dans un environnement non favorable ^{143,144}.

Contrairement à la théorie initiale simpliste proposant que les mutations qui mènent au développement de la résistance à un antibiotique s'accompagnent d'une réduction de fitness car elles compromettent des fonctions vitales de la bactérie ^{145,146}, on sait maintenant que chez *Mtb*, le « fitness » des souches résistantes varie, non seulement en fonction de la nature de la mutation observée, mais également en fonction de la lignée phylogénétique de la souche et de la présence de mutations compensatoires ^{147,148,147,149,150}. Ainsi, certaines mutations associées à la résistance n'ont pas d'impact sur le fitness, comme la substitution la plus fréquemment identifiée dans RpoB, S450L ^{147,151}. Le fond génétique de la bactérie peut également moduler l'impact des mutations sur le fitness. Ainsi la substitution RpoB H445D a un impact sur le fitness plus important dans la souche CDC1551 que dans la souche T85 ¹⁴⁷. C'est le cas aussi pour la mutation RpoB S450L dont l'impact sur le fitness est moins important dans la lignée Beijing que dans la lignée Euro-Américaine ¹⁵².

Les **mutations compensatoires** sont des altérations chromosomiques secondaires dans d'autres gènes que ceux impliqués dans la résistance et qui vont compenser la perte de fitness engendrée par l'acquisition de mutations de résistance. Ces altérations chromosomiques ont été décrites soit dans le même gène que celui dans lequel survient la mutation associée à la résistance, soit dans des gènes impliqués dans des voies métaboliques similaires ¹⁵³. Cela concerne plusieurs antituberculeux (**Tableau 4- Mécanismes d'action des antituberculeux, gènes impliqués dans la résistance, et mécanismes compensatoires. Tableau 4 et Figure 23**) :

- des mutations dans la région régulatrice du gène *ahpC* (qui code une alkyl hydroperoxidase reductase) entraînant sa surexpression compensent l'impact sur le fitness due à la perte d'activité catalasique due à des mutations dans *katG* de 80% des souches cliniques résistantes à l'isoniazide ¹⁵⁴,
- concernant la rifampicine, les mutations survenant dans les gènes *rpoA* et *rpoC* (codant des ARN polymérase) compensent la perte de fitness engendrée par les mutations survenant dans *rpoB* ^{155,156} et augmentent la transmissibilité ^{155,156}.

- concernant les aminosides, un fitness accru des souches cliniques portant la mutation a1401g dans *rrs* (mutation de résistance la plus fréquente) a été décrit, qui pourrait être lié à la présence de mutation(s) compensatoire(s) permettant de restaurer le fitness ¹⁵⁷.

Enfin, la notion d'« **épistasie** » décrite il y a plus de 100 ans en génétique et désignant l'interaction existant entre deux ou plusieurs gènes pourrait être un déterminant essentiel du développement de la résistance multiple ^{158,159}. Selon cette notion, des mutations conférant la résistance à différentes molécules indépendantes peuvent interagir ensemble et entraîner une modification du « fitness » de la bactérie. Ainsi, l'acquisition d'une résistance supplémentaire par la bactérie peut améliorer la perte de « fitness » due à la précédente mutation responsable de résistance (épistasie positif) ¹⁶⁰. Cela a été décrit pour plusieurs antituberculeux (**Tableau 4- Mécanismes d'action des antituberculeux, gènes impliqués dans la résistance, et mécanismes compensatoires. Tableau 4 et Figure 23**):

- un « épistasie » positif a été décrit entre des mutations du gène *gyrA*, responsables de résistance aux FQ, et des mutations du gène *rpoB*, responsables de la résistance à la rifampicine ¹⁵⁹. Les souches de *M. smegmatis* porteuses de la combinaison de ces mutations spécifiques des gènes *gyrA* et *rpoB* avaient un meilleur fitness que les souches porteuses d'une seule mutation. Cette combinaison de polymorphismes au niveau de *gyrA* et *rpoB* a été retrouvée dans des souches cliniques pré-XDR ¹⁶¹.
- On pourrait s'interroger sur une interaction épistatique positive entre les mutations RpoB : S450L et KatG : S315T qui sont très souvent associées au sein des souches MDR. Il a été montré *in vitro* que des souches résistantes à l'isoniazide étaient plus susceptibles d'acquérir la mutation RpoB S450L ¹⁶². En fait, pour ce qui concerne KatG S315T, l'association avec la RpoB S450L serait davantage liée au fait que son coût en fitness est faible (montré pour les souches de la lignée 2), expliquant sa sélection *in vivo* (alors que ce n'est pas le cas *in vitro*) ^{162, 163}.

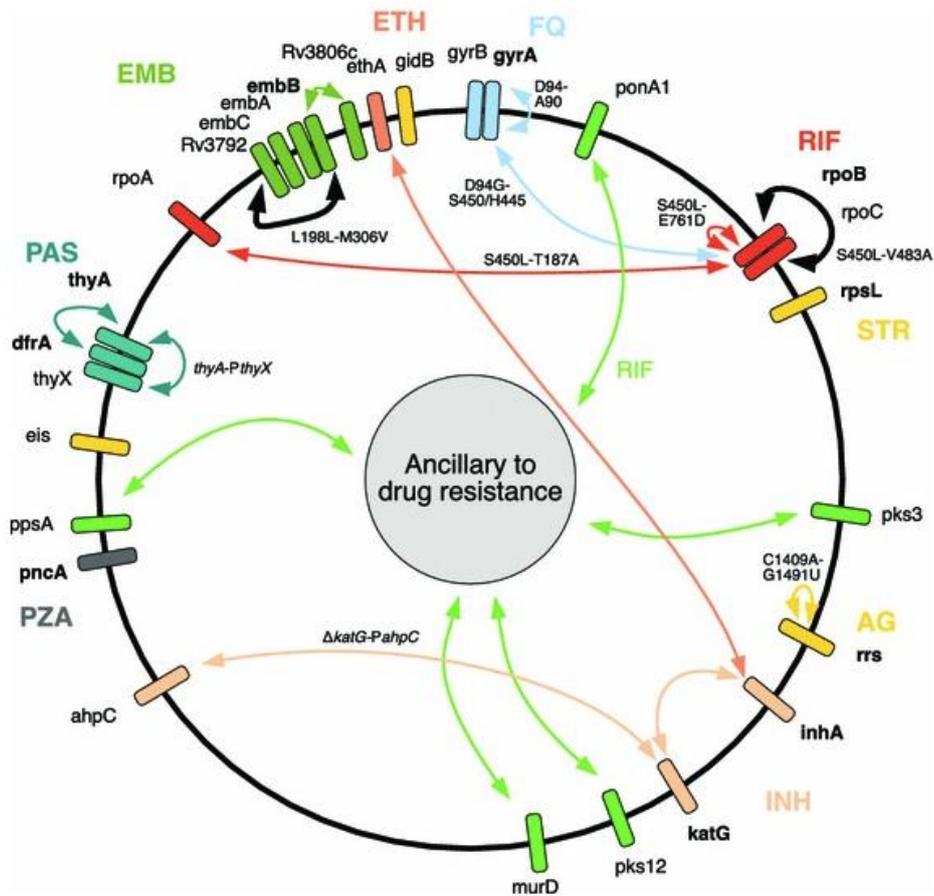


Figure 23- La résistance aux antibiotiques chez *Mtb* est le résultat d'un réseau d'épistasie. Les gènes clés de la résistance aux antituberculeux de *Mtb* ont été représentés, en tenant compte de leur position approximative dans le génome. Une couleur est utilisée pour chaque antibiotique : rouge pour la rifampicine, rose saumon pour l'isoniazide, bleu pour les FQ, vert pour l'éthambutol, jaune pour les aminosides et turquoise pour le PAS. Les gènes en gras sont connus pour être directement impliqués dans la résistance aux antibiotiques. Les lignes indiquent des interactions épistatiques putatives, reliant des gènes impliqués dans la voie métabolique d'un antituberculeux ainsi que des mécanismes plus larges/indirects appelés "auxiliaires à la résistance aux antituberculeux". Les lignes en gras reliant *rpoB* à *rpoC* et *embB* à Rv3792 font référence à des mécanismes compensatoires validés *in vitro*. Les paires de mutations spécifiques utilisant la numérotation de *Mtb* sont indiquées lorsqu'elles sont connues. D'après ¹⁶⁴

2.6. Mécanismes de résistance par antituberculeux

Une synthèse de l'état des connaissances actuelles concernant les mécanismes d'action et de résistance, ainsi que les limites actuelles de diagnostic de la résistance pour chacun des antituberculeux est présentée dans ce chapitre. En dehors des FQ, de la BDQ et de la clofazimine (CFZ) pour lesquelles des chapitres dédiés sont consacrés plus loin dans ce manuscrit, les informations concernant les autres antibiotiques sont très synthétiques pour ne mentionner que les points importants ; ce d'autant que le **Tableau 4** fait la synthèse des mécanismes d'action, des gènes et régions intergéniques impliquées dans la bioactivation des prodrogues, dans la résistance aux différents antituberculeux et dans les mécanismes de compensation.

2.6.1. Isoniazide

L'isoniazide est une prodrogue activée par la catalase-peroxydase qui est codée par *katG*. Une fois activé, l'isoniazide inhibe la synthèse des acides mycoliques en ciblant InhA (enoyl-acyl *carrier protein* réductase). La résistance à l'isoniazide est principalement médiée par des mutations de *katG*, plus rarement de *inhA* ou de sa région promotrice. Les mutations dans *katG*, telles que la substitution S315T qui est la plus fréquente ($\approx 70\%$ des souches cliniques résistantes à l'INH) sont associées à un haut niveau de résistance à l'isoniazide (CMI > 1 mg/L) ^{165,166,167}. La mutation c-15t dans le promoteur de *inhA* entraîne une résistance par surexpression de la cible, et entraîne une résistance croisée à l'éthionamide. Les mutations au sein du gène *inhA* sont plus rares, et entraînent une diminution d'affinité du dérivé actif de l'isoniazide pour sa cible ^{167,168}. Les mutations au sein du promoteur de *inhA* ont été initialement décrites comme associées à un bas niveau de résistance à l'isoniazide ($0,1 < \text{CMI} < 1$ mg/L) ¹⁶⁹, mais elles peuvent entraîner un haut niveau de résistance, en particulier en cas de présence des substitutions S94A ou I194T dans InhA ¹⁷⁰.

Bien que la co-occurrence de mutations dans le promoteur et *inhA* reste rare, il faut rester prudent quant à l'interprétation qu'on peut faire sur le niveau de résistance à l'isoniazide en cas de détection d'une mutation c-15t dans *inhA* par les techniques commerciales, qui ne permettent pas de détecter les mutations au sein de la région codante de *inhA* (hormis le Deeplex® Myc-TB, **Tableau 6**). Enfin, la mutation silencieuse FabG L203L trouvée dans plusieurs souches cliniques a été démontrée expérimentalement comme étant associée à la résistance croisée à l'isoniazide et à l'éthionamide ¹⁷¹. Au niveau des techniques commerciales de diagnostic

génotypique de la résistance seul le test Xpert® MTB/XDR est en mesure de détecter cette mutation, la portion de *fabG* explorée par le test Deeplex® Myc-TB ne couvrant pas cette mutation. Il s'agit, à notre connaissance, du seul cas rapporté de mutation silencieuse associée à la résistance chez *Mtb*.

2.6.2. Rifampicine

Chez *Mtb*, la rifampicine agit en se fixant sur la sous-unité β de l'ARN polymérase, codée par le gène *rpoB*. Cela entraîne une inhibition de l'élongation de l'ARN messager. La rifampicine est un antituberculeux qui (i) conserve une activité sur les bacilles à métabolisme ralenti¹⁷², ce qui lui confère une forte activité stérilisante et (ii), diffuse et se concentre dans le caséum acellulaire¹⁷³ et les granulomes¹⁷⁴. La résistance à la rifampicine est médiée par des mutations survenant dans *rpoB* dans 95% des souches cliniques, et cette résistance est croisée avec la rifabutine et la rifapentine. Dans 90% des cas, ces substitutions surviennent au sein d'une région appelée RRDR (pour « *Rifampicin Resistance Determining Region* ») qui comprend les codons à 426 à 452 de RpoB (numérotation de *Mtb*). Les substitutions au niveau des codons 435 et 450 sont les plus fréquemment associées à la résistance à la rifampicine^{175,176}. Cependant, certaines mutations situées dans la RRDR entraînent un bas niveau de résistance (en particulier L430P, D435Y, H445C/L/N/S et L452P). Les CMI de ces mutants étant souvent inférieures à la concentration critique de 1 mg/L, elles ne sont pas détectées par la méthode d'antibiogramme la plus répandue (MGIT) ; La non détection de la résistance en milieu MGIT pour ces mutations est aussi liée à une croissance plus lente dans ce milieu pour les souches portant ces mutations¹⁷⁷. C'est pourquoi l'OMS recommande depuis 2021 d'abaisser la concentration critique à 0.5 mg/L¹⁷⁸. Des mutations situées en dehors de la RRDR ont été rapportées chez environ 5% des souches résistantes à la rifampicine¹⁷⁹.

2.6.3. Pyrazinamide

Le pyrazinamide a permis de réduire significativement la durée de traitement de la TB à bacilles sensibles de neuf à six mois dans les années 1980. Sa principale caractéristique est sa capacité à inhiber les bacilles dans les lysosomes des macrophages, compartiments à PH acide¹⁸⁰. Le pyrazinamide est une prodrogue activée en acide pyrazinoïque par la pyrazinamidase/nicotinamidase codée par le gène *pncA*¹⁸¹. Le mode d'action du pyrazinamide est complexe et encore partiellement connu mais une des cibles d'action de l'acide pyrazinoïque est une aspartate décarboxylase codée par le gène *panD*. L'enzyme PanD catalyse une étape de

synthèse du coenzyme A qui intervient dans la voie de synthèse des acides mycoliques¹⁸². Par ailleurs, la fixation de l'acide pyrazinoïque à PanD entraînait la dégradation de cette dernière par la protéase caséinolytique ClpC1-ClpP¹⁸². Le pyrazinamide inhiberait également la *trans*-traduction par le biais de RpsA (*Ribosomal Protein S1*)^{183,184}. Les mutations survenant dans le gène *pncA* ou son promoteur sont le mécanisme de résistance le plus fréquent, elles sont responsables de 72 à 99% de la résistance au pyrazinamide^{185,183,181}. Cependant, la détection des mutations est difficile du fait de (i) leur dispersion tout ou long du gène et leur diversité (SNPs, Indels, hétérorésistance); à cela s'ajoute un diagnostic phénotypique difficile, notamment du fait du PH acide requis dans le milieu de culture. Des mutations dans *rpsA* ou encore *panD* ont été identifiées dans des souches résistantes au pyrazinamide sans mutation dans *pncA*^{184,183}, cependant le seul élément expérimental suggérant l'implication de ces gènes dans la résistance au pyrazinamide concerne la surexpression de *rpsA*^{186,187}.

2.6.4. Ethambutol

L'éthambutol est actif sur les bacilles en phase active de multiplication, en inhibant la synthèse de composés de la paroi, arabinogalactanes et lipoarabinomananes, via l'opéron *embCAB* qui code des arabinosyltransferases. La résistance à l'éthambutol est liée à des mutations au sein de cet opéron ou la région intergénique *embC-embA*, chez 80% des souches, le plus fréquemment dans *embB*^{188,189,190}. Les substitutions au niveau des codons 306 d'EmB sont les plus fréquentes chez les souches résistantes à l'éthambutol (environ 60%), la nature de la substitution impactant le niveau de résistance (M306V/L entraînant des CMI plus élevées que M306I)¹⁹¹. Des mutations additionnelles dans *ubiA* ont été rapportées comme entraînant un haut niveau de résistance à l'éthambutol en présence de mutations dans *embB*. Le gène *ubiA* code une décaprenyl-phosphate 5-phosphoribosyltransferase synthase, qui est impliquée dans la synthèse de la paroi. Les mutations dans *ubiA* ont été décrites comme associées à certaines lignées, et sont prédominantes dans les souches africaines^{192,191}. Les mutations dans *embR*, également impliqué dans la synthèse de la paroi ont été également été décrites comme associées à des niveaux variables de résistance à l'éthambutol¹⁹³.

2.6.5. Streptomycine

La streptomycine, découverte en 1942, a été le premier antibiotique efficace pour le traitement de la TB. Elle agit en se fixant à la protéine ribosomale S12 (codée par *rpsL*) et l'ARNr 16S (codé par *rrs*) (sous-unité 30S du ribosome), ce qui entraîne un blocage de la

traduction et donc de la synthèse des protéines^{194,195}. Les principaux mécanismes de résistance à la streptomycine sont des mutations dans les gènes *rpsL* et *rrs* (\approx 60 à 70% des souches cliniques résistantes à la streptomycine), la substitution K43R dans RpsL étant la plus fréquente. Plus récemment, des mutations dans le gène *gid*, qui code une 7-méthylguanosine méthyltransférase qui agit spécifiquement sur le nucléotide g527 de l'ARNr 16S, ont été confirmées comme impliquées dans un bas niveau de résistance à la streptomycine^{196, 197}.

2.6.6. Le linézolide

Le linézolide est une oxazolidinone, il agit en se fixant au domaine V de la sous-unité 50S du ribosome, et inhibe ainsi la synthèse des protéines à une étape précoce¹⁹⁸. La résistance au linézolide est principalement médiée par des substitutions dans deux éléments de la sous unité 50S du ribosome, l'ARN ribosomal 23S codé par le gène *rplC* et la protéine ribosomale L3 codée par le gène *rplC*¹⁹⁸. Les mutations les plus fréquentes sont dans *rplC*, elles se distribuent tout au long du gène, mais quatre positions sont plus fréquemment mutées (*rplC* g2299t, g2814t, g2270t/c and g2746a)¹⁹⁹. La plupart de ces mutations sont associées à un haut niveau de résistance (élévation des CMI d'un facteur 8 à 50), tout comme les mutations décrites dans *rplC*, notamment la plus fréquente (substitution C154R - élévation des CMI d'un facteur 4 à 32).

2.6.7. Cyclosérine

La cyclosérine a été découverte en 1955. Elle agit en inhibant deux enzymes impliquées dans la voie de synthèse du peptidoglycane (dipeptide D-Ala-D-Ala) : l'alanine racémase (codée par *alr*) et la D-Ala:D-Ala ligase (codée par *ddlA*)²⁰⁰. La résistance à la cyclosérine serait principalement liée à des mutations dans le gène *alr*²⁰¹. Le gène *cycA*, qui code le transporteur de la cyclosérine a également été décrit comme impliqué dans la résistance à la cyclosérine²⁰², ainsi que le gène *ald* qui code la L-alanine déshydrogénase²⁰³.

2.6.8. Injectables de deuxième ligne : amikacine, kanamycine et capréomycine

Ce groupe comprend deux aminosides, l'amikacine et la kanamycine, et un polypeptide cyclique, la capréomycine. Bien qu'elles appartiennent à des classes différentes, elles se fixent sur la même cible, l'ARNr 16S, entraînant ainsi une inhibition de la synthèse des protéines¹⁷⁶. L'amikacine demeure la seule molécule recommandée pour le traitement des TB MDR (**Tableau 3**)⁹⁰. Les mutations de *rrs* sont les plus fréquentes et entraînent une résistance

croisée entre ces molécules, de haut niveau lorsque les mutations surviennent dans la région 1400 de *rrs*. La mutation a1401g au sein de *rrs* est la mutation la plus fréquemment rapportée, responsable de 70 à 80% des résistances à l'amikacine et à la capréomycine et de 60% de la résistance à la kanamycine ²⁰⁴.

Le gène *tlyA* code une rRNA méthyltransferase requise pour la méthylation du ribose au sein de l'ARN ²⁰⁵ et est responsable d'une résistance isolée de haut niveau à la capréomycine. Par ailleurs, des mutations dans le promoteur du gène *eis* entraînent un bas niveau de résistance à la kanamycine, et pour certaines, telles que la c-14t, également à l'amikacine ²⁰⁶. Environ 80% des souches résistantes de bas niveau à la kanamycine ont une mutation associée à la résistance dans le promoteur de *eis*, du fait de la surexpression de cette protéine codant une acétyltransférase ²⁰⁷.

2.6.9. Nitro-imidazolés : délamanide et prétomanide

Deux molécules de cette nouvelle famille ont été développées et semblent avoir des mécanismes d'action similaires, bien que leur cible soit encore inconnue : le délamanide et le prétomanide. L'utilisation du délamanide a été autorisée en France pour le traitement des TB MDR depuis 2016. L'introduction du prétomanide dans le régime thérapeutique des TB XDR semble permettre de simplifier et de diminuer drastiquement leur durée de traitement, et avec un régime entièrement oral (18-24 à 6-9 mois) ²⁰⁸. Ces deux molécules agissent par deux mécanismes d'action : l'inhibition de la synthèse de la paroi et l'intoxication à l'oxyde nitrique (NO) ^{209,210}. Ce sont toutes les deux des prodrogues qui sont activées via la nitroréductase du bacille tuberculeux codée par le gène *ddn* ²¹¹.

Le délamanide inhibe la synthèse des acides méthoxymycoliques et kétomycoliques via le complexe F420, et génère la production de NO ²¹². Le complexe F420 est composé de deux enzymes, la déazaflavine-dépendante nitroréductase (Ddn), et la F420-dépendante glucose-6-phosphate déshydrogénase (FGD1, G6PD), et de quatre co-enzymes, FbiA, FbiB, FbiC et FbiD (**Figure 24**).

La résistance au prétomanide et au délamanide est due à des mutations survenant soit dans les gènes impliqués dans l'activation de la prodrogue (*fgd1* et *ddn*), soit dans les gènes impliqués dans la voie de synthèse du F420 (*fbiA*, *fbiB*, *fbiC*, *fbiD*) ^{211, 199}. Cependant, peu d'études corrélant les mutations retrouvées avec la CMI de ces deux molécules sont disponibles. Concernant le délamanide, la mutation la plus fréquemment rapportée dans Ddn est la W88stop,

les souches ayant des CMI élevées (≥ 16 mg/L en MGIT)²¹¹. D'autres mutations associées à la résistance ont été rapportées au niveau des codons 49 et 250 de FbiA, les substitutions D49Y, D49T et K250stop entraînant une importante élévation de la CMI (facteur 12 à 32). Concernant le prétomanide, du fait de son utilisation clinique encore faible, les données concernant la résistance ont été obtenues *in vitro*¹⁹⁹.

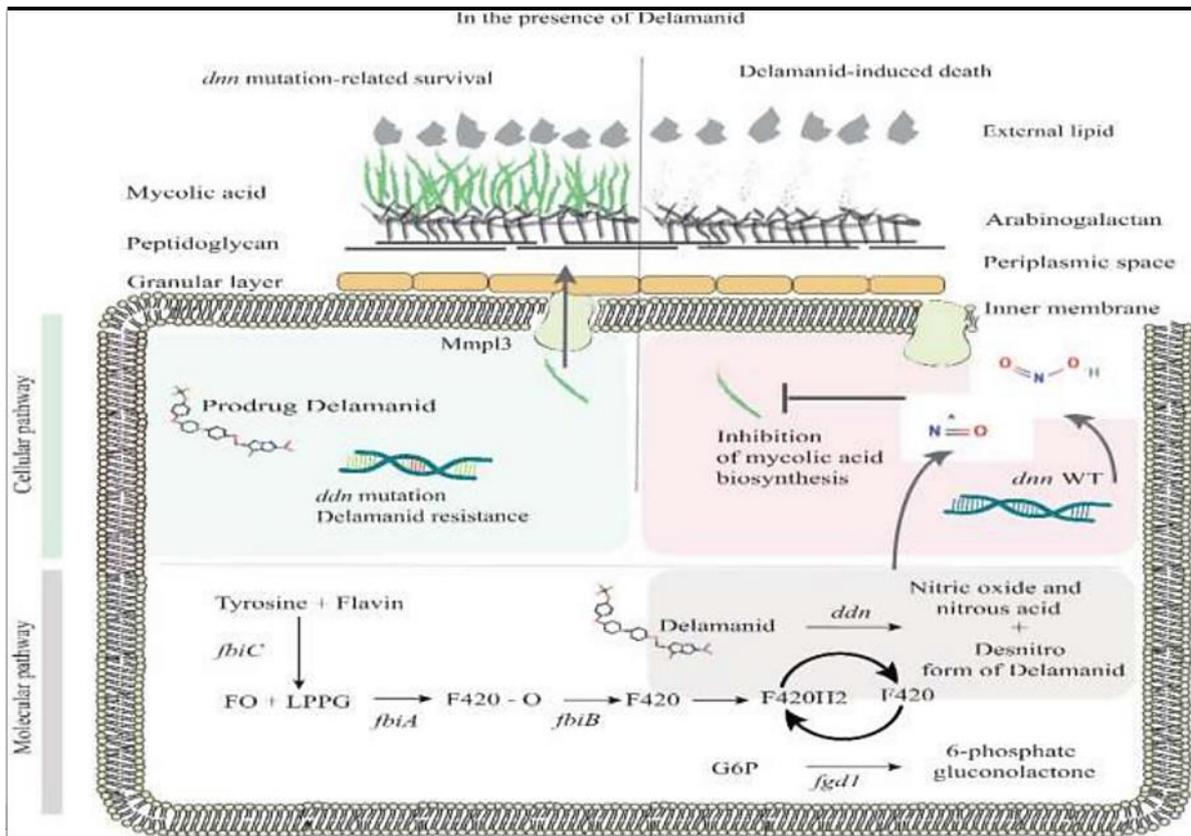


Figure 24- Mécanismes d'action du délamanide et mécanismes de résistance rapportés. D'après²¹¹

2.6.10. Ethionamide

L'éthionamide a été synthétisé en 1956, et est un analogue structural de l'isoniazide. L'éthionamide est une prodrogue activée par la flavine monooxygénase, EthA qui cible InhA, une enzyme du système FAS II nécessaire à l'élongation des acides gras qui participent à la synthèse des acides mycoliques. Une régulation de l'expression du gène *ethA* est médiée par le répresseur transcriptionnel *ethR*²¹³. La résistance à l'éthionamide est principalement due à des mutations au niveau des gènes *ethA*, *inhA* et de son promoteur²¹⁴. Bien qu'évoqué, il est probable que *ethR* ne joue aucun rôle dans la résistance à l'éthionamide, comme nous l'avons

montré récemment dans une étude rétrospective menée au CNR (**Publication 6**)²¹⁵. L'implication du gène *mshA*, qui code une enzyme essentielle de la voie de synthèse du mycothiol a également été mise en évidence²¹⁶. La résistance de haut niveau à l'éthionamide (CMI \geq 25 mg/L) est associée sur le plan génotypique à des combinaisons de mutations dans les gènes cibles, alors que les bas niveaux de résistance sont associés à des mutations survenant uniquement dans *ethA*²¹⁷.

2.6.11. Acide para-amino-salicylique

L'acide para-amino-salicylique (PAS) est un ancien antituberculeux synthétisé en 1946 par Lehmann. Il a été l'une des premières molécules à être utilisée dans le traitement de la TB en combinaison avec l'isoniazide et la streptomycine. Le PAS est utilisé désormais en deuxième recours dans le traitement de la tuberculose MDR (groupe C de l'OMS, **Tableau 3**)⁹⁰. Il agit en bloquant la conversion de l'acide para-amino-benzoïque en acide folique et inhibe ainsi la synthèse de l'ADN. Le principal mécanisme de résistance au PAS sont les mutations dans le gène *thyA*, qui représentent 40% de la résistance²¹⁸. Des mutations dans le gène *folC*, qui code la dihydrofolate synthase, ont également été décrites comme conférant la résistance dans des isolats cliniques, tout comme les mutations dans *ribD*, un autre gène impliqué dans la voie des folates^{219, 220}.

Tableau 4- Mécanismes d'action des antituberculeux, gènes impliqués dans la résistance, et mécanismes compensatoires.

ATB	Enzyme d'activation	Mécanisme d'action (cible)	Gènes associés à la résistance ^{221,a}	Gènes/mutations compensatoires
INH	Catalase peroxydase KatG	Inhibe la synthèse des acides mycoliques ; (InhA ; énoyl-ACP-reductase)	<i>katG</i> <i>inhA</i> <i>fabG</i> ¹⁷¹ <i>ahpC</i> <i>kasA</i> région intergéniques <i>oxyR'-ahpC</i> ; <i>furA-katG</i> ; <i>fabG-inhA</i>	<i>ahpC</i> ¹⁵⁴ <i>oxyR</i> '
RIF	-	Inhibe la transcription (sous-unité β de l'ARN polymérase RpoB)	<i>rpoB</i>	<i>rpoA</i> ^{155,156} <i>rpoC</i> ^{155,156}
EMB	-	Inhibe la synthèse de l'arabinogalactane (arabinosyltransférase EmbB)	<i>embB</i> <i>embA</i> <i>embC</i> <i>embR</i> ¹⁹³ région intergénique <i>embC-embA</i> <i>ubiA</i> ^{192, 191}	Rv3792, Rv3806c ¹⁹¹
PZA	Pyrazinamidase PncA	Interruption de la synthèse du coenzyme A impliqué dans la synthèse des acides mycoliques (aspartate décarboxylase PanD) ¹⁸² Inhibition de la <i>trans</i> -traduction (RpsA) ¹⁸³	<i>pncA</i> <i>panD</i> <i>clpC1</i> ^{182,222} <i>rpsA</i> ^{183 184}	inconnu
SM	-	Inhibition de la synthèse protéique (ARN 16s ribosomal)	<i>rrs</i> <i>rpsL</i> <i>gid</i>	inconnu
FQ	-	Inhibition de l'ADN gyrase (ADN gyrase)	<i>gyrA</i> <i>gyrB</i>	GyrA T80A et A90G
LNZ	-	Inhibition de la synthèse protéique (protéines ribosomales L3 et L4)	<i>rrl</i> ^{198,199} <i>rplC</i> ^{198,199}	
BDQ	-	Inhibition de l'ATP synthase AtpE	<i>atpE</i> Rv0678 (répresseur de la pompe d'efflux MmpS5-MmpL5) <i>pepQ</i> (aminopeptidase) Rv1979c	
CFZ	-	Potentielle inhibition de la chaîne respiratoire et des transporteurs d'ions (cible inconnue)	Rv0678 (répresseur de la pompe d'efflux MmpS5-MmpL5) <i>pepQ</i> Rv1979c	
CYS	-	Inhibe la synthèse du peptidoglycane (D-alanine racémase (Alr) et D-alanine ligase (DdL)	<i>alr</i> ²⁰¹ <i>ddlA</i> ²⁰¹ <i>cycA</i> ²⁰² <i>ald</i> ²⁰³	
DLM	Nitroréductase Ddn	Inhibition de la synthèse des composants de la paroi : acides méthoxymycolique et cétomycologique (cible inconnue)	<i>Ddn</i> <i>fgd1</i> (glucose phosphate déhydrogénase), <i>fbiA/B/C /D</i> (enzyme synthétisant le cofacteur F420 de la déazaflavine)	
AMK	-	Inhibition de la synthèse protéique (ARN 16s ribosomal)	<i>rrs</i> <i>eis</i> <i>whib7</i>	<i>rrs</i> c1409a et g1491t ¹⁵⁷
ETH	Monooxygénase EthA	Inhibition de la synthèse des acides mycoliques (InhA : énoyl-ACP-reductase)	<i>ethA</i> <i>inhA</i> <i>ethR</i> ²¹⁵ <i>fabG</i> ¹⁷¹ <i>mshA</i> ²¹⁶	
PAS	-	Inhibe la conversion de l'acide paraaminobenzoïque en acide folique (ThyA : <i>thymidilate synthase</i>)	<i>thyA</i> <i>ribD</i> (enzyme impliquée dans la synthèse de la riboflavine) <i>folC</i> (dihydrofolate synthase) <i>dfrA</i>	
PTM	Nitroréductase Ddn	Inhibition de la synthèse des composants de la paroi : inhibition de l'oxydation de l'hydroxymycolate en kétomycolate (cible inconnue)	<i>ddn</i> , <i>fgd1</i> (glucose phosphate déhydrogénase) <i>fbiA/B/C /D</i> (enzyme synthétisant le cofacteur F420 de la déazaflavine)	
KAN	-	Inhibition de la synthèse protéique (ARN 16s ribosomal)	<i>rrs</i> <i>eis</i> <i>whib7</i>	<i>rrs</i> c1409a et g1491t ¹⁵⁷
CAP	-		<i>rrs</i> <i>tlyA</i>	<i>rrs</i> c1409a et g1491t ¹⁵⁷

RIF : rifampicine; INH : isoniazide; EMB : éthambutol; PZA : pyrazinamide; SM : streptomycine; FQ : fluoroquinolones; LNZ : linézolide; BDQ : bédaquiline; CFZ : clofazimine; TZD : térizidone; CYS : cyclosérine; DLM : délamanide; PTM : prétomanide; KAN : kanamycine; AMK : amikacine; CAP : capréomycine; ETH : éthionamide.

2.7. Diagnostic de la résistance aux antituberculeux

Les tests de sensibilité aux antituberculeux ont trois objectifs principaux : (i) guider le traitement d'un patient, (ii) détecter l'apparition d'une résistance pour un patient qui n'a pas montré de réponse satisfaisante au traitement, et (iii) surveiller l'émergence de la résistance. La première méthode standardisée pour le diagnostic de la résistance était la méthode des proportions. Des méthodes phénotypiques plus simples et/ou automatisées ont ensuite été développées, suivies de méthodes génotypiques qui ont permis de réduire le délai d'obtention des résultats grâce à l'essor de la biologie moléculaire. Les principes, avantages et inconvénients de ces méthodes sont détaillés dans les chapitres suivants.

2.7.1. Méthodes phénotypiques

Les méthodes phénotypiques basées sur la culture sont actuellement la technique de référence pour la détection de la résistance aux antituberculeux. Ces méthodes, basées sur la culture, sont fiables et reproductibles, mais prennent du temps, nécessitent une infrastructure de laboratoire sophistiquée, un personnel qualifié et un contrôle qualité strict. Plusieurs méthodes phénotypiques existent aujourd'hui pour *Mtb*, certaines sont approuvées par l'OMS, l'ECDC ou le CLSI, d'autres non ^{223, 224,225,178,226}.

Le premier test phénotypique à avoir été développé et qui reste la méthode de référence pour la majorité des antituberculeux est la méthode des proportions, décrite il y a plus de 50 ans par Georges Canetti et Jacques Grosset ²²⁷. Cette technique a été mise au point afin d'identifier chez un patient, l'émergence des souches résistantes en cours de traitement lorsqu'une population bacillaire sensible et résistante coexistent. Elle consiste à mesurer la proportion de mutants résistants à un antibiotique au sein d'une population bacillaire pour une concentration d'antibiotique donnée, appelée concentration critique (CC). Si cette proportion est supérieure à la proportion critique définie chez une population sensible, on considère que la souche est résistante à l'antibiotique. Par simplicité, cette proportion critique a été fixée initialement à 1%. La proportion de mutants résistants à un antibiotique est calculée par le rapport entre le nombre de bactéries résistantes dénombrées sur milieu avec antibiotique et le nombre total de bactéries de l'inoculum dénombré sur un milieu sans antibiotique. Mise au point sur milieu LJ, cette méthode peut être appliquée sur d'autres milieux, solides ou liquides, nécessitant un ajustement des CC (**Tableau 5**).

2.7.1.1. Méthodes phénotypiques en milieu solide (LJ, Middlebrook 7H11 et 7H10)

Les tubes avec et sans antibiotique sont ensemencés à trois dilutions différentes (10^{-1} , 10^{-3} et 10^{-5} ou pur, 10^{-2} et 10^{-4}) pour permettre de dénombrer la population bacillaire totale et les mutants résistants. Cette technique classique de référence, est longue et non automatisée. En effet, la première lecture de l'antibiogramme se fait après 28 jours d'incubation et la lecture finale après 42 jours. Le grand nombre de tubes de cultures à préparer (au moins trois par antibiotiques compte-tenu des trois dilutions) la rend également très fastidieuse. En revanche, elle a l'intérêt de permettre une mesure précise de la proportion de mutants résistants. Contrairement aux autres bactéries d'intérêt médical, la méthode phénotypique repose sur le test d'une seule CC par antibiotique, utilisée pour différencier les isolats résistants des isolats sensibles de *Mtb* (**Tableau 5**).

2.7.1.2. Méthodes phénotypiques en milieux liquides (7H9, MGIT)

Les méthodes phénotypiques en milieu liquide ont été développées pour réduire le délai d'obtention du résultat et d'automatiser sa lecture (systèmes Bactec MGIT 960® et VersaTREK®), mais ce délai reste encore long (2 à 4 semaines)²²⁸⁻²³¹.

Il existe deux techniques pour réaliser un antibiogramme en milieu liquide : la méthode des proportions et la microdilution.

Pour la **méthode des proportions en milieu liquide** il n'est pas possible de dénombrer des colonies bactériennes, on utilise donc un inoculum 100 fois plus concentré dans les milieux avec antibiotique (une concentration correspond à la CC par antibiotique) par rapport au milieu sans. Si la croissance bacillaire est synchrone dans ces deux milieux, alors cela signifie qu'il y avait au moins 1% de mutants résistants²²⁵.

Communément, l'antibiogramme se fait en milieu MGIT avec le système Bactec MGIT 960® développé par Becton Dickinson (BD). La limite de cette technique, comme pour les antibiogrammes en milieu solide, est le nombre d'antibiotiques disponibles dans les coffrets commerciaux. Ils n'en proposent que cinq : l'isoniazide, la rifampicine, l'éthambutol, la streptomycine et le pyrazinamide. Il est possible d'évaluer la sensibilité aux autres antituberculeux avec le milieu MGIT selon le même principe, mais cela nécessite l'utilisation du logiciel EpiCenter équipé du module de TBeXiST (« Extended Individual Susceptibility

Testing ») conjointement avec le Bactec MGIT 960, ce qui est extrêmement fastidieux et chronophage du fait de l'absence de coffret commercial.

Récemment, le sous-comité pour les tests de sensibilité aux antimycobactériens (AMST) de l'EUCAST a proposé de définir une méthode de référence pour déterminer les CMI des antituberculeux, car compte tenu des nombreux protocoles qui sont utilisés dans le monde, un consensus est nécessaire définir des ECOFF (*Epidemiological Cut-Off Value*, valeur seuil de CMI permettant d'intégrer la distribution de CMI de 99% des souches sauvages = 99^{ème} percentile, **Figure 25**) et CC selon une méthodologie comparable à celle des autres bactéries d'intérêt médical. Cette méthodologie choisie est la **microdilution** en milieu 7H9 ; elle n'a pas, pour le moment, l'objectif d'être utilisée en routine pour la détermination de la sensibilité aux antibiotiques. Cette méthodologie a été récemment utilisée par le consortium international CRyPTIC (*Comprehensive Resistance Prediction for Tuberculosis: An International Consortium*), permettant de tester la sensibilité à 13 antituberculeux (plaque UKMYC6) de première (hormis le pyrazinamide, qui nécessite d'être testé en milieu acide) et de seconde ligne incluant notamment les molécules du groupe A (FQ, BDQ, linézolide), mais aussi la CFZ et le délamanide ²³². Ainsi, la sensibilité phénotypique aux antituberculeux de 20 637 isolats cliniques collectés par 14 laboratoires basés dans 11 pays (tous les continents représentés) a été étudiée.

2.7.1.3. Méthodes phénotypiques simples et rapides développées pour des pays à faibles ressources (fluorométriques et colométriques, milieux solides et liquides)

L'OMS a approuvé l'utilisation de trois d'entre elles uniquement pour l'isoniazide et la rifampicine et comme une solution provisoire en attendant que les infrastructures nécessaires à la réalisation de culture et de tests moléculaires soient mises en place : (i) l'observation microscopique de la croissance des mycobactéries du « complexe *tuberculosis* » sous forme de « cordes » (Microscopic Observation Drug Susceptibility [**MODS**]) en milieu liquide ²³³⁻²³⁶ ; (ii) des méthodes colorimétriques basées sur la réduction d'un indicateur coloré ajouté au milieu de culture liquide en plaque de microtitration contenant des concentrations croissantes d'antibiotique (« Colorimetric Redox Indicator (**CRI**) ») ²³⁷ ; et (iii) le « *nitrate reductase assay* » (**NRA**) réalisé en milieu solide et basé sur la détection rapide d'une croissance sur les milieux avec et sans antibiotique par l'ajout de réactif de Greiss après 10 jours d'incubation (*Mtb* possédant une nitrate réductase, une coloration rouge apparaît en cas de culture positive, la bactérie ayant réduit tout ou une partie du nitrate en nitrite) ²³⁸.

2.7.1.4. Limites des méthodes phénotypiques

Concernant la méthodologie, une difficulté réside dans le fait que plusieurs types de milieux sont employés (LJ, 7H11, MGIT, etc) avec des valeurs de CC différentes suivant les milieux (**Tableau 5**). L'établissement d'une méthode standardisée au niveau international est crucial pour fixer les valeurs d'ECOFF (**Figure 25**) et pour déterminer les valeurs de CC fiables afin d'être en mesure de réaliser des études de corrélation phénotype/génotype de qualité et de précision. Ainsi, l'étude publiée récemment par le consortium CRyPTIC réalisée à grande échelle a permis de proposer des valeurs d'ECOFF²³² pour les antituberculeux de première et de deuxième ligne, grâce à une étude génomique conjointe permettant de définir une population sauvage (c'est-à-dire ne présentant pas de mutation associées à la résistance pour l'antituberculeux donné) (**Figure 28**).

Bien que l'antibiogramme phénotypique demeure actuellement la méthode de référence pour la détermination de la sensibilité aux antituberculeux chez *Mtb*, il est néanmoins imparfait pour certaines molécules, telles que le pyrazinamide, l'éthionamide ou encore l'éthambutol^{239,240}. Comme déjà décrit en amont dans le manuscrit, l'antibiogramme phénotypique, avec la CC de 1 mg/L, ne permettait pas de détecter la résistance liée à certaines substitutions dans RpoB ; des recommandations ont été émises par l'OMS en 2021 pour abaisser cette concentration critique à 0.5 mg/L sur milieux 7H10 et MGIT (**Tableau 5**). Ainsi, le diagnostic génotypique est désormais proposé en référence pour la rifampicine et le pyrazinamide²⁴⁰.

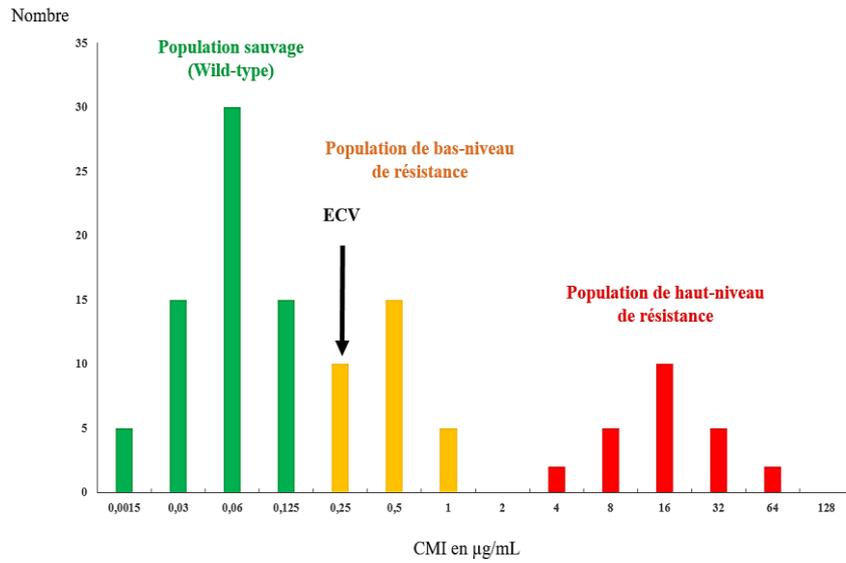


Figure 25- Distribution des CMI d'une population sauvage et de haut ou bas-niveau de résistance à un antibiotique.



Figure 26- Méthodes d'antibiogramme phénotypique pour tester la sensibilité aux antituberculeux de *Mtb*. En haut : antibiogramme solide par méthode des proportions (antituberculeux de seconde ligne, deux dilutions, milieux Löwenstein Jensen et 7H11), photographie personnelle, Laboratoire de Bactériologie, CNR des Mycobactéries. Au milieu, antibiogramme en milieu MGIT système Bactec MGIT 960® (photographie du Dr Morand, laboratoire de Bactériologie de Cochin).

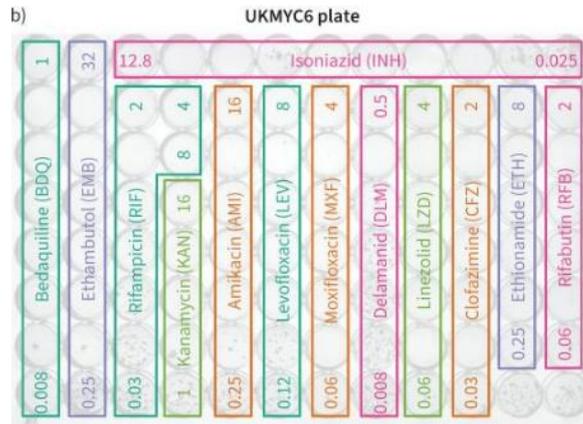


Figure 27- Schéma de la plaque 96 puits UKMYC6 désignée par le consortium international CRyPTIC. D'après ²³².

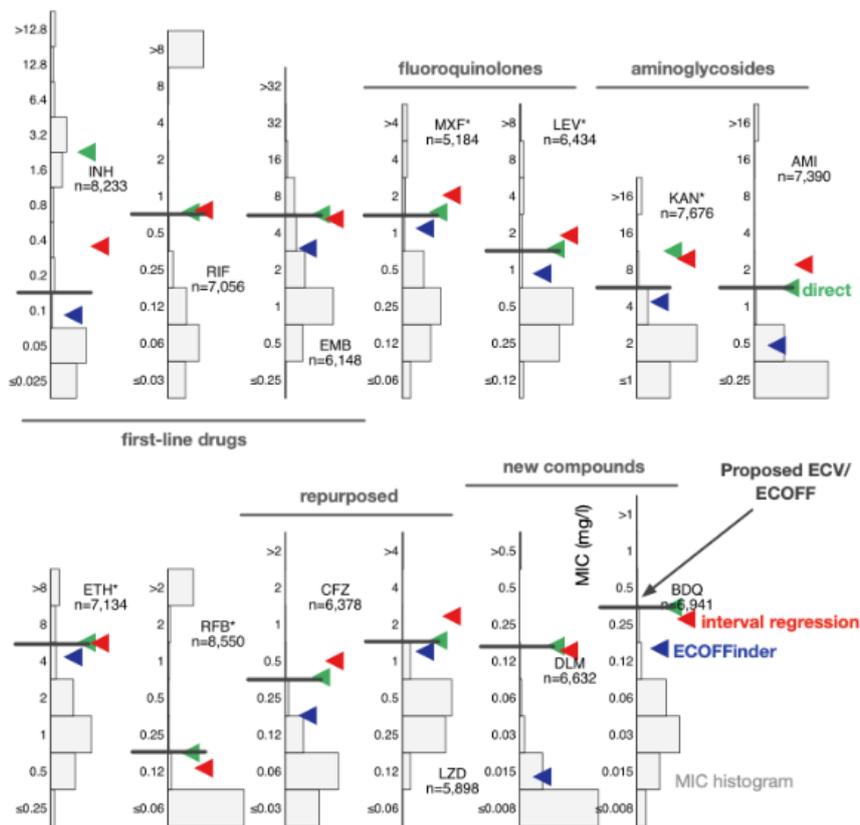


Figure 28- Mesure des ECOFFs basée sur la distribution des CMI des souches sauvages par méthode de microdilution en plaque UKMYC6 (consortium international CRyPTIC). D'après ²³².

Tableau 5- Concentrations critiques des antituberculeux définies par l'OMS selon le milieu de culture. D'après 225,178

	Concentration critique (mg/L)/Breakpoint clinique (le cas échéant)				Microdilution
	LJ	7H10	7H11	MGIT	
Isoniazide	0,2	0,2	0,2	0,1	1
Rifampicine	40	0,5 (1,0) ^b	1,0	0,5 (1,0) ^b	nd
Ethambutol	2,0	5,0	7,5	5,0	4,0
Pyrazinamide				100,0	
Streptomycine	4,0	2,0	2,0	1,0	nd
Ofloxacin^a	4,0	2,0	2,0	2,0	4,0
Levofloxacin	2,0	1,0		1,0	4,0
Moxifloxacin (CC)	1,0	0,5	0,5	0,25	nd
Moxifloxacin (CB)	nd	2,0 ^c	nd	1,0 ^c	nd
Gatifloxacin	0,5	nd	nd	0,25	nd
Bédaquiline	nd	nd	0,25	1,0	0,25
Linézolide	nd	1,0	1,0	1,0	2
Cyclosérine	40 ^d	nd	nd	nd	64
Clofazimine	nd	nd	nd	1,0	0,5
Délamanide	nd	nd	0,016	0,06	0,125
Ethionamide	40,0	5,0	10,0	5,0	4,0
Prothionamide	40,0	nd	nd	2,5	nd
Amikacine	30,0	2,0	nd	1,0	nd
Capréomycine	40,0	4,0	nd	2,5	nd
Kanamycine	40,0	4,0	nd	2,5	8,0

a. Il n'est plus recommandé de tester l'ofloxacin au profit des FQ utilisées dans le schéma thérapeutique (lévofloxacin et moxifloxacin).

b. Nouvelles concentrations critiques définies en 2021¹⁷⁸. Les anciennes sont indiquées entre parenthèse.

c. Breakpoints cliniques définis pour une forte dose de moxifloxacin (800 mg /j).

d. La concentration critique de la cyclosérine en milieu LJ a été suspendue en raison d'un niveau de preuve insuffisant.

2.7.2. Méthodes génotypiques

Les difficultés de réalisation et le délai important d'obtention de l'antibiogramme par méthode phénotypique contribuent à limiter la mise au traitement rapide et optimisée des patients. Ainsi, sur 1,5 millions de cas incidents de TB MDR/RR survenues entre 2018 et 2022, moins de la moitié ont été traités (n=649 000, soit 43%)²⁴¹. Les méthodes génotypiques, de par leur délai d'obtention plus court, contribuent à améliorer la prise en charge des patients.

La détection génotypique de la résistance aux antituberculeux fait aujourd'hui appel à des techniques très variées, de par leur méthodologie de détection des mutations impliquées dans la résistance, leur spectre de détection de la résistance, mais aussi leur coût, et leur complexité de mise en œuvre (**Tableau 6**). Parmi celles-ci, on peut distinguer les **techniques dites « conventionnelles »**, telles que la PCR en temps réel et les LPA (Line Probe Assays), qui ciblent des mutations/régions données, et les **techniques basées sur le NGS**. Les principes, délai d'obtention des résultats, performances de détection de la résistance par antituberculeux, avantages et inconvénients des méthodes existantes sont détaillés dans les chapitres suivants et résumés dans le **Tableau 6** et la **Figure 29**.

2.7.2.1. Principes et écueils communs aux méthodes génotypiques

Le **principe** du diagnostic génotypique est de mettre en évidence des altérations chromosomiques (mutation ponctuelle = SNV, InDels) dans des gènes impliqués dans la résistance aux antibiotiques.

Il nécessite donc une **étape d'inactivation** (cruciale du fait du caractère hautement pathogène de *Mtb*), **une étape d'extraction l'ADN** et de **connaitre les gènes impliqués dans les mécanismes de résistance et l'impact des altérations chromosomiques observées dans les souches cliniques sur la résistance**.

L'interprétation des altérations chromosomiques n'est pas aisée. En effet, la mise en évidence d'une mutation dans un gène répertorié comme associé à la résistance à un antituberculeux donné n'est pas forcément synonyme de résistance, cette mutation pouvant correspondre à (i) une mutation connue comme étant associée à la résistance (RAV, *resistance-associated variant*), mais aussi à (ii) un SNP de lignée (« polymorphisme de lignée ») engendré par la dérive génétique naturelle de *Mtb*²⁴², (iii) une mutation silencieuse, (iv) une mutation compensatoire, qui est sans impact sur la sensibilité à l'antituberculeux donné, et enfin (v), une

mutation rare dont l'impact sur la sensibilité à l'antituberculeux n'a pas pu être déterminé (NSUV, *non-synonymous uncharacterized variant*).

Les techniques commerciales conventionnelles ciblent les mutations les plus fréquemment associées à la résistance, aussi **le problème de l'interprétation des NSUV va surtout se poser pour les techniques basées sur le NGS**. Pour aider à l'interprétation, plusieurs databases listant les mutations et leur impact sur la résistance existent (PhyResSE ²⁴³, Walker ²³⁹, TB-profiler ²⁴⁴, ReSeqTB ²⁴⁵), l'OMS ayant aussi publié un catalogue des mutations en 2021 ²⁰⁶. Cependant, il persiste beaucoup d'incertitudes, notamment pour les mutations trop rares pour pouvoir déterminer si leur association à la résistance est significative, ou pour les molécules les plus récentes comme le linézolide, la BDQ, le délamanide et le prétomanide, pour lesquelles le manque de données phénotypiques limitent l'interprétation de l'impact des mutations.

L'**hétérorésistance** (§ 2.5.2 **Hétérorésistance**) va également poser des problèmes de détection, avec des performances très variables selon les tests. Dans ce cadre, l'existence de mutations compensatoires ou jouant un rôle dans l'épistasie ajoute un niveau supplémentaire de complexité dans l'interprétation des résultats des méthodes basées sur le NGS.

Par ailleurs, pour pouvoir utiliser au mieux les résultats obtenus avec les méthodes génotypiques pour le traitement personnalisé des patients, il convient d'être capable de déterminer le **niveau de résistance aux antituberculeux** quand un RAV ou NSUV est détecté. En effet, il a été montré des niveaux de résistance variables pour la rifampicine, l'isoniazide et les FQ ^{246,247,248}.

Ces techniques ont été développées pour faire le diagnostic à partir de la culture, mais des efforts sont faits pour les rendre utilisables directement **à partir d'échantillons biologiques**, afin de diminuer encore le délai d'obtention du diagnostic de la résistance.

2.7.2.2. *Techniques génotypiques « conventionnelles »*

Les techniques « conventionnelles » n'étudient que les gènes ou parties du gène impliqués dans la résistance aux antituberculeux. Ces techniques comprennent dans l'ordre chronologique d'apparition : (i) la **PCR** « maison » suivie du séquençage Sanger ; puis de tests qui permettent la détection couplée de MTBC et de la résistance à un ou plusieurs antituberculeux, (ii) les **NAATs** qui sont les plus employés car basés sur une technique de **PCR en temps réel** complètement intégrée, et pouvant être implantés facilement au lit du malade (POC, « *Point of Care* »), (iii) les **LPA** qui consistent à réaliser une PCR suivie d'une

hybridation sur bandelette ce qui nécessite un plateau de biologie moléculaire et un personnel expérimenté.

La plupart de ces techniques ne permettent le **dépistage simultané de la résistance qu'à un faible nombre d'antituberculeux**, parmi lesquels sont absents deux des antituberculeux du groupe A (linézolide et BDQ), du groupe B (CFZ et cyclosérine), et les « nouveaux antituberculeux » (délamanide, prétomanide) (**Tableau 6, Figure 29**)²⁴⁹.

Le test commercialisé (Xpert MTB/RIF) s'est concentré sur la détection de la résistance à la rifampicine, considérée comme un bon marqueur de la TB MDR²⁵⁰, bien que la mono-résistance à la rifampicine représente 20% des cas de TB résistantes à la rifampicine au niveau mondial⁶² et plus encore chez les sujets infectés par le VIH²⁵¹. Or, il a été montré qu'il était plus pertinent de dépister également la résistance à l'isoniazide, en particulier dans les pays où la prévalence de la résistance à l'isoniazide est élevée²⁵² car la mono-résistante à l'isoniazide est (i) plus élevée que la MDR dans la plupart des pays^{253, 254} et (ii) associée à sur risque d'acquisition de résistance à la rifampicine, et donc d'évolution vers la multirésistance^{255, 256}. Il a d'ailleurs été montré que la détection précoce de la résistance à l'isoniazide permettait d'optimiser le schéma thérapeutique et d'améliorer l'issue de traitement des TB mono-résistantes à l'isoniazide^{254, 257}. C'est pourquoi, le Haut Conseil de santé Publique recommande le dépistage de la résistance à la rifampicine et à l'isoniazide dans les 72 h suivant un diagnostic de TB²⁵⁸. Le test commercialisé le plus utilisé pour le dépistage de la MDR (résistance à la rifampicine et à l'isoniazide) est le test LPA Genotype MTBDR*plus*® (Hain Lifescience).

Une seconde génération de tests (NAAT et LPA) a été développée pour permettre le diagnostic de l'ultrarésistance « ancienne définition » (Xpert MTB/XDR® et MTBDRsl). Ils permettent la détection couplée de MTBC, et de la résistance aux FQ et aux aminosides, couplée à la résistance à l'isoniazide/éthionamide et/ou à l'éthambutol²⁵⁹. Compte tenu du quasi abandon des antibiotiques injectables dans le traitement des TB MDR, on peut se questionner sur la pertinence actuelle d'une partie du panel de ces tests⁹⁰.

Les **performances** de ces tests sont détaillées **Tableau 6**, mais ce qui est intéressant de souligner c'est l'évolution des performances des test Xpert (MTB/RIF®, MTB/RIF ultra® et MTB/XDR®), implémentés aujourd'hui dans plus de 100 pays⁷⁸, et des LPA (Genotype MTBDR*s*/® V1 et V2) pour la détection de la résistance à la rifampicine, l'isoniazide et aux FQ.

Une méta-analyse a montré que les performances de détection de la résistance à la rifampicine étaient relativement similaires, contrairement à ce qui a été observé pour la détection de MTBC (**Tableau 6**), avec une différence de précision de **Xpert Ultra**[®] moins Xpert MTB/RIF[®] qui a été estimée à -0,3 % (-6,9 à 5,7) pour la sensibilité et à 0,3 % (-1,2 à 2,0) pour la spécificité. Cependant, il est à noter un nombre plus élevé de résultats indéterminés pour la résistance à la rifampicine avec Xpert Ultra[®] (proportion combinée de 7,6 % (2,4 à 21,0) *versus* 0,8 % (0,2 à 2,4) avec Xpert MTB/RIF[®] ⁷⁶).

Le test **Xpert MTB/XDR**[®] a des performances de détection de la résistance à l'isoniazide bien meilleure que les LPA, avoisinant celle des techniques basées sur le NGS (sensibilité de 94%, 89% et 98%, respectivement) ^{259, 78} (**Tableau 6**). Cette sensibilité accrue du test MTB/XDR[®] par rapport au test MTBDRplus est liée à l'ajout de cibles moléculaires supplémentaires (KatG 311-315, promoteur de *fabG-inhA*, *ahpC* (-5 à -50) et FabG1 199-210).

La **seconde version du test Genotype MTBDRsI**[®] a de meilleures performances de détection de la résistance aux FQ que la première version (sensibilité de 95% pour la V2 *versus* 90% pour la V1) ²⁶⁰.

En plus des **limites** déjà évoquées plus haut et dans le chapitre **2.7.2.1 Principes et écueils communs aux méthodes génotypiques**, il faut noter que ces tests peuvent être difficiles à interpréter.

Pour les NAAT, la résistance est le plus souvent diagnostiquée sur la différence entre les températures de fusion tandis que pour les LPA, la résistance est diagnostiquée sur l'extinction de la bande sauvage (« WT »), associée ou pas à une bande « MUT » en cas de mutation fréquente. Cela est applicable pour toutes les LPA hormis le test Nipro Genoscholar PZA-TB II[®] ; en effet, les mutations entraînant la résistance au pyrazinamide pouvant survenir tout au long du gène *pncA*, ce test explore donc une portion de 700 bp couvrant la totalité de ce gène ainsi que sa région promotrice ; on comprend que des bandes « MUT » spécifiques d'une mutation donnée ne pouvaient pas être intégrées, ainsi la détection de mutations se fait uniquement par extinction d'une bande WT, ce qui peut aussi correspondre à une mutation n'entraînant pas de résistance (augmentation de la sensibilité au détriment de la spécificité). Il convient donc d'être vigilant dans l'interprétation de ces tests pour éviter les diagnostics erronés de résistance qui pourraient priver les patients de molécules clés dans le traitement comme cela a déjà été décrit ²⁶¹. Seule une vérification de la nature de la mutation présente par séquençage permet d'éviter ces écueils.

Le dépistage de l'hétérorésistance est difficile d'interprétation avec les LPA où une double population WT et mutée peut être observée. L'un des avantages majeurs de ces techniques est leur seuil théorique de détection de la résistance plus bas que les NAAT, égal à la méthode phénotypique des proportions pour la mutation RpoB S450L et juste au seuil supérieur de la microhétérorésistance (5%) pour la détection de la résistance aux FQ par la bandelette MTBDR_{sl} VER 2.0®¹²⁹.

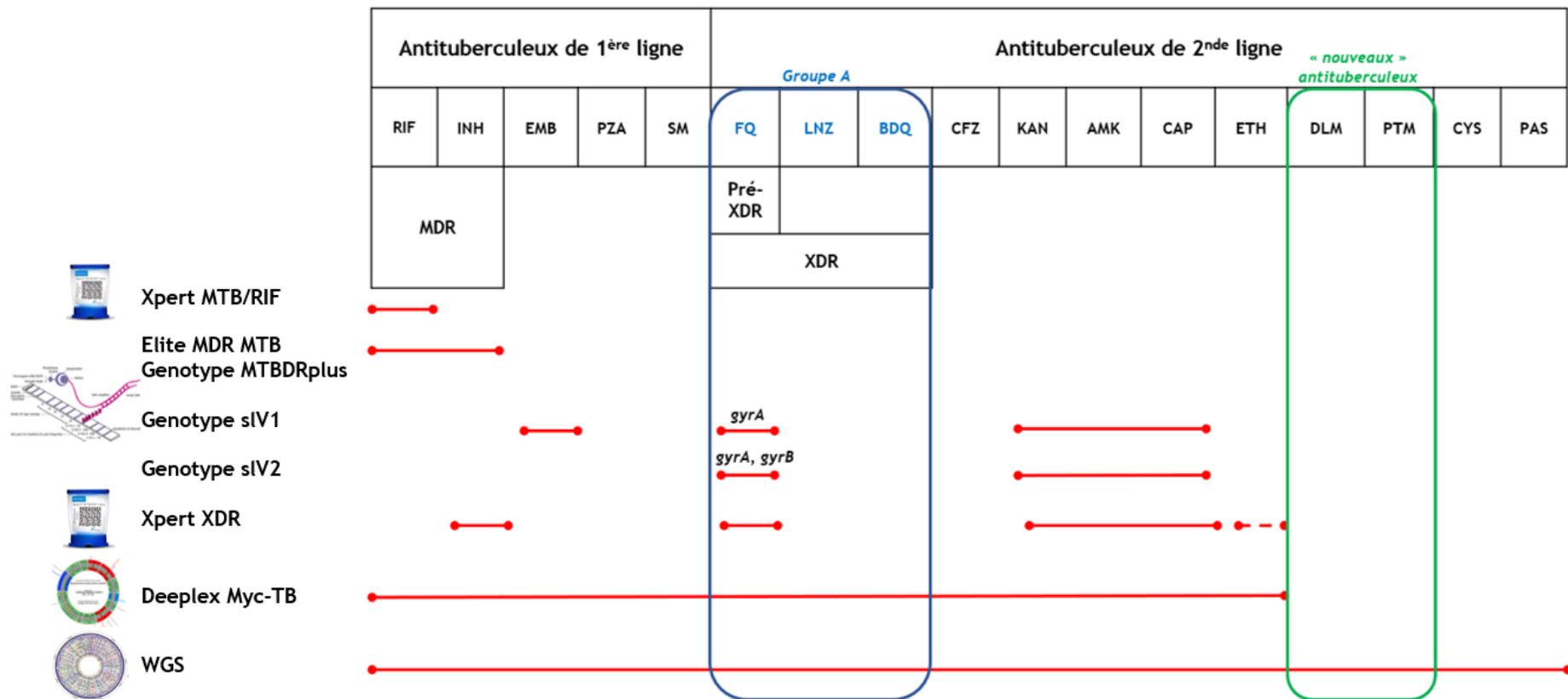


Figure 29- Spectre de détection de la résistance des principales techniques génotypiques utilisées actuellement pour le diagnostic de la résistance aux antituberculeux de première et de seconde ligne.

RIF: rifampicine; INH : isoniazide; EMB : éthambutol; PZA : pyrazinamide; SM : streptomycine; FQ : fluoroquinolones; LNZ : linézolide; BDQ : bédaquiline; CFZ : clofazimine; TZD : térizidone; CYS : cyclosérine; DLM : délamanide; PTM : prétomanide; KAN : kanamycine; AMK : amikacine; CAP : capréomycine; ETH : éthionamide.

Tableau 6- Principaux tests actuellement disponibles pour l'antibiogramme génotypique (gDST) de *Mtb* : méthodologie, délai de rendu des résultats, avantages et inconvénients, cibles moléculaires et performances de détection de l'hétérorésistance et de la résistance et par antituberculeux. Les tests recommandés par l'OMS sont soulignés.

Catégorie de test		NAATs				LPA				Basées sur le NGS			
Nom du test	Xpert			<u>BD max</u> <u>MDR TB</u> [®]	<u>Truenat</u> <u>MTB-</u> <u>Rif Dx</u> [®]	Elite MGB [®]	<u>GenoType</u> <u>MTBDRplus</u> <u>v. 2.0</u> [®]	<u>Nipro</u> <u>NTM+MDRT</u> <u>B</u> [®]	<u>GenoType</u> <u>MTBDRs/ VER</u> <u>2.0</u> [®]	<u>Nipro</u> <u>Genosc</u> <u>holar</u> <u>PZA-</u> <u>TB II</u> [®]	Deeplex Myc-TB [®]	WGS	
	<u>MTB/RIF</u> [®]	<u>MTB/RIF</u> <u>Ultra</u> [®]	<u>MTB/</u> <u>XDR</u> [®]										
Technique		RT-PCR				PCR + hybridation sur bandelette				amplicons NGS	génomome complet		
Méthode de détection de la résistance		Absence hybridation sondes WT	Décalage des Tm		Absence hybridation sondes WT	Décalage des Tm		Absence hybridation sonde WT et/ou hybridation sonde spécifique d'une mutation		Absence hybridation sonde WT	Identification spécifique des mutations par séquençage		
Matrice *		P/C			P			LPA C**				P***/C	C
Délai technique moyen		2h			3-4h			<u>GenoType MTBDRplus v. 2.0</u> [®] 24-48h				7-10j ²⁶²	10j ²⁶³
Seuils de détection de l'hétéroR		65% ²⁶⁴ , ²⁶⁵ RpoB S450L : 20-40% D435V, H445D, et H445Y : 40-80% ²⁶⁶	RpoB S450L: 5-10% autres mutations <i>rpoB</i> : 20-40% ²⁶⁷	<i>katG</i> , <i>fabG</i> et <i>inhA</i> : 20% <i>ahpC</i> : 75% <i>gyrA</i> : 25% <i>gyrB</i> , <i>rrs</i> , <i>eis</i> : 60% ²⁶⁸	Pas de données			1-10% ²⁶⁹ , ²⁷⁰ , ²⁶⁶ RpoB S450L : 1% D435V, H445D, et H445Y : 5-10% ²⁶⁶	5% ¹²⁹	Pas de données	3% (1)	Variable selon pipeline d'analyse et technique de séquençage utilisée Plupart des pipelines : seuil de 75%	
Avantages		Plateau de BM non requis Technique simple ne nécessitant pas d'expertise technique en BM Rapidité				Identification des mutations les plus fréquentes Détection de l'hétéroR Réalisation possible sur P avec EM positif				Diagnostic génotypique étendu de la R Détection des variants minoritaires Pas de compétences en bio-informatique requises Réalizable directement sur P EM positif		Exhaustivité : ensemble des informations en un seul test	
Limites/inconvénients		Contamination inter-échantillons Nécessité de maintenance de l'automate				Plateau de BM requis Expertise technique nécessaire Petites séries				Plateau de NGS requis Coût Évaluation de l'impact des NSUV		Manque de standardisation Nécessité de compétences en bio-informatique Non réalisable sur P en routine	
Anti-TB	Type de R	Cibles moléculaires/gènes candidats pour WGS^b											
		Performances de détection de la R par anti-TB : Se (IC 95%), Sp (IC 95%)^b											

				MTB/RIF®	MTB/RIF Ultra®	MTB/XDR®	BD max MDR TB®	Truenat MTB-Rif Dx®	Elite MGB®	GenoType MTBDRplus v. 2.0®	Nipro NTM+MDRT B®	GenoType MTBDRsl VER 2.0®	Nipro Genoscholar PZA-TB II®	Deeplex Myc-TB®	WGS
1 ^{ère} ligne	RIF	MDR	Pre-XDR	XDR	<i>rpoB</i> RRDR		<i>rpoB</i> RRDR					<i>rpoB</i> (cd. 158-336 et 384-517)		<i>rpoB</i>	
					Se: 0,96 (0,94-0,97) Sp: 0,98 (0,98-0,99) ⁷⁸ Se : 0,95 (0,90-0,98) Sp : 0,99 (0,97-1) ⁷⁶	Se: 0,94 (0,87-0,97) Sp: 0,99 (0,98-1) ⁷⁸ Se : 0,95 (0,89-0,98) Sp : 0,99 (0,98-1) ⁷⁶	-	Se: 0,97 (0,93-0,98) Sp: 0,99 (0,97-0,99) ⁷⁸	Se: 0,84 (0,72-0,92) Sp: 0,97 (0,95-0,99) ⁷⁸	Se : 0,86 (0,42-1) Sp: 0,97 (0,8-1) ⁷⁹ Se: 1 (0,29-1) Sp: 0,96 (0,77-1) ⁸⁰	Se: 0,96 (0,95-0,97) Sp: 0,98 (0,97-0,99) ⁷⁸	-	Se : 0,98 (0,94-0,99) Sp : 0,99 (0,97-0,98) ²⁷¹	Se : 0,97 (0,97-0,98) ^d Sp : 0,98 (0,98-0,99) ^d Se : 0,94 ^e ; Sp : 0,93 ^e 272 Se : 0,97 (0,94-0,99) ^d Sp : 0,99 (0,99-1) ^{d,e} Se : 0,97 (0,94-0,99) ^e 239 Se : 1 ; Sp : 0,94 ²⁷³ Se : 0,99 (0,99-1) Sp : 0,64 (0,61-0,67) ²⁷⁴	
					<i>katG</i> cd. 311-315 <i>inhA</i> prom (-1 à -32) <i>ahpC</i> (-5 à -50) <i>fabG1</i> cd. 199-210		<i>katG</i> cd. 315 <i>inhA</i> prom.	<i>katG</i> cd. 315 <i>inhA</i> prom.		<i>katG</i> cd. 315 <i>inhA</i> prom.		<i>katG</i> (cd.85-324).; <i>ahpC</i> (-163 à cd. 131); <i>inhA</i> (cd. 29-227 et prom.) <i>fabG</i> (-119 à cd. 106)		<i>inhA</i> , <i>katG</i> , <i>ahpC</i> , <i>fabG</i>	
-	Se : 0,94 (0,88-0,97) Sp : 0,98 (0,93-1) ²⁵⁹ Se : 0,98 (0,96-0,99) Sp : 0,95 (0,73-1) ²⁶⁸	Se : 0,58 (0,29-0,83) Sp : 0,99 (0,96-1) ²⁷⁵	-	Se : 1 (0,48-1) Sp: 0,97 (0,8-1) ⁷⁹ Se : 0,75 (0,43-0,94) Sp: 1 (0,75-1) ⁸⁰	Se: 0,89 (0,86-0,92) Sp: 0,98 (0,97-0,99) ⁷⁸	-	Se : 0,98 (0,94-0,99) Sp : 0,99 (0,97-0,98) (4)	Se : 0,97 (0,96-0,98) ^d Sp : 0,99 (0,98-0,99) ^d Se : 0,93 ^e ; Sp : 0,94 ^e 272 Se : 0,94 (0,91-0,96) ^d Sp : 0,98 (0,97-0,99) ^d Se : 0,85 (0,81-0,89) ^e Sp : 0,98 (0,97-0,99) ^e 239 Se : 0,94 ; Sp : 0,97 ²⁷³ Se : 0,99 (0,98-0,99) Sp : 0,97 (0,95-0,98) ²⁷⁴							
	EMB													<i>embB</i> (cd. 288 à 518)	<i>embABC</i> , <i>embR</i> , <i>ubiA</i>
														Se : 0,88 (0,81-0,93) Sp : 0,91 (0,88-0,94) ²⁷¹	Se : 0,94 (0,93-0,96) ^d Sp : 0,94 (0,93-0,94) ^d Se : 0,86 ^e ; Sp : 0,84 ^e 272 Se : 0,95 (0,91-0,98) ^d Sp : 0,94 (0,93-0,95) ^d Se : 0,82 (0,76-0,87) ^e Sp : 0,95 (0,94-0,96) ^e 239 Se : 0,90 ; Sp : 0,94 ²⁷³ Se : 1 (1) Sp : 0,40 (0,37-0,43) ²⁷⁴

			<u>MTB/RIF</u> [®]	<u>MTB/RIF Ultra</u> [®]	<u>MTB/XDR</u> [®]	<u>BD max MDR TB</u> [®]	<u>Truenat MTB-Rif Dx</u> [®]	<u>Elite MGB</u> [®]	<u>GenoType MTBDRplus v. 2.0</u> [®]	<u>Nipro NTM+M DRTB</u> [®]	<u>GenoType MTBDRs/ VER 2.0</u> [®]	<u>Nipro Genosc holar PZA-TB II</u> [®]	<u>Deeplex Myc-TB</u> [®]	<u>WGS</u>
PZA												<i>pncA</i> (-18)	<i>pncA</i> (-60)	<i>pncA, panD, clpCI, rpsA</i>
												Se : 0,81 (0,75-0,86) Sp : 0,98 (0,97-0,99) ⁷⁸	Se : 0,79 (0,67-0,88) Sp : 1 (0,98-1) ²⁷¹	Se : 0,91 (0,89-0,93) ^d Sp : 0,97 (0,96-0,97) ^d Se : 0,76 ^e ; Sp : 0,92 ^e ²⁷² Se : 0,57 (0,45-0,69) ^d Sp : 1 (0,99-1) ^d Se : 0,24 (0,18-0,31) ^e Sp : 1 (0,95-1) ^e ²³⁹ Se : 0,81 ; Sp : 0,89 ²⁷³ Se : 0,88 (0,86-0,90) Sp : 0,84 (0,81-0,86) ²⁷⁴
STR													<i>rrs</i> (3-679; 716-1572); <i>rpsL</i> (-24); <i>gidB</i> (cd. 6 à +118)	<i>rrs, rpsL, gid, rrs, eis, whib7</i>
													Se : 0,54 (0,44-0,64) Sp : 0,99 (0,96-1) ²⁷¹	Se : 0,95 (0,92-0,97) ^d Sp : 0,99 (0,98-0,95) ^d Se : 0,82 (0,76-0,87) ^e Sp : 0,95 (0,94-0,96) ^e ²³⁹ Se : 0,68 ; Sp : 0,92 ²⁷³

				<u>MTB/RI</u> <u>F</u> [®]	<u>MTB/RI</u> <u>F Ultra</u> [®]	<u>MTB/</u> <u>XDR</u> [®]	<u>BD max</u> <u>MDR TB</u> [®]	<u>Truenat</u> <u>MTB-Rif</u> <u>Dx</u> [®]	<u>Elite</u> <u>MGB</u> [®]	<u>GenoType</u> <u>MTBDRp/</u> <u>us v. 2.0</u> [®]	<u>Nipro</u> <u>NTM+MD</u> <u>RTB</u> [®]	<u>GenoType</u> <u>MTBDRs/ VER</u> <u>2.0</u> [®]	<u>Nipro</u> <u>Genosc</u> <u>holar</u> <u>PZA-</u> <u>TB II</u> [®]	<u>Deeplex Myc-TB</u> [®]	<u>WGS</u>
Groupe A	FQ					gyrA QRDR gyrB QRDR						gyrA (cd. 85-97) gyrB (cd. 497-502)		gyrA (cd. 26-151) gyrB (cd. 353-568)	<u>gvrA, gvrB</u>
						Se : 0,93 (0,88-0,96) Sp : 0,98 (0,91-1) ²⁵⁹ Se : 0,91 (0,79-0,99) Sp : 0,99 (0,96-1) ²⁶⁸						Se: 0.95 (0.87-0.98) Sp: 0.98 (0.90-0.99) ²⁶⁰		Se : 0,86 (Basées sur le NGS 0,65-0,95) Sp : 1 (0,98-1) ²⁷¹	<u>LVX</u> Se : 0,71; Sp : 0,97 ²⁷⁶ Se : 0,95 (0,93-0,98) Sp : 0,97 (0,97-0,98) ²⁷⁴ <u>MXF</u> Se : 0,80 ; Sp : 0,90 ²⁷³ Se : 0,88; Sp : 0,97 ²⁷⁶ Se : 0,89 (0,87-0,90) Sp : 0,97 (0,97-0,98) ²⁷⁴
	BDQ													<u>Rv0678</u> (-14)	<u>Rv0678, atpE, pepQ, Rv1979c</u>
	LNZ													Pas de données	Pas de données
Groupe B	CFZ													<u>Rv0678</u> (-14)	<u>Rv0678, pepQ, Rv1979c</u>
														Pas de données	Pas de données
Groupe C	CYS/TZD													<i>rplC</i> (cd..100 à +21). <i>rrl</i> (2266-2968)	<u>atr, ddlA, cycA</u>
														Se : non évaluable Sp : 1 (0,85-1) ²⁷¹	Pas de données
Groupe C	DLM														<u>fgdI, fbiABCD, ddn</u>
															Pas de données
Groupe C	AMK					<i>rrs</i> 1400 region						<i>rrs</i> 1401, 1402, 1484, <i>eis</i> prom.		<i>rrs</i> (3-679 et 716-1572) ; <i>eis</i> (- 196 à cd. 54)	<u>rrs, eis, whib7</u>
						Se : 0,86 (0,75-0,92) Sp : 0,99 (0,93-1) ²⁵⁹ Se : 0,91 (0,69-0,98) Sp : 0,99 (0,97-1) ²⁶⁸						Se: 0.91 (0.80-0.97) Sp: 1 (0.96-1) ²⁶⁰	Se : 1 (0,70-1) Sp : 1 (0,98-1) ²⁷¹	Se : 0,91 (0,81-0,97) ^d Sp : 0,99 (0,98-1) ^d Se : 0,88 (0,77-0,95) ^e Sp : 1 (0,99-1) ^{e 239} Se : 0,67 ; Sp : 0,97 ²⁷³ Se : 0,97 (0,96-0,98) Sp : 0,99 (0,98-0,99) ²⁷⁴	

	ETH/ PTH	-	<i>inhA</i> prom. <i>fabG1</i> cd. 203	-	<i>inhA</i> prom.	-	<i>inhA</i> (cd. 29-227, prom.) <i>fabG</i> (-119 à cd. 106); <u><i>ethA</i></u> (-9)	<u><i>inhA</i>, <i>fabG</i>, <i>ethA</i>, <i>ethR</i>, <i>mshA</i></u>
			Se : 0,98 (0,74-1) Sp : 1 (0,83-1) ²⁵⁹ Se : 0,65 (0,57-0,73) Sp : 0,97 (0,92-0,99) ²⁶⁸		Pas de données		Se : 0,73 (0,64-0,86) Sp : 0,97 (0,93-0,99) ²⁷¹	Se : 0,75 ; Sp : 0,93 ²⁷³ Se : 100; Sp : 0,98 ²⁷⁶
	PAS							<u><i>folC</i>, <i>thvA</i>, <i>ribD</i>, <i>dfrA</i></u>
								Se : 33.3; Sp : 0,98 ²⁷⁶
Non classé	PTM							<u><i>fgdL</i>, <i>fbtABCD</i>, <i>ddn</i></u>
								Pas de données
Plus recommandés	KAN	-	<i>rrs</i> 1400 region; <i>eis</i> prom.		<i>rrs</i> 1401, 1402,1484; <i>eis</i> prom.	-	<i>rrs</i> (3-679 et 716-1572) ; <i>eis</i> (- 196 à cd. 54)	<u><i>rrs</i>, <i>eis</i>, <i>whib7</i></u>
			Se : 0,98 (0,93-1) Sp : 0,97 (0,93-0,99) ²⁶⁸		Se: 0.91 (0.82-0.95) Sp: 0.94 (0.85-0.98) ²⁶⁰		Se : 0,75 (0,30-0,95) Sp : 1 (0,44-1) ²⁷¹	Se : 0 83 ; Sp : 0,98 ²⁷³ Se : 1; Sp : 0,98 ²⁷⁶ Se : 0,96 (0,95-0,98+7) Sp : 0,95 (0,94-0,96) ²⁷⁴
	CAP	-	<i>rrs</i> 1400 region		<i>rrs</i> 1401, 1402, 1484	-	<i>rrs</i> (3-679 et 716-1572) <u><i>tlyA</i></u> (-129)	<u><i>rrs</i>, <i>tlyA</i></u>
			Se : 0,70 (0,46-0,87) Sp : 1 (0,98-1) ²⁶⁸		Se: 0.83 (0.71-0.91) Sp: 1 (0.95-1) ²⁶⁰		Se : 0,75 (0,30-0,95) Sp : 1 (0,57-1) ²⁷¹	Se : 0,75 ; Sp : 0,94 ²⁷³ Se : 0,93 (0,90-0,96) Sp : 0,98 (0,98-0,99) ²⁷⁴

*Recommandations fournisseur pour techniques commerciales

** Utilisation possible sur prélèvement avec EM positif (hors recommandations fournisseur)

*** Possible uniquement sur prélèvement avec EM positif²⁶²

- Les gènes étudiés dans leur intégralité (région promotrice incluse) sont en gras et soulignés le cas échéant.
- Liste non exhaustive
- Performances comparativement à la méthode de référence qu'est l'antibiogramme phénotypique. Les valeurs prédictives et négatives étant dépendantes de la prévalence de la résistance dans la population étudiée, le choix a été fait de ne présenter ici que les valeurs de Se et de Sp. Pour le WGS, l'interprétation des valeurs de sensibilité et de sensibilité doit être prudente, car très dépendantes des pipelines utilisés, des critères de filtration des variants, du niveau de détection de l'hétérorésistance, et de la liste de gènes candidats étudiés, qui sont variables suivant les études.
- NSUV exclus
- NSUV inclus

Anti-TB : antituberculeux ; BM : biologie moléculaire ; C : culture ; cd. : codon ; EM : examen microscopique ; LPA : Line Probe Assay ; NAATs : *Nucleic Acid Amplification Tests* ; NGS : *Next Generation Sequencing* (séquençage haut débit) ; NSUV : Non-synonymous uncharacterized variants ; R : résistance ; P : prélèvement ; QRDR : Quinolone Resistance Determining Region ; R : résistance ; RRDR : Rifampicin Resistance Determining Region ; RT PCR : Real Time PCR ; Se : sensibilité ; Sp : spécificité ; TB : tuberculose ; Tm : *melting temperature*, température de fusion ; WGS : *Whole Genome Sequencing* (séquençage du génome complet) ; WT : sauvage. RIF: rifampicine; INH : isoniazide; EMB : éthambutol; PZA : pyrazinamide; SM : streptomycine; FQ : fluoroquinolones; LNZ : linézolide; BDQ : bédaquiline; CFZ : clofazimine; TZD : térizidone; CYS : cyclosérine; DLM : délamanide; PTM : prétomanide; KAN : kanamycine; AMK : amikacine; CAP : capréomycine; ETH : éthionamide.

2.7.2.3. Méthodes basées sur le NGS

2.7.2.3.1. Historique et principes du séquençage génomique appliqué à l'étude de *Mtb*

A partir des années 2000, le développement de méthodes de séquençage dites de nouvelle génération et à haut débit (NGS), a permis de réduire considérablement les coûts du séquençage et a rendu accessible en pratique courante le séquençage des génomes bactériens (WGS). Le séquençage NGS génère une grande quantité de données, ce qui pose le problème du maniement de ces *big data* et de leur stockage.

Chez *Mtb*, l'utilisation du NGS présente plusieurs applications : détection de RAV, clustering, phylogénie, étude des déterminants associés à la virulence... Les grandes étapes sont l'extraction de l'ADN génomique, le séquençage, l'analyse bio-informatique et l'interprétation des données. Des particularités inhérentes à *Mtb* compliquent chacune de ces étapes (**Figure 30**). En effet, le séquençage de *Mtb* doit intégrer des contraintes particulières liées aux milieux de cultures spéciaux, manipulation nécessitant une expertise, bactéries à croissance lente, travail en laboratoire aux normes de sécurité biologique renforcées (niveau L3). De plus, du fait de leur paroi composée d'acides mycoliques, l'ADN des mycobactéries est particulièrement difficile à extraire et nécessite des protocoles spécifiques. Le génome de la souche de référence H37Rv contient $4,4 \times 10^6$ paires de bases, soit une quantité similaire à celle décrite chez *E. coli*. Néanmoins, contrairement aux autres génomes bactériens, le génome de *Mtb* a une teneur élevée en guanine (G) et cytosine (C) (61 à 71 % de G+C versus 56 % chez *E. coli*). Le génome contient environ 4000 gènes. Comparé à celui d'*E. coli*, le génome de *Mtb* se distingue par une proportion plus élevée de gènes impliqués dans la synthèse et la dégradation des lipides (environ 250 enzymes distinctes codées par 8 % du génome versus 1,5 % chez *E. coli*). Une autre caractéristique importante du génome de *Mtb* est la présence d'une famille de gènes appelés *pe* et *ppe* (du fait de la présence de motifs conservés avec des résidus proline (P) et d'acide glutamique (E) dans la portion N-terminale de leur séquence), qui représentent environ 10% de la totalité du génome²⁷⁷. Ces régions PE/PPE sont caractérisées par un très haut GC% de l'ordre de 80%, ainsi que par la présence de nombreuses séquences répétées et de duplications²⁷⁸. Ces caractéristiques sont un obstacle à l'analyse optimale de ces régions par la technologie *short read* Illumina.

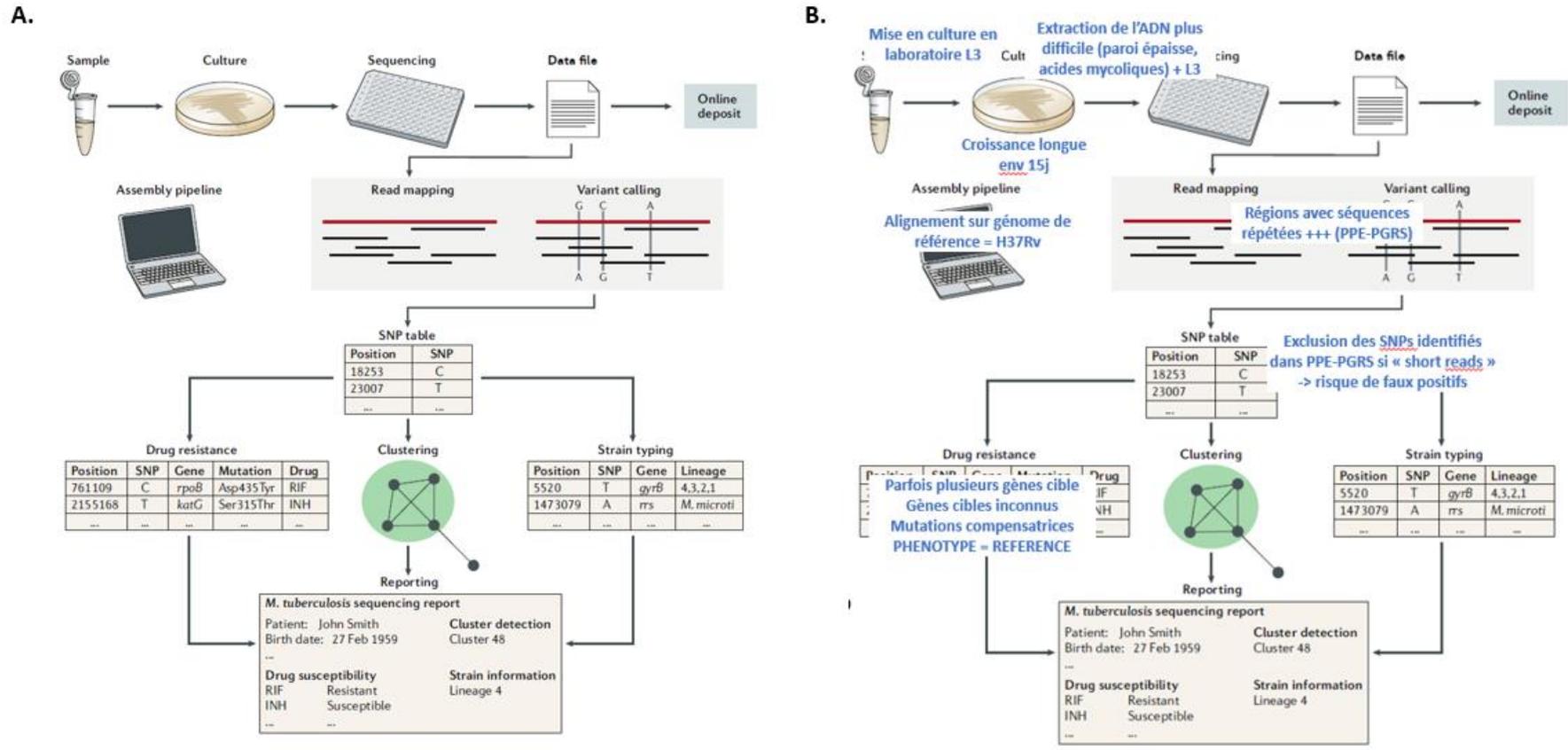


Figure 30- Workflow standard du WGS chez MTBC (A). D'après ²⁷⁹. Difficultés et particularités à chacune des étapes spécifiques à MTBC (B). Adapté de ²⁷⁹

La technologie la plus utilisée actuellement est le séquençage Illumina. Cette technique de séquençage est une technique réalisant le séquençage à haut débit de fragments courts de l'ordre de 150 bp (*short read*). La première étape de cette technologie de séquençage est la préparation de la librairie. Cela consiste à fragmenter l'ADN génomique avant de lui associer des adaptateurs. La librairie est ensuite hybridée sur le support de séquençage, dénommé *flowcell* grâce à des fragments complémentaires des adaptateurs. Ces mêmes adaptateurs comprennent des amorces permettant une amplification de l'ADN pour obtenir de nombreux exemplaires des fragments à analyser, le tout au même endroit de la *flowcell* (*clusters*). Pour le séquençage, de façon très similaire au séquençage Sanger, chacun des fragments de la *flowcell* est lu base par base ; une polymérase vient ajouter des nucléotides (A, T, G et C) marqués par fluorescence. Chaque ajout de nucléotide envoie un signal fluorescent qui est détecté par le séquenceur qui va enregistrer l'information (appel des bases ou *base calling*). En général, le séquençage est effectué en *paired-end*, c'est-à-dire dans les deux sens, en partant de chaque extrémité des fragments. On obtient ainsi à l'issue de l'étape de séquençage des données brutes, qui correspondent aux fichiers FASTQ, avec un fichier R1 et un fichier R2 si le séquençage a été effectué en *paired-end*. Les fichiers FASTQ comprennent les séquences (fichier FASTA) avec leur score de qualité (« Q » de FASTQ). La qualité du séquençage est cotée par un score en Phred, qui évalue la probabilité d'erreur du séquenceur, à savoir qu'une base attribuée à une position donnée ne soit pas la bonne (erreur de « *base calling* »). C'est à partir de ce stade que commence le travail d'analyse bio-informatique, qui va consister à réaliser les étapes successives suivantes, avec à chacune d'entre elles, la génération d'un type de fichier spécifique (« *output* ») (« *pipeline* » d'analyse) (exemple du WGS pour recherche de RAV par rapport à un génome de référence) :

1. Analyse de la qualité des fichiers FASTQ
2. Tri des données afin d'éliminer les données de mauvaises qualité (*trimming*)
3. Alignement = « reconstruction du génome » à partir des lectures (« *reads* ») obtenus à l'issue du séquençage. Pour se représenter cette étape, on peut prendre pour exemple la métaphore d'un puzzle, dans laquelle les *reads* représentent les pièces. Pour cela deux méthodes sont possibles : (i) alignement sur le génome de référence (« *mapping* ») ou (ii) assemblage dit « *de novo* » lorsque l'on n'a pas de génome de référence ou si on souhaite s'affranchir de certains biais dans l'analyse ultérieure qui peuvent être engendrés par le *mapping*. A l'issue de cette étape d'alignement, on obtient des fichiers

SAM (pour « *Sequence Alignment Map* ») ou BAM (*Binary SAM*) ; un contrôle du *mapping* est effectué, et deux paramètres importants vont pouvoir être déterminés : la profondeur et la couverture (**Figure 31**). Les technologies de séquençage *short-read* vont présenter une limite à cette étape, à savoir la difficulté d'alignement des régions répétées. Si on reprend l'exemple du puzzle, en cas de séquences répétées et avec des petits fragments, c'est comme si toutes les pièces étaient quasi identiques, dans ce cas l'algorithme de *mapping* ne parvient pas à réaliser l'assemblage. Chez *Mtb*, cela est un problème majeur car cela concerne environ 10% du génome (gènes de la famille des *pe/ppa*)

4. Recherche des variants (SNVs, indels...) = étape de « *variant calling* », obtention d'un fichier VCF (pour « *Variant Calling File* »)
5. Filtrage des variants
6. Annotation des variants par rapport au génome de référence, c'est-à-dire correspondance des positions génomiques avec les noms des gènes. Obtention d'un fichier GFF (pour *Gene Feature Format*)
7. Synthèse et interprétation de l'impact des variants (ici, sur la résistance aux antituberculeux)
8. Rédaction du rapport clinico-biologique.

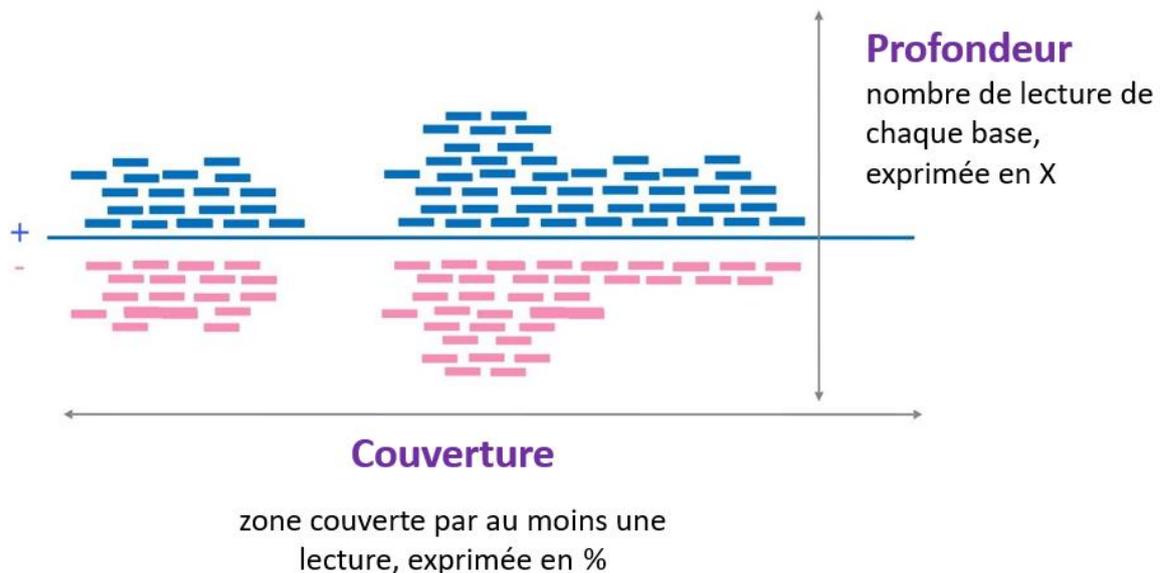


Figure 31- Représentation schématique des paramètres de couverture et de profondeur de séquençage.

Quel que soit l'organisme étudié, ces étapes d'analyse bio-informatique du séquençage génomique sont toujours les mêmes. Ce qui va varier, ce sont les outils utilisés ainsi que les paramètres qui vont leur être appliqués. Effectivement, différents outils sont disponibles pour chacune des étapes. La plupart des outils sont en « *open source* » mais il existe aussi des logiciels commerciaux tels que BioNumerics®. Pour *Mtb*, des pipelines « clé en main » existent et sont même disponibles en ligne gratuitement, tels que PhyResSE ²⁴³(<https://bioinf.fz-borstel.de/>).

Suivant l'outil utilisé et les paramètres appliqués, le résultat en bout de course peut être très variable. Notamment, pour l'étape de « *variant calling* », les performances diffèrent d'un outil à l'autre, et peuvent déjà varier en fonction de l'outil utilisé à l'étape précédente d'alignement du génome. Certains outils sont moins performants pour la détection des InDels. Comme pour tout outil diagnostique, chaque *variant caller* a des performances intrinsèques, qu'on appelle « *recall* » (sensibilité, c'est-à-dire capacité à détecter le maximum de véritables variants) et « *précision* » (spécificité, soit la capacité de l'outil à ne pas détecter de faux variants) ²⁸⁰. Il y a donc un risque de détection de « faux variant », il est donc indispensable de s'assurer de travailler sur des données de qualité, mais aussi de connaître les limites de la technologie de séquençage employée.

De plus, un autre niveau de variabilité dans les résultats sont les paramètres utilisés pour chacun des outils, qui peuvent varier d'un laboratoire à l'autre et d'un opérateur à un autre. On comprend donc que l'analyse bio-informatique est une étape critique impactant grandement le résultat final. Il y a actuellement un manque de standardisation sur le plan international. Ainsi, de façon générale des recommandations ont été émises pour l'utilisation de certains outils, telles que les « *best practices* » pour l'outil de *variant calling* GATK, qui est très utilisé (génomique humaine, microbienne, des plantes) ²⁸¹. Si on se concentre sur la recherche de mutations de résistance chez *Mtb*, il n'existe actuellement pas de recommandations internationales ni de standardisation du *pipeline* et des paramètres de filtration à utiliser. Certains auteurs ont cependant émis des propositions de recommandations, les plus détaillées étant celles publiées par Ley *et al.* ¹¹¹. Sur le plan des instances internationales, l'OMS a publié en 2018 un guide technique sur l'utilisation des méthodes basées sur le NGS pour la recherche de mutations associées à la résistance chez *Mtb* ²⁶³, mais à l'heure actuelle aucune recommandation claire concernant le pipeline bio-informatique d'analyse des données.

Cependant, les étapes de l'analyse bio-informatique ne sont qu'un pan des multiples éléments qui peuvent influencer le résultat de la détection de variants impliqués dans la résistance. La complexité et l'intrication des facteurs entrant en jeu est extrêmement bien illustrée par Ley *et al.* (Figure 32).

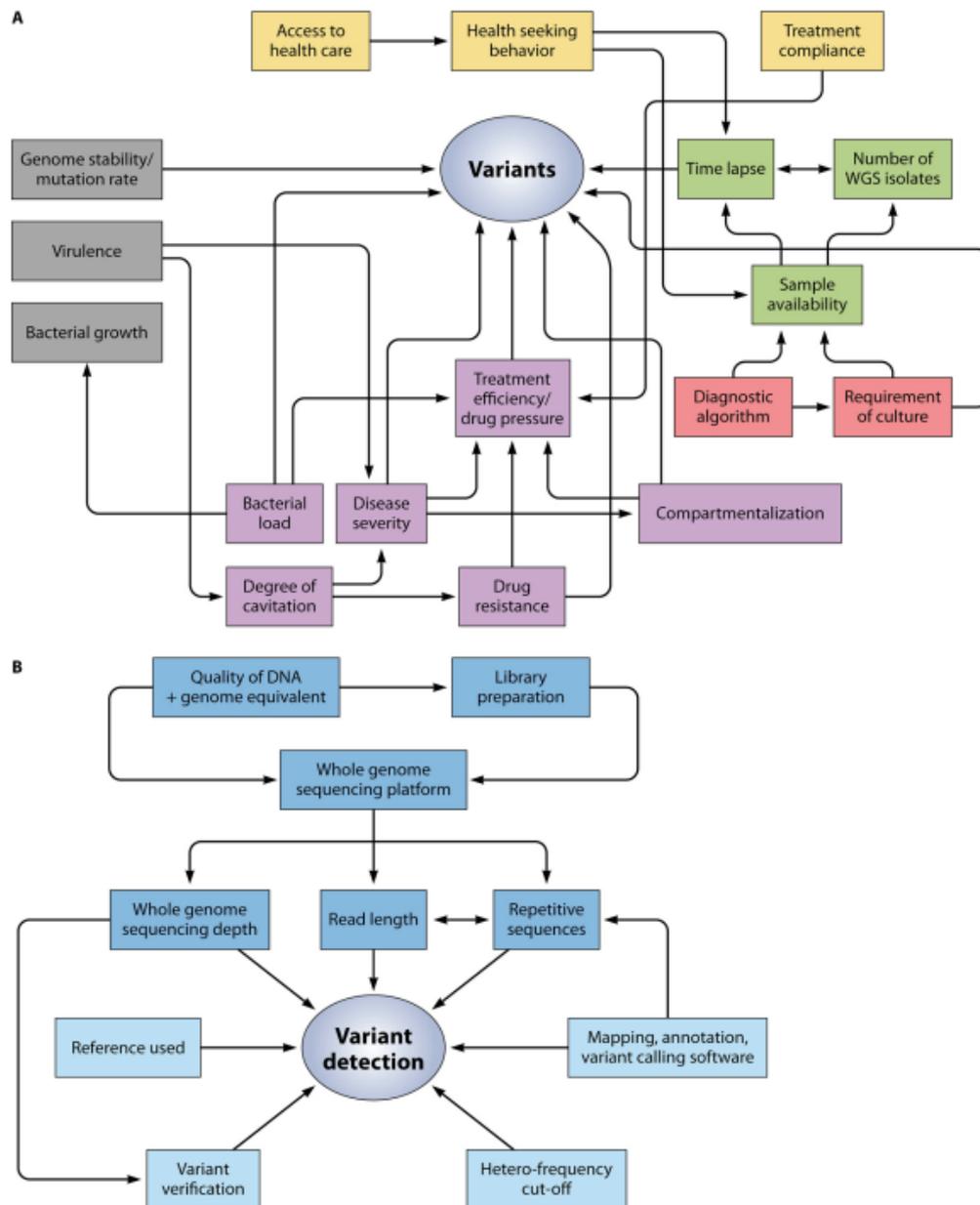


Figure 32- Synthèse des différents paramètres qui influencent l'émergence et la détection de RAV chez *Mtb*. Ces paramètres incluent des facteurs : bactériens (en gris), liés au patient (en jaune), cliniques (en violet), liés à la démarche diagnostique (en rouge), concernant les caractéristiques de l'échantillon (en vert), liés aux aspects techniques du NGS (en bleu foncé), et liés à l'analyse bio-informatique (en bleu clair). D'après ¹¹¹

Le séquençage NGS peut être réalisé selon deux modalités : (i) un séquençage ciblé (« *targeted-NGS* ») utilisant la méthode des amplicons et (ii) le séquençage du génome entier (WGS). Les méthodes de détection génotypiques de la résistance aux antituberculeux chez *Mtb* basées sur l'utilisation du NGS répondent à ces deux modalités :

- Les méthodes ciblées basée notamment sur le séquençage à haut débit d'amplicons, telles que la technique Deeplex Myc-TB® qui sera détaillée ci-après. Cette technique s'appuie sur le séquençage à haut débit avec la technologie de séquençage *short-read* Illumina.
- Le WGS, son exhaustivité en fait tout l'intérêt, permettant en un seul test d'obtenir l'ensemble des informations sur le résistome, mais aussi le virulome, et de caractériser finement la lignée phylogénétique par une méthode de *SNP-barcoding* détaillée précédemment (§1.3.2 Etude de la phylogénie du complexe *tuberculosis*)⁵⁷ Actuellement, la technologie prépondérante utilisée est le séquençage Illumina, mais le séquençage *long-read* se développe.

2.7.2.3.2. Deeplex Myc-TB®

La technique Deeplex Myc-TB® est une technique basée sur le NGS et ciblée. En effet, elle consiste à séquencer des amplicons en faisant appel à du séquençage profond (*deep sequencing*) et non le génome entier.

Cette stratégie offre de **multiples avantages** : (i) réduire la quantité d'extrait d'ADN nécessaire comparativement au WGS, (ii) limiter la contamination par de l'ADN autre que celui de *Mtb* (réalisation directement sur prélèvement possible si examen microscopique positif) (**Publication 7**)²⁶² (ii) diminuer le temps technique et de rendu (7 à 10 jours), (iii) faciliter l'analyse des données et (iv) d'obtenir des profondeurs de séquençage élevées de l'ordre de 1000 à 10 000X, permettant une détection de l'hétérorésistance avec un seuil théorique de 3%²⁷¹.

L'inconvénient qui en résulte est **l'absence d'exhaustivité**. La technique Deeplex Myc-TB® permet la détection de la résistance à 13 antituberculeux de première et de deuxième ligne en ciblant 18 gènes (certains en entier avec région promotrice, d'autres non) avec entre autres des performantes excellentes pour la rifampicine et l'isoniazide et bonnes pour les FQ²⁷¹ (**Tableau 6, Figure 34**). Cette technique évalue entre autres la sensibilité génotypique au linézolide et à la BDQ, mais les performances pour ces deux antituberculeux n'ont pas pu être évaluées, du

fait de la représentation insuffisante de phénotypes résistants dans le set de souches/prélèvements test ²⁷¹. Cependant, pour la BDQ, seul le gène *Rv0678* est investigué, mais dans sa totalité ; le gène *atpE*, qui code la cible de la BDQ, n'a pas été inclus dans le panel. Ce choix est notamment supporté par le fait que les souches cliniques présentant des mutations dans *atpE* restent rares à l'heure actuelle. En dehors de la résistance, le Deeplex Myc-TB[®] permet également d'identifier l'espèce mycobactérienne par le séquençage d'*hsp65* ²⁸², de réaliser du génotypage par spoligotypage ²⁸³, et de faire une détermination de la lignée basée sur les SNPs phylogénétiques ⁵⁷.

Un avantage du Deeplex Myc-TB[®] est sa simplicité d'utilisation, le **pipeline d'analyse des données étant complètement intégré, avec un algorithme d'interprétation de l'impact des mutations** incluant les principales databases de mutations, dont le catalogue OMS de 2021 dans la toute dernière version du test ²⁷¹. Le résultat du résistotype est fourni sous forme de rapport simple d'interprétation grâce à un code couleur (**Figure 34**). Il est donc tout à fait possible d'utiliser ce test sans avoir de compétences en analyse bio-informatique particulières. Cependant, ces dernières apparaissent tout de même indispensables pour une compréhension et une interprétation optimale des résultats. De plus, l'interprétation de l'impact des NSUV est délicate et nécessite une certaine expertise, notamment pour guider la décision thérapeutique en aval.

La technique Deeplex Myc-TB[®] peut être réalisée sur prélèvement, à condition que l'examen microscopique soit positif. Effectivement, dans l'étude de Jouet *et al.*, trop peu de prélèvements avec examen microscopique négatif avaient été inclus pour conclure et le travail mené et le travail mené au CNR incluant 112 prélèvements dont 65 BAAR négatifs avec 16/65 positifs en culture a montré un rendement médiocre sur prélèvement BAAR négatif (**Publication 5**) ²⁶². La profondeur moyenne de séquençage sur prélèvement est de l'ordre de 1000X, les performances étant dépendantes de la richesse en bacilles de l'échantillon. Les profondeurs de couverture observées sont aussi variables suivant les cibles ; les régions les plus problématiques étant *rrs* (aminosides) et *rhl* (linézolide) (**Figure 33**) ²⁷¹, ce qui n'est pas surprenant car probablement lié à un phénomène de compétition avec les séquences des bactéries commensales de l'oropharynx. Les performances de prédiction de la résistance sur prélèvement ont été comparées au WGS sur culture, car les données phénotypiques étaient insuffisantes sur le set test (données brutes du WGS analysées avec les pipelines MTBSeq/PhyResSE/Mykrobe). La principale différence réside dans la détection uniquement

par Deeplex de variants minoritaires ; la non détection par les pipelines d'analyse WGS peut être due (i) à des profondeurs de séquençage insuffisantes ne permettant pas de mettre en évidence ces variants minoritaires, (ii) à un « biais de sélection » lié à l'étape de culture, des sous-populations avec un moins bon fitness pouvant ne pas pousser au profit d'une/de population(s) plus « fit »²⁸⁴.

Le seuil de détection de 3% des variants minoritaires a été fixé dans l'optique d'éviter les faux variants. Ce seuil est supérieur à celui de 1% de la méthode phénotypique par méthode des proportions²⁸⁵, mais bien plus bas que celui de la plupart des autres méthodes génotypiques (**Tableau 6**). Cependant, pour les régions qui présenteraient de grandes profondeurs de séquençage, il serait théoriquement possible d'abaisser le seuil de détection à 1%²⁷¹.

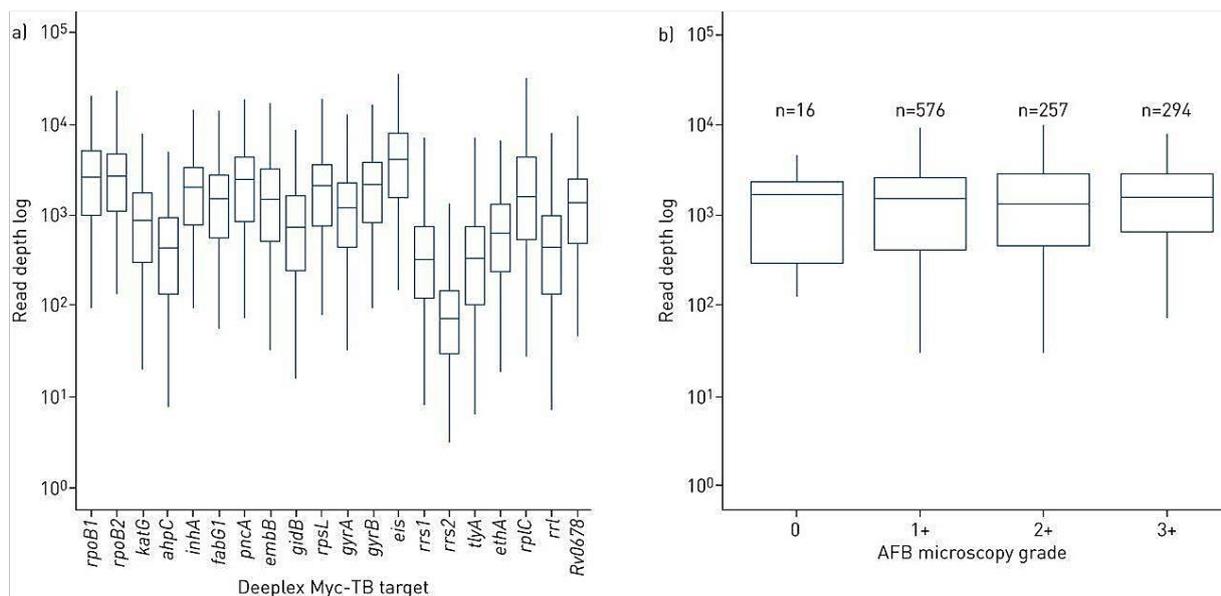


Figure 33- Profondeurs de séquençage obtenues par réalisation du Deeplex Myc-TB® directement sur échantillon clinique (expectorations, n=1494). **a)** Profondeurs de séquençage obtenues (boxplots) pour chacune des cibles. **b)** Profondeurs de séquençage obtenues (boxplots) selon le résultat de l'examen microscopique quand celui-ci était disponible (n=1143). D'après²⁷¹.

Les performances du Deeplex Myc-TB® avec comme comparateur les résultats de l'antibiogramme phénotypique sont présentées dans le **Tableau 6**. Parmi les antituberculeux utilisés en thérapeutique, les plus concernés par des discordances génotype par

Deeplex/phénotype sont le pyrazinamide, l'éthambutol et l'éthionamide, molécules pour lesquelles il est connu que l'antibiogramme phénotypique est imparfait ²⁴⁰ (**Publication 5**) ²⁶².

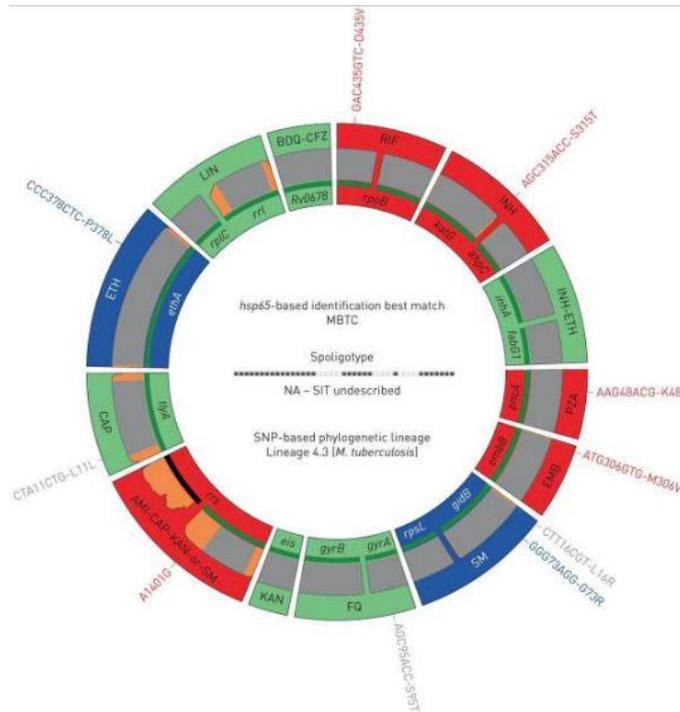


Figure 34- Exemple de rapport de résultat du test Deeplex Myc-TB®.

RIF : rifampicine ; INH : isoniazide ; PZA : pyrazinamide ; EMB : éthambutol ; SM : streptomycine ; FQ : fluoroquinolones ; KAN : kanamycine ; AMI : amikacine ; CAP : capréomycine ; ETH : éthionamide ; LIN : linezolid ; BDQ : bédaquiline ; CFZ : clofazimine ; NA : non applicable ; SIT : *spoligotype international type* ; SNP : *single nucleotide polymorphism* ; LOD : limite de détection.

Les informations sur l'identification basée sur *hsp65*, le spoligotype (dans ce cas, non encore connu de la base de données SITVIT) et l'identification phylogénétique de la lignée MTBC basée sur le SNP barcoding de Coll *et al.* ⁵⁷ sont indiquées au centre du cercle. Chaque portion du cercle correspond à l'un des 13 antituberculeux évalué par le test. Les secteurs en rouge et en vert indiquent les cibles dans lesquelles des mutations associées à la résistance ou soit aucune mutation, soit uniquement des mutations non associées à la résistance (en gris) sont détectées, ce qui permet de prédire des phénotypes résistants ou sensibles, respectivement. Les secteurs bleus font référence aux régions où des mutations non encore caractérisées sont détectées (NSUV). Les lignes vertes au-dessus et au-dessous des noms de gènes représentent les séquences dont la couverture est supérieure à 95 %. La LOD de l'hétérorésistance (reflété par les sous-populations de *reads* portant une mutation), qui dépend de la profondeur globale à la position donnée, est représenté par des zones grises (LOD 3%) ou orange (LOD >3-80%). Ici, la LOD est >3% à la fin de quelques cibles seulement et sur deux régions de *rrs* qui ont une couverture habituellement plus faible. D'après ²⁷¹.

2.7.2.3.3. Séquençage du génome complet

Le WGS est un bon outil pour la prédiction de la résistance aux antituberculeux chez *Mtb*^{239,279,286}. **Toute son attractivité réside dans son exhaustivité** ; en un seul test, on pourrait disposer en théorie de la sensibilité génotypique à l'ensemble des antituberculeux, ce qui permettrait au clinicien en aval d'avoir tout l'éventail d'options thérapeutiques disponibles. Cependant, il ne peut être réalisé en routine qu'à partir de la culture²⁸⁷, ce qui allonge le délai d'obtention des résultats. En effet, actuellement, malgré les procédures d'optimisation du rendement de l'extraction d'ADN génomique à partir du prélèvement, les profondeurs de couverture obtenues à l'issue du séquençage sont insuffisantes, même sur les échantillons présentant une charge bacillaire élevée^{288,289}. Cela limite grandement la sensibilité de détection des mutations, d'autant plus en cas d'hétérorésistance, qui peut être un facteur prédictif d'échec de traitement^{290,264}.

De plus, le WGS est sujet à de **grande variabilité dans l'analyse bio-informatique** des données comme cela a déjà été détaillé plus en amont dans le manuscrit (§ **2.7.2.3.1 Historique et principes du séquençage génomique appliqué à l'étude de *Mtb***). L'interprétation des résultats est délicate, et nécessite d'avoir une connaissance approfondie et sans cesse actualisée des mutations impliquées (ou non) dans la résistance et à quel degré. Comme déjà évoqué, des bases de données existent, la plus récente étant celle de l'OMS en 2021^{206,291}. L'autre challenge est de présenter les résultats de façon synthétique pour les rendre les plus compréhensibles et surtout les plus utiles possibles au clinicien. L'objectif en aval étant d'optimiser la prise en charge du patient, donc d'être en mesure de guider la décision thérapeutique.

Afin de répondre à ce problème, **des études génomiques à grande échelle** ont été conduites, en corrélation avec les données phénotypiques. Ces études sont indispensables pour avoir la puissance nécessaire pour mettre en évidence de nouveaux variants avec un niveau de preuve suffisant : nouveaux variants dans des gènes/régions intergéniques déjà répertoriées comme impliquées dans la résistance aux antituberculeux, mais aussi identification de nouveaux gènes/nouvelles régions intergéniques. Cela est notamment le cas du projet mené par le consortium international CRyPTIC^{272,232}. Une étude réalisée par ce consortium publiée en 2018 a permis de déterminer les performances du WGS pour la prédiction de la résistance aux antituberculeux de première ligne, avec une sensibilité variant de 91.3% à 97.5% et une spécificité de 93.6% à 99.0%²⁷² (**Tableau 6**). La sensibilité la plus basse concernait le pyrazinamide. D'autres études se sont intéressées à ces performances comparativement à

l'antibiogramme phénotypique. Les résultats des principales études sont synthétisés dans le **Tableau 6**. La première chose que l'on observe est que les **performances sont moins bonnes concernant la prédiction de la résistance aux antituberculeux de seconde ligne**^{245,239}. Elles sont même non évaluables pour certains d'entre eux, faute notamment de données phénotypiques suffisantes. Cela concerne deux antituberculeux du groupe A que sont la BDQ et le linézolide, ainsi que le délamanide et le prétomanide. Le deuxième point est la **disparité des performances suivant les études**. Effectivement, l'interprétation des valeurs de sensibilité et de sensibilité doit être prudente, car très dépendantes comme nous l'avons vu des *pipelines* utilisés, des critères de filtration des variants, du niveau de détection de l'hétérorésistance, et de la liste de gènes candidats étudiés et de la prise en compte ou non dans le calcul des NSUV, qui sont variables suivant les études.

Les données du consortium CRyPTIC^{272, 232} ont été aussi utilisées pour l'établissement du **catalogue de mutations par l'OMS en 2021**^{291, 206}, représentant une grande avancée dans la standardisation sur le plan international de l'interprétation des mutations identifiées par WGS chez *Mtb*. Cette base de données a été établie grâce à la collecte de données phénotypiques et génomiques dans 45 pays (n=38215 isolats de MTBC). Une analyse statistique a permis d'établir une gradation pour l'implication des mutations dans la résistance aux antituberculeux. Les performances de prédiction de la résistance aux antituberculeux basées sur l'utilisation de ce catalogue des mutations sont présentées dans la **Figure 35**²⁹¹. Pour la rifampicine, l'isoniazide, l'éthambutol, les FQ et la streptomycine la sensibilité est supérieure à 80%. La spécificité est la moins bonne (<95%) pour l'éthionamide, la moxifloxacinine et l'éthambutol. On peut nettement observer que ce catalogue OMS n'est pas performant pour la prédiction de la résistance pour deux molécules du groupe A (BDQ et linézolide), ainsi que pour la CFZ et le délamanide.

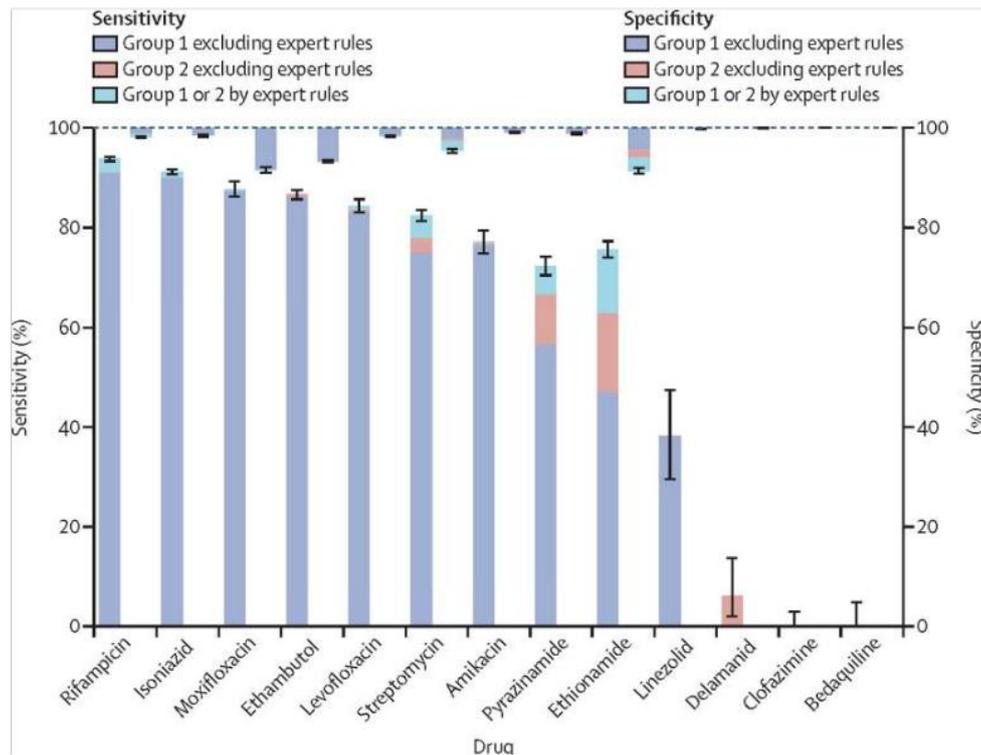


Figure 35- Sensibilité et spécificité du catalogue OMS pour la prédiction de la résistance par antituberculeux. La sensibilité est représentée par les barres ascendantes, et la spécificité par les barres descendantes. La progression de la couleur dans chaque barre montre la sensibilité supplémentaire gagnée, et la spécificité correspondante perdue, en élargissant le catalogue pour inclure d'abord les mutations du groupe 1, puis celles du groupe 2, dans chaque cas sans l'utilisation de règles d'experts, puis en ajoutant les règles d'experts. Toutes les mutations soumises à une règle d'expert ont été classées dans le groupe 2, à l'exception des mutations *rpoB* limites. Les barres d'erreur indiquent les intervalles de confiance à 95 % pour l'effet total de toutes les mutations présentées. Groupe 1=associé à la résistance. Groupe 2=associé à la résistance-intermédiaire. D'après ²⁹¹

Basée sur ces données, le consortium CRyPTIC a pu réaliser récemment une étude de type GWAS pour chacun de ces 13 antituberculeux ²⁹². Comparativement aux autres études GWAS publiées précédemment chez *Mtb* ^{293, 294}, celle-ci présente deux points novateurs : (i) tout d'abord concernant la méthodologie bio-informatique en utilisant les k-mers* : recherche d'association avec des oligopeptides (11-mers, un peu plus de 10 millions) et des oligonucléotides (31-mers, un peu plus de 5 millions) afin de s'affranchir des possibles biais engendrés par l'alignement sur un génome de référence, et notamment du problème de l'alignement posés par les régions répétées de type PE/PPE ; (ii) **utilisation de valeur de CMI** et non de la donnée binaire sensible/résistant, plus en adéquation avec le *continuum* que représente la résistance aux antibiotiques. De plus, il est important d'identifier les mutations associées à une élévation modérée de la CMI chez les isolats résistants (bas niveau de résistance), car en pratique thérapeutique, cela pourrait être résolu par une augmentation de la

posologie de l'antituberculeux. Cela a été montré notamment pour la rifampicine et l'isoniazide^{246, 247}. De la même manière, il est également crucial d'identifier les mutations responsables d'une élévation de CMI chez les souches catégorisées comme sensible, car il a été montré que cela pouvait augmenter le risque de rechute après traitement²⁹⁵. Cette étude a également pour intérêt d'avoir **exploré les antituberculeux les plus récemment utilisés** notamment dans le traitement de la TB MDR, à savoir le linézolide, la BDQ et la CFZ, ainsi que le délamanide. Un des pièges et aussi une limite de ces études à grande échelle de type GWAS pour l'exploration de la résistance aux antimicrobiens est l'identification de résistances croisées qui sont artéfactuelles, pour lesquelles des variants impliqués dans la résistance à un antibiotique donné ressortent associés à la résistance à une/d'autre'(s) molécules. Il est difficile de complètement affirmer le caractère artéfactuel en l'absence de données expérimentales.

En dehors de l'identification des SNVs, et des indels, **d'autre variants ont déjà été rapportés comme impliqués dans la résistance mais ne sont pas encore recherchés systématiquement dans la pratique clinique** d'analyse de WGS chez *Mtb* : (i) grandes insertions (telles que duplication) et délétions (> 50 pb), (ii) insertion d'IS dans les gènes impliqués dans la résistance.

2.7.2.3.4. Apport des techniques de séquençage *long-read*

Les particularités du génome de *Mtb* entraînent des difficultés pour l'analyse optimale du génome par les technologies de séquençage *short read* de type Illumina. Le problème est l'exploration des PE/PPE qui ne peut pas être réalisée de façon optimale du fait du GC% très élevé et de la présence abondante de régions répétées et de duplications. La 3^e génération de séquenceurs haut débit est représentée par deux technologies (PacBio et Minion Oxford Nanopore) qui permettent réaliser le séquençage de lecture longues, et ainsi de séquencer ces régions qui posent problème en Illumina. Ces technologies de séquençage sont déjà employées chez *Mtb*. Cela a permis la mise en évidence d'un variant pouvant être impliqué dans la résistance au sein des PE/PPE²⁹⁶. Ce séquençage de 3^{ème} génération aurait aussi de meilleures performances pour la détection des variants structuraux²⁹⁷. Cependant, ce type de séquençage possède également des inconvénients : débit moins important que l'Illumina, et surtout, un taux plus élevé d'erreurs de *base calling* (10-15% pour PacBio ou MinIon versus <1% pour Illumina). Cela est un problème pour l'utilisation seule de cette technologie pour la prédiction de la résistance aux antituberculeux. Afin de combiner les avantages des deux technologies, l'optimum est de réaliser un séquençage hybride.

2.8. Résistance aux fluoroquinolones chez *M. tuberculosis*

2.8.1. Présentation générale des (fluoro)quinolones

Les **FQ**, antibiotiques de synthèse très largement utilisés au niveau mondial en médecine humaine et vétérinaire, font partie de la famille des quinolones, ou acide pyridine- β -carboxylique. Les **quinolones** ont une structure de base qui comprend un cycle pyridine substitué par une fonction carboxylique en C3, une fonction cétone en C4 et un atome d'azote en position 1 (**Figure 36**). Le cycle pyridine est accolé à un second cycle de nature aromatique.

Il existe de nombreux antibiotiques dans cette grande famille des quinolones, malheureusement aucune classification aussi précise que pour les bêta-lactamines n'existe. Selon les publications, la classification peut varier, mais, on distingue généralement **4 générations de quinolones** sur la base de leur structure et de leur spectre d'activité ²⁹⁸ :

- **quinolones de première génération ou « anciennes quinolones »**, comme l'acide nalidixique ou l'acide oxolinique, qui ont un spectre antibactérien limité aux bactéries à Gram négatif telles que les entérobactéries, *Vibrio spp*, *Haemophilus spp*, *Neisseria spp*, *Moraxella catarrhalis*. La découverte de ces quinolones date de 1945 avec la mise en évidence par George Leshner de l'activité antimicrobienne de la 7-chloro-quinoline, composé obtenu lors de la synthèse et de la purification de la chloroquine (antipaludéen) ²⁹⁹. La première quinolone utilisée en thérapeutique, l'acide nalidixique, dérive de ce composé ; elle a été introduite en thérapeutique à partir de 1967 ^{300,301,302}.

- **quinolones de deuxième génération, aussi appelées FQ**, car elles dérivent de l'acide nalidixique par l'addition d'un atome de fluor en position 6 (ex. péfloxacin, norfloxacin, ofloxacin, ciprofloxacin). Ces molécules ont une activité 100 à 100 fois supérieure vis-à-vis des bactéries à Gram négatif, incluant *P. aeruginosa*, et sont actives vis-à-vis de certaines bactéries à Gram positif comme les staphylocoques, et de bactéries à développement intracellulaire, comme les légionnelles et les rickettsies. La modification de structure a aussi permis d'augmenter l'absorption orale et la distribution dans les tissus de ces composés ³⁰³.

- **quinolones de troisième génération, aussi appelées « nouvelles FQ » par opposition aux « anciennes FQ » de 2ème génération**, qui comprennent la lévofloxacin (isomère lévogyre de l'ofloxacin), la moxifloxacin, ou la gatifloxacin. Ces molécules ont été développées dans le but d'obtenir une meilleure activité vis-à-vis des bactéries à Gram positif, en particulier le pneumocoque, et des bactéries anaérobies ; ce sont également les premières de la classe des

quinolones à avoir une activité antimycobactérienne. La structure de ces nouvelles FQ diffère de celles des anciennes FQ par des substitutions en C5, en C8 et des cycles aromatiques variés en C7. Ces molécules ont, dans leur ensemble, une demi-vie plus longue, des concentrations sériques plus élevées et certaines seraient plus résistantes aux mécanismes de résistance à type d'efflux.

- **quinolones de quatrième génération**, comprenant notamment la garénoxacine qui ne possède pas d'atome de fluor en position 6, et avec en position 7 un noyau isoindoline. Elle présente un large spectre d'activité sur les bactéries à Gram négatif et positif, y compris anaérobies, mais n'est disponible qu'au Japon.

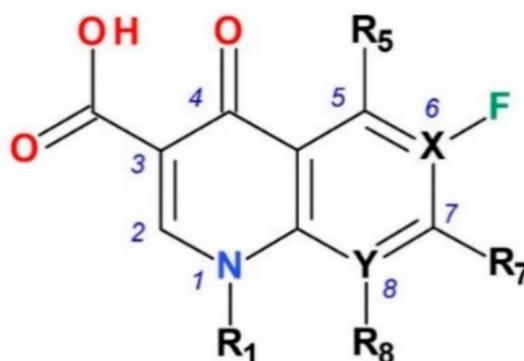


Figure 36- Structure chimique des fluoroquinolones. D'après ²⁹⁸

2.8.2. Activité des fluoroquinolones chez *M. tuberculosis*

Nous n'aborderons dans ce chapitre que les informations concernant les FQ commercialisées et pas les nombreux dérivés de FQ ou inhibiteurs de topoisomérases II qui ont été développés ces 15 dernières années. Pour ces derniers les données d'efficacité disponibles sont encore très préliminaires.

2.8.2.1. Activité *in vitro*

La lévofloxacin, la moxifloxacin et la gatifloxacin sont aujourd'hui les quinolones les plus utilisées pour traiter les TB. Les CMI médianes de la lévofloxacin, de la moxifloxacin et la gatifloxacin vis à vis de souches cliniques de *Mtb*, mesurées en milieux 7H9 sont de 0,125 [0,032-0,5], 0,064 [0,032-0,25] mg/L et 0,12 [0,06-0,5] mg/L, respectivement ^{304, 305}. Les FQ

sont **bactéricides** vis-à-vis de *Mtb*, le ratio CMB/CMI variant de 1 à 4³⁰⁶. L'activité bactéricide de la moxifloxacine est plus importante que celle de la lévofloxacine lors de la phase exponentielle de croissance ; cependant, lors de la phase stationnaire, c'est la lévofloxacine qui a l'activité bactéricide la plus importante³⁰⁷.

La proportion de mutant résistants est de 10⁻⁶ à 10⁻⁸^{308,309}.

Les FQ ont une bonne **pénétration intra macrophagique**, lieu de résidence des bactéries à métabolisme ralenti³¹⁰⁻³¹². En intracellulaire, les CMI des différentes FQ augmentent entre 2 à 20 fois par rapport aux CMI obtenues en extracellulaire. La moxifloxacine semble être la FQ la moins affectée avec une augmentation des CMI d'un facteur 2 en intracellulaire, suivie de l'ofloxacine (augmentation des CMI d'un facteur 4)³¹³. Dans les macrophages, l'activité bactéricide de l'ofloxacine est augmentée en présence de pyrazinamide³¹⁴.

2.8.2.2. *Activité in vivo dans des modèles murins d'infection tuberculeuse*

Les études de chimiothérapie expérimentale chez la souris ont montré que la moxifloxacine était la FQ la plus active, suivie de près par ordre décroissant d'activité par la sparfloxacine, la lévofloxacine et l'ofloxacine³¹⁵. En effet, dans les modèles murins, la moxifloxacine à 100 mg/kg s'est révélée plus active que les autres FQ avec une activité bactéricide vis-à-vis de *Mtb* légèrement supérieure à celle de l'isoniazide^{316,317}. Des études chez la souris ont montré que (i) la moxifloxacine a une activité stérilisante sur *Mtb*³¹⁸, (ii) cette activité stérilisante est supérieure à celle de l'ofloxacine et de l'isoniazide dans une population de bactéries tolérantes à la rifampicine, mimant ce qui se passe au début du traitement chez l'homme³¹⁹, et (iii) cette activité stérilisante de la moxifloxacine, à dose équivalente à 400 mg chez l'homme, est supérieure à celle de la lévofloxacine, à dose équivalente à 1000 mg chez l'homme³²⁰. La gatifloxacine (300 mg/kg) a montré une activité équivalente à la moxifloxacine et à l'isoniazide (464). L'association de la gatifloxacine et de la rifampicine a montré une activité bactéricide équivalente à l'association isoniazide-rifampicine.

2.8.2.3. *Etudes de bactéricidie initiale (EBA) réalisées chez l'homme*

Les études d'EBA ont montré que la moxifloxacine a une activité bactéricide initiale comparable à celle de l'isoniazide chez des patients atteints de TB, et des résultats similaires ont ensuite été obtenus avec la gatifloxacine et des hautes doses de lévofloxacine³²¹⁻³²³.

2.8.2.4. Utilisation des FQ dans le traitement de la TB chez l'homme

Les premières utilisations des FQ pour le traitement des TB datent des années 1990 où elles concernaient les TB MDR pour lesquelles les options thérapeutiques étaient encore plus restreintes qu'aujourd'hui. Elles se sont révélées clés pour le traitement des TB résistantes, que ce soit les TB dues à des souche RR/MDR⁹⁰, mais aussi des souches mono-résistance à l'isoniazide²⁵⁴. Elles sont d'ailleurs intégrées à des régimes thérapeutiques en cours d'évaluation, comprenant également BDQ, prêtomanide et linézolide, visant à réduire la durée du traitement des TB MDR à 6 mois (étude TB-PRACTECAL,³²⁴), soit la même durée que les TB à bacilles sensibles.

Du fait de leur excellente activité antituberculeuse les FQ ont été considérées comme de bons candidats pour raccourcir le traitement des TB à bacilles sensibles de 6 à 4 mois. Quelle que soit la place de la FQ dans les régimes évalués (en plus du traitement standard, ou en remplacement de l'isoniazide ou de l'éthambutol), aucune de ces études n'a montré une possibilité de raccourcissement du traitement³²⁵⁻³²⁷.

2.8.3. Mécanisme d'action des fluoroquinolones

Les **cibles des FQ** sont les topoisomérases de type II, topoisomérase de type IV et ADN gyrase³²⁸. Ces deux enzymes ubiquitaires interviennent lors des processus de réplication, de transcription, de recombinaison et de réponse au stress en modulant la topologie de l'ADN en coupant transitoirement les 2 brins de l'hélice d'ADN^{329,330}. **Chez *Mtb*, l'ADN gyrase est l'unique topoisomérase de type II**³³¹.

L'ADN gyrase est la seule topoisomérase de type II capable de générer un ADN surenroulé négativement, une activité essentielle pour le maintien de la compaction du génome bactérien³³². La gyrase a une activité centrale dans la propagation de la fourche de réplication en permettant d'éliminer les supertours positifs d'ADN qui se forment devant celle-ci³³³⁻³³⁵. L'ADN gyrase est composée de 2 sous-unités, GyrA et GyrB, organisées en un hétérotétramère A₂B₂. La sous-unité A est composée de 2 domaines distincts : (i) le domaine N-terminal de coupure - ligation de l'ADN contenant la tyrosine réactive en position 129 responsable du clivage et de la religation de l'ADN, et (ii) le domaine C-terminal. La sous-unité B est composée d'un domaine ATPase suivi du domaine TOPRIM (**Figure 37**)^{336,337}. Les domaines Toprim de GyrB et N-terminal de GyrA forment le cœur catalytique. La région TOPRIM est formée de différents domaines. Un premier domaine globulaire de GyrB est constitué de deux segments

d'acides aminés non contigus (résidus 448–564 et 633–654), contenant la région déterminant la résistance aux quinolones (QRDR) de la sous unité GyrB. Dans le domaine Toprim, trois acides aminés (E459, D532, D534) permettent la fixation d'un ion Mg^{2+} essentiel à la réaction de coupure-ligation de l'ADN. La région terminale est formée des résidus 565–608 formant trois feuillets β antiparallèles et une hélice α qui sont reliés au domaine globulaire par une région charnière formée par une structure boucle-hélice-boucle (résidus 609–632) (**Figure 37**). Chaque monomère GyrA contient 5 régions distinctes, la région N-terminale (résidus 9-41) et 4 régions retrouvées chez toutes les topoisomérases de type II : le site de coupure - ligation de l'ADN ou « *DNA-gate* » (résidus 42-169), la « *tower* » (résidus 170-355 et 491-501), la porte C (résidus 401-444) et 3 hélices (résidus 356-400 et 445-490) (**Figure 37**). Le motif hélice-boucle-hélice fixant l'ADN (hélices α_3 et α_4), la QRDR de GyrA (résidus 74-113) et les résidus catalytiques (R128 et Y129) sont localisés dans le « *DNA-gate* ».

La région TOPRIM forme un dimère avec GyrA générant ainsi un trou central de 30 Å de diamètre permettant le passage d'un segment T d'ADN du site de coupure - ligation de l'ADN (« *DNA-gate* ») à la porte C. Cette interface dimérique est flanquée de deux domaines carboxy-terminaux adoptant un repliement tridimensionnel en forme de disque, indispensables à l'introduction de courbures dans l'ADN³³⁸. Dès qu'une première portion d'ADN (segment G) est fixée à l'interface dimérique, la séquence contiguë (segment T) s'enroule autour d'un domaine spécifique de la gyrase et forme un croisement au-dessus du segment G. L'enzyme fixe alors deux molécules d'ATP et ferme l'interface dimérique au-dessus du croisement d'ADN. Ceci permet successivement la coupure du segment G, le passage du segment T à travers la coupure double brin transitoire, puis l'expulsion du segment T, générant ainsi un tour de surenroulement³³⁹.

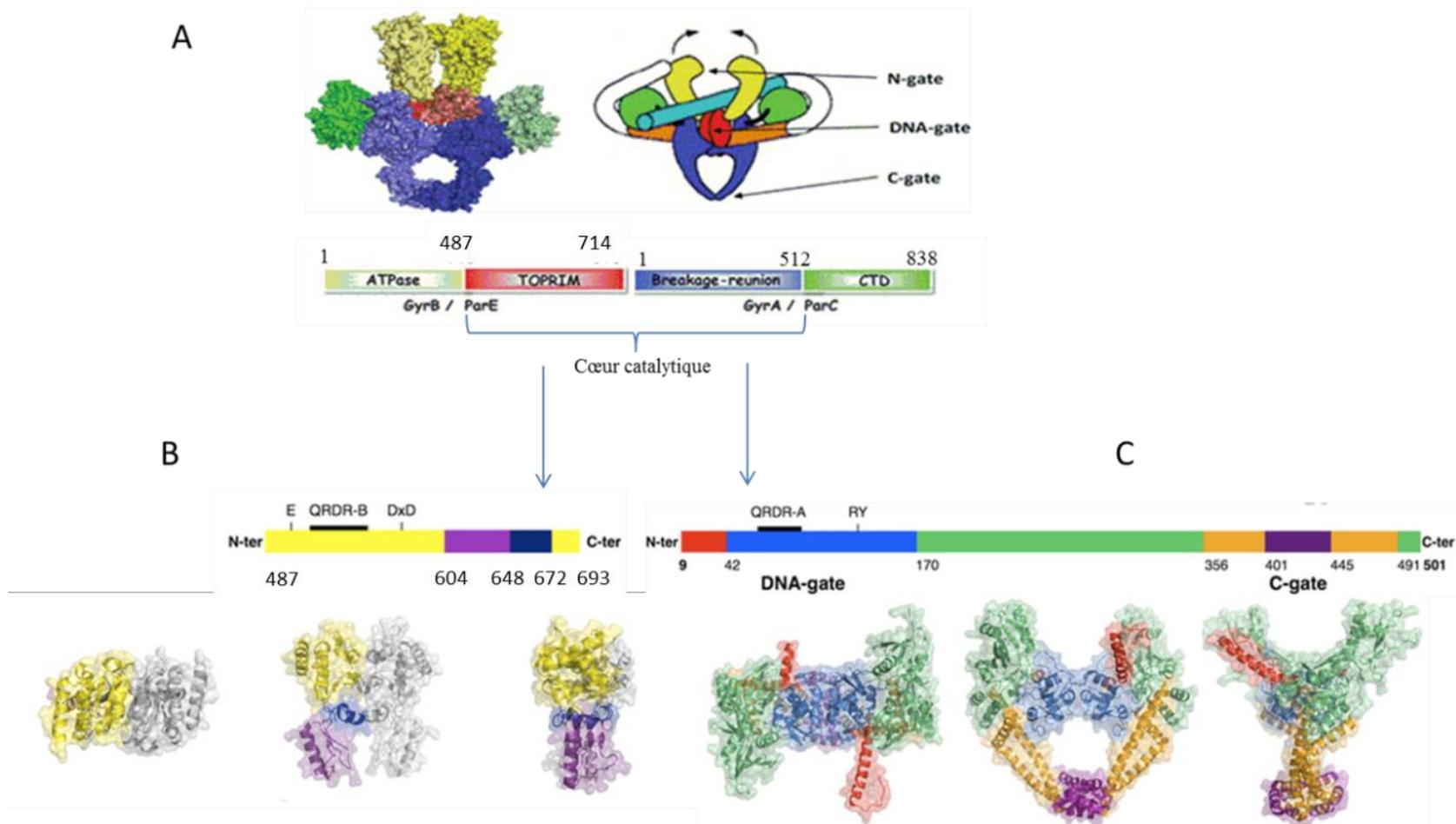


Figure 37- (A) Représentation schématique de la séquence organisée en domaines des sous-unités GyrA et GyrB formant l'hétérotétramère GyrA₂B₂. (B) Domaine Toprim de *Mtb* organisé en dimère visualisé selon 3 orientations. La région Toprim est représentée en jaune, la région terminale en violet et la région charnière en bleu. Numérotation de GyrB de *Mtb* de 1998. (C) Domaine de fusion de 2 sous-unités GyrA visualisé selon trois orientations. L'hélice N-terminale est représentée en rouge, le « DNA-gate » en bleu, la « tower » en vert, les hélices en orange et la « porte C » en violet. D'après ^{340, 337}

Le mode d'action des quinolones est très complexe ³⁴¹. L'action bactériostatique et bactéricide des quinolones fait appel à des mécanismes distincts, impliquant la fragmentation de l'ADN et l'accumulation de ROS (*reactive oxygen species*, dérivés réactifs de l'oxygène) en aérobiose et de dérivés réactifs de l'azote en anaérobiose, et menant à la mort bactérienne induite par le stress. La contribution de chacun de ces mécanismes (fragmentation de l'ADN et accumulation de ROS) à la mort cellulaire dépend de la quinolone et des conditions de culture.

Les FQ piègent les topoisomérases sur l'ADN dans des complexes ternaires réversibles ADN-ADN gyrase-FQ qui bloquent la réplication et la croissance bactérienne. A des **concentrations basses de FQ (c'est-à-dire inférieures à la CMI)**, cela aboutit à l'inhibition de la synthèse de l'ADN et bloque la croissance bactérienne. **A des concentrations élevées de FQ (c'est-à-dire supérieures à la CMI)**, cela aboutit à la mort cellulaire ³⁴¹ du fait du relargage d'ADN coupé des complexes ternaires conduisant à la fragmentation du chromosome et à la mort cellulaire ³⁴¹.

La fragmentation de l'ADN médiée par les FQ n'est pas létale en soi pour la bactérie. Elle stimule l'expression de gènes impliqués dans la réponse au stress oxydatif et dans la réparation de l'ADN, ce qui est coûteux pour la bactérie. Cette stimulation se fait via un mécanisme encore mal connu mais qui conduit à l'accumulation de ROS. Cette accumulation de ROS est variable selon la FQ et selon les conditions de culture, mais se poursuit même après le retrait de la quinolone du milieu, générant des dommages secondaires qui submergent les mécanismes de réparation, ce qui est, au final, responsable de la mort bactérienne ³⁴¹. De façon intéressante, ces perturbations qui interfèrent avec l'accumulation de ROS confèrent une tolérance à d'autres antibiotiques (ex. aminosides, bêta-lactamines).

2.8.4. Mécanismes de résistance acquise aux fluoroquinolones chez *M. tuberculosis*

La résistance aux FQ chez les bactéries autres que les mycobactéries peut être due à des mutations chromosomiques, mais également portée par des éléments génétiques mobiles comme les plasmides, bien qu'on ait longtemps pensé que la présence d'éléments génétiques mobiles responsables de la résistance ne pourrait pas se rencontrer car les FQ sont des antibiotiques synthétiques. Chez ces bactéries, la résistance aux FQ est due à quatre mécanismes principaux :

- modification de la cible,

- défaut d'accumulation de l'antibiotique, due soit à une diminution de la perméabilité de la membrane externe bactérienne, soit à un efflux,
- inactivation enzymatique de l'antibiotique dans la bactérie,
- protection de la cible (protéines Qnr).

Bien qu'intéressants pour mon sujet de thèse, j'ai choisi de ne pas détailler ces mécanismes par souci de concision, ce d'autant, que lorsque c'est pertinent, ils sont évoqués dans la **publication 9** relative aux travaux menés sur les FQ et dans la discussion de ce travail.

Les mécanismes de résistance aux FQ rencontrés chez les mycobactéries sont plus limités, du fait notamment de l'absence d'acquisition d'ADN extra chromosomique, et sont détaillés ci-après. Si la majorité des souches cliniques de *Mtb* résistantes aux FQ le sont du fait de mutations dans les gènes *gyrA* et/ou *gyrB*, les modifications de l'ADN gyrase n'expliquent cependant que 50 à 100% des cas de résistance observés³⁴².

2.8.4.1. Modifications de la cible

Dans ce paragraphe, la numérotation de GyrA et GyrB est celle de *Mtb*. De nombreux systèmes de numérotation ont été publiés pour GyrB de *Mtb*, nous utiliserons ici le système de numérotation de GyrB basé sur la séquence de GyrB publiée en 2002, qui est celui adopté dans le catalogue OMS des mutations^{206,342}. Les **tableaux 7 et 8** donnent les équivalences entre les systèmes de numérotation de *Mtb* et de *E. coli* pour les principales positions.

Tableau 7- Comparaison des numérotations chez *E. coli* et *Mtb* de la région déterminant la résistance aux quinolones (QRDR) de GyrA.

Acide aminé	Séquence de GyrA	
	<i>E. coli</i>	<i>M. tuberculosis</i>
Ala	67	74
Glu	81	88
Ser (<i>E. coli</i>) / Ala (<i>M. tuberculosis</i>)	83	90
Ala (<i>E. coli</i>) / Ser (<i>M. tuberculosis</i>)	84	91
Asp	87	94
Gln	106	113

Tableau 8- Comparaison des différents systèmes de numérotation de GyrB décrits dans la littérature. D'après ³⁴²

Substitution	<i>E. coli</i>	Séquence de GyrB chez <i>M. tuberculosis</i> (année de publication)			
		1994	1998	2000	2002
Arg-->Cys	411	480	485	457	446
Ser-->Phe	412	481	486	458	447
Asp-->Ala	426	495	500	472	461
Asp-->Asn	426	495	500	472	461
Asp-->His	426	495	500	472	461
Gly-->Ala	435	504	509	481	470
Asp-->Ala	459	528	533	505	494
Asn-->Asp	464	533	538	510	499
Asn-->Lys	464	533	538	510	499
Asn-->Thr	464	533	538	510	499
Thr-->Asn	465	534	539	511	500
Thr-->Pro	465	534	539	511	500
Glu-->Asp	466	535	540	512	501
Glu-->Val	466	535	540	512	501
Ala-->Thr	469	538	543	515	504
Ala-->Val	469	538	543	515	504
Gln-->His	503	572	577	549	538

La région déterminant la résistance aux quinolones (QRDR) est représentée par un encadré. En gras : numérotation utilisée dans ce manuscrit.

Il a été estimé que 60 à 90 % des isolats cliniques de *Mtb* résistants aux FQ possédaient des mutations au sein de la « région déterminant la résistance aux quinolones » (QRDR) de *gyrA*, comprise entre les acides aminés 74 et 113 et que 3% possédaient des mutations au sein de la QRDR de *gyrB* ³⁴². Les mutations associées à la résistance surviennent le plus fréquemment au niveau des codons 88, 90, 91 et 94 de *GyrA* ³⁴³. La QRDR de *GyrB* proposée initialement est calquée sur celle décrite pour *E. coli* et était comprise entre les acides aminés 461 et 499. Une extension de la QRDR aux acides aminés 500 et 501 a ensuite été proposée ^{336,344,345}.

Dans le **catalogue OMS des mutations**, seules 14 substitutions dans *GyrA/GyrB* ont été classées comme associées à la résistance (« *associated with resistance* »), probablement associée à la résistance (« *associated with resistance, interim* ») ou douteuses (« *uncertain significance* »), pour la lévofloxacine et/ou la moxifloxacine ²⁰⁶ :

- neuf substitutions dans *GyrA* :
 - o huit considérées comme associée à la résistance : 5 au niveau du codon 94 (D94A, D94G, D94H, D94N, et D94Y), A90V, S91P et G88C,
 - o une considérée comme probablement associée à la résistance : G88A.
- huit substitutions dans *GyrB* :

- cinq sont considérées comme probablement associées à la résistance : D461N, N499D, E501D, E501V et A504V ; les substitutions au niveau du codon 504, bien qu'elles soient considérées hors QRDR, représentent environ 20% des substitutions dans GyrB. Elles correspondent au remplacement de l'alanine par une valine ou plus rarement une thréonine. Seule la substitution A504V serait impliquée dans la résistance aux FQ³⁴⁶,
- trois sont considérées comme ayant un impact incertain : N499T, T500N et T500P.

De nombreuses mutations sont également catégorisées comme n'ayant aucun rôle dans la résistance aux FQ dans ce catalogue OMS, ce qui est très important pour éviter l'absence de prescription de ces molécules essentielles dans le traitement des TB MDR sur la base de la présence d'une mutation. Par exemple, la substitution GyrA A90G, qui n'est d'ailleurs jamais observée seule, mais toujours en association avec GyrA T80A³⁴⁷⁻³⁵⁰ n'est pas responsable de résistance aux FQ, mais même responsable d'une hypersensibilité aux FQ^{349,351}.

De nombreuses mutations rapportées dans des souches cliniques de *Mtb* résistantes aux FQ ne sont pas catégorisées dans le catalogue OMS. Cela s'explique par plusieurs éléments liés notamment à la méthodologie employée pour établir ce catalogue : (i) seules les mutations avec une fréquence allélique $\geq 90\%$ ont été incluses (or l'hétérorésistance est un phénomène fréquent dans la résistance aux FQ) ce qui entraîne une diminution de la sensibilité, (ii) les concentrations critiques employées entre 2014 et 2018 pour la lévofloxacine, et surtout pour la moxifloxacine, étaient trop élevées (mauvaise concordance phénotype/génotype)²²⁵ et (iii), certaines mutations confèrent des bas niveaux de résistance (CMI proches de l'ECOFF), ce qui pose problème pour la concordance avec la catégorisation par l'antibiogramme phénotypique²²⁵ (**Figure 25**).

Ainsi, certaines substitutions de GyrA ont été décrites très rarement et leur implication dans la résistance reste à démontrer : A74S, V77A, T80A, M81T, D89G, D89N, I92M, R98H, M99T, S104L, L109P, G112H, Q113L. Ce type de mutations est encore plus fréquent dans GyrB : R485C/H, S486F/Y, D488K, E493K, E496Q, E498K, G499E, G503S, S508A, G509A, G509C, S5112L, R521H, I524V, I532M, R531G, R534K, V535A, G551R, E555Q, D557H, P592S³⁴³.

2.8.4.2. Surexpression de systèmes d'efflux

Les pompes d'efflux sont des protéines transmembranaires qui permettent le transport de petites molécules à l'extérieur du périplasme et/ou du cytosol ¹⁰². L'implication de ces pompes dans la résistance acquise chez *Mtb* reste à l'heure actuelle débattue, les données expérimentales étant le plus souvent anciennes, peu nombreuses et parfois controversées ¹⁰⁰. De plus, quasiment toutes les études expérimentales n'ont été menées que chez *M. smegmatis*. Les pompes d'efflux suspectées comme impliquées dans la résistance aux FQ chez *Mtb* appartiennent à deux grandes familles : (i) ABC (*ATP-binding cassette*), qui sont régulées par l'hydrolyse de l'ATP, et (ii) MFS (*Major facilitator superfamily*), qui sont régulées par des modifications de conformation proton-induites ¹⁰².

2.8.4.2.1. Famille ABC

Parmi les pompes d'efflux suspectées comme impliquées dans la résistance aux FQ, les données les plus solides existent pour le transporteur de la famille ABC codé par l'opéron **Rv2686c-Rv2687c-Rv2688c**. Il a été montré expérimentalement que la surexpression de cet opéron chez *M. smegmatis* (introduction d'un plasmide multicopies portant l'opéron) entraînait une augmentation de la CMI de la ciprofloxacine d'un facteur 8 comparativement à la CMI de la souche contrôle (vecteur seul) ³⁵². La CMI de la ciprofloxacine était abaissée en présence de réserpine ou de vérapamil. Il s'agit à l'heure actuelle de la seule étude expérimentale concernant le mécanisme d'efflux médié par Rv2686c-Rv2687c-Rv2688c, aucune étude n'ayant été menée chez *Mtb*. Plus récemment, une étude de type GWAS portant sur 6465 isolats cliniques de *Mtb* a mis en évidence l'association de mutations dans Rv2688c avec la résistance aux FQ ²⁹⁴.

Un autre transporteur de la famille ABC, **DrrABC** est également possiblement impliqué dans la résistance aux FQ. L'expression de DrrABC de *Mtb* chez *M. smegmatis* entraîne une augmentation de la CMI de la norfloxacine d'un facteur 4, alors que l'adjonction d'un inhibiteur de pompe d'efflux, le vérapamil restaure les CMI obtenues avant expression de DrrABC ³⁵³. De plus, la même étude GWAS que celle citée ci-dessus a mis en évidence une fréquence élevée de mutations dans DrrA au sein de souches cliniques XDR ²⁹⁴.

Il a été suggéré que **PstB** aurait une fonction de pompe d'efflux ; chez *M. smegmatis*, son hyperexpression entraîne une élévation des CMI des FQ ³⁵⁴ et une moindre tolérance aux FQ a été observée chez une souche délétée de *pstB* ³⁵⁵.

2.8.4.2.2. Famille MFS

La protéine **LfrA** joue un rôle dans la résistance naturelle aux quinolones de *M. smegmatis*. Cette pompe qui appartient à la famille MFS, a été découverte chez une souche de *M. smegmatis* résistante à haut niveau à la ciprofloxacine (CMI augmentées d'un facteur 64) qui redevenait sensible en présence de vérapamil, inhibiteur connu de pompes d'efflux. L'introduction d'un plasmide multicopies portant le gène *lfrA* dans une souche sauvage de *M. smegmatis* confère à celle-ci un bas niveau de résistance aux FQ hydrophiles comme la ciprofloxacine (CMI augmentées d'un facteur 6), d'où le nom du gène, *lfrA* ("low-level of fluoroquinolone resistance"), mais pas aux FQ hydrophobes comme la sparfloxacine et l'acide nalidixique^{356,357}. Des homologues de LfrA ont été trouvés chez *Mtb*, mais l'implication dans la résistance aux FQ n'a pas été démontrée³⁵⁸.

La protéine **Rv1634** de *Mtb* qui appartient à la famille MFS est également suspectée d'être impliquée dans la résistance aux FQ. Lorsqu'elle est exprimée chez *M. smegmatis*, les CMI de la ciprofloxacine, de l'ofloxacine et de la norfloxacine sont augmentées d'un facteur 2 à 4³⁵⁹. Là aussi, il s'agit de la seule étude expérimentale, et encore une fois, cela n'a pas été exploré chez *M. tuberculosis*.

Enfin, le transporteur **Tap**, codé par Rv1258c, est également suspecté, mais pour le moment sans données très probantes ; son hyperexpression a été observée chez *Mtb* en présence d'ofloxacine³⁶⁰, mais aussi en présence d'éthambutol, d'isoniazide, de rifampicine et de streptomycine¹⁰⁰.

2.8.4.3. *Mutation dans EccC5*

EccC5, est un composant central de l'un des systèmes de sécrétion de type 7 (T7SS) de *Mtb*, ESX-5. ESX-5 n'est présent que chez les mycobactéries à croissance lente, et responsable de la sécrétion de nombreux substrats. Certains auteurs ont proposé un modèle dans lequel ESX-5 serait responsable de la sécrétion de plusieurs protéines formant des canaux ou des pores qui permettent ensuite l'absorption de nutriments essentiels et/ou d'autres métabolites à travers la membrane (Ates et al. 2015). Bien que l'impact d'une mutation de Ecc5 dans la résistance aux FQ a été montré expérimentalement par mutagenèse dirigée et échange allélique chez *Mtb* H37Rv, son rôle dans la résistance aux FQ chez les souches cliniques reste incertain. En effet, la première publication qui avait mis en évidence la substitution V762G dans EccC5 chez 26 souches cliniques résistantes aux FQ³⁶² était une erreur, puisque le reséquençage des souches

par la même équipe a révélé que la substitution observée était en fait un faux positif du *variant calling* ³⁶³. Les autres facteurs pouvant faire douter de l'impact de cette substitution dans la résistance aux FQ sont : (i) le WGS des mutants a révélé la présence résiduelle du gène *eccC5* WT, (ii) une seule autre étude a mis une évidence la substitution V1319F de *EccC5* dans des souches cliniques résistantes aux FQ, mais elle était toujours associée à des mutations dans l'ADN gyrase connues pour être impliquées dans la résistance ³⁶⁴.

2.8.4.4. Protéine à motifs répétés *MfpA*

La recherche de gènes qui seraient responsables d'une résistance de *M. smegmatis* aux FQ a permis la découverte du gène *mfpA* qui code pour une, la protéine *MfpA*. *MfpA* (*Mycobacterium fluoroquinolone resistance protein A*), protéine de 192 acides aminés, appartient à la grande famille des protéines à motifs pentapeptidiques répétés (PRP) ³⁶⁵.

Les PRP sont des protéines qui contiennent un motif répété [S,T,A,V][D,N][L,F][S,T,R][G]. Cette famille comprend des milliers de protéines présentes chez plus de 1500 organismes eucaryotes et procaryotes. Cette famille de protéines est impliquée dans la résistance aux FQ chez les bactéries à Gram négatif, *via* la famille de protéines appelées Qnr (pour quinolone résistance) dont il existe une grande variété de familles (QnrA, QnrB, QnrC, QnrD, QnrE, QnrS and QnrVC) ³⁶⁶.

Les Qnr protègent l'ADN gyrase de l'action des quinolones ^{367,368} en empêchant la liaison des topoisomérases de type 2 à l'ADN et donc la possibilité pour les quinolones de stabiliser un complexe ternaire enzyme-ADN-quinolone. La fonction biologique première et naturelle des Qnr n'est pas connue, mais trois théories ont été proposées. Selon la première théorie, les protéines Qnr seraient des antitoxines protégeant l'ADN gyrase et la topoisomérase IV de l'action délétère de toxines naturelles non identifiées à ce jour ³⁶⁹. La seconde théorie prête aux protéines Qnr un rôle similaire à la protéine *GyrI*, un régulateur de l'ADN gyrase également capable d'exercer un certain effet « antiquinolone » ^{370,371}. Enfin, la troisième théorie attribue aux protéines Qnr un rôle naturel dans la protection des bactéries contre des agents naturels occasionnant des dommages à l'ADN. Il a d'ailleurs été montré que certains plasmides porteurs de différents allèles du gène *qnrB* présentent un site de liaison de la protéine *LexA* impliquée dans la réponse SOS ³⁷².

Chez les mycobactéries, des données contradictoires ont été obtenues. Ainsi, chez *M. smegmatis* et *M. bovis* BCG, l'expression d'un plasmide contenant le gène *mfpA* entraîne une augmentation

des CMI des FQ la ciprofloxacine d'un facteur 4³⁷³. Une étude récente a mis en évidence que les CMI de toutes les FQ sont multipliées par un facteur allant de 2 à 8 lorsque *mfpA* est exprimé sur un plasmide chez *M. smegmatis*³⁷⁴.

Mtb possède une protéine ayant 67% d'homologie : la protéine MfpA_{Mt}³⁷⁵. MfpA_{Mt} est une protéine qui mime un fragment d'ADN par sa structure, ses dimensions mais également les charges présentes à sa surface³⁷⁵. Une analyse cristallographique a montré que MfpA_{Mt} forme un dimère, chaque monomère étant constitué d'une hélice β droite de 8 tours avec 20 résidus par tour, soit 4 pentapeptides formant chacun une face du tour, tous les résidus chargés étant tournés vers l'extérieur de l'hélice (**Figure 38**). Cependant, contrairement à ce qui a été observé pour les Qnr, MfpA_{Mt} ne protège pas l'ADN gyrase de *Mtb* de l'inhibition médiée par les FQ ; en revanche MfpA_{Mt} module l'activité de surenroulement négatif de l'ADN gyrase³⁷⁶.

Il a été montré plus tard que c'est l'interaction de MfpA avec une autre protéine, MfpB, ayant une activité GTPase qui permet la protection de l'activité de surenroulement de l'ADN gyrase de l'inhibition médiée par les FQ³⁷⁷. En fait, dans le travail de Montero et al, le plasmide utilisait contenait à la fois *mfpA* et *mfpB*³⁶⁵. La protection de l'ADN gyrase vis-à-vis de l'inhibition par les FQ pourrait ainsi être due à la capacité du complexe MfpA/MfpB d'empêcher la formation ou de déstabiliser le complexe ADN gyrase-ADN-FQ, entraînant ainsi un déplacement de la fluoroquinolone du site de liaison (**Figure 38**).

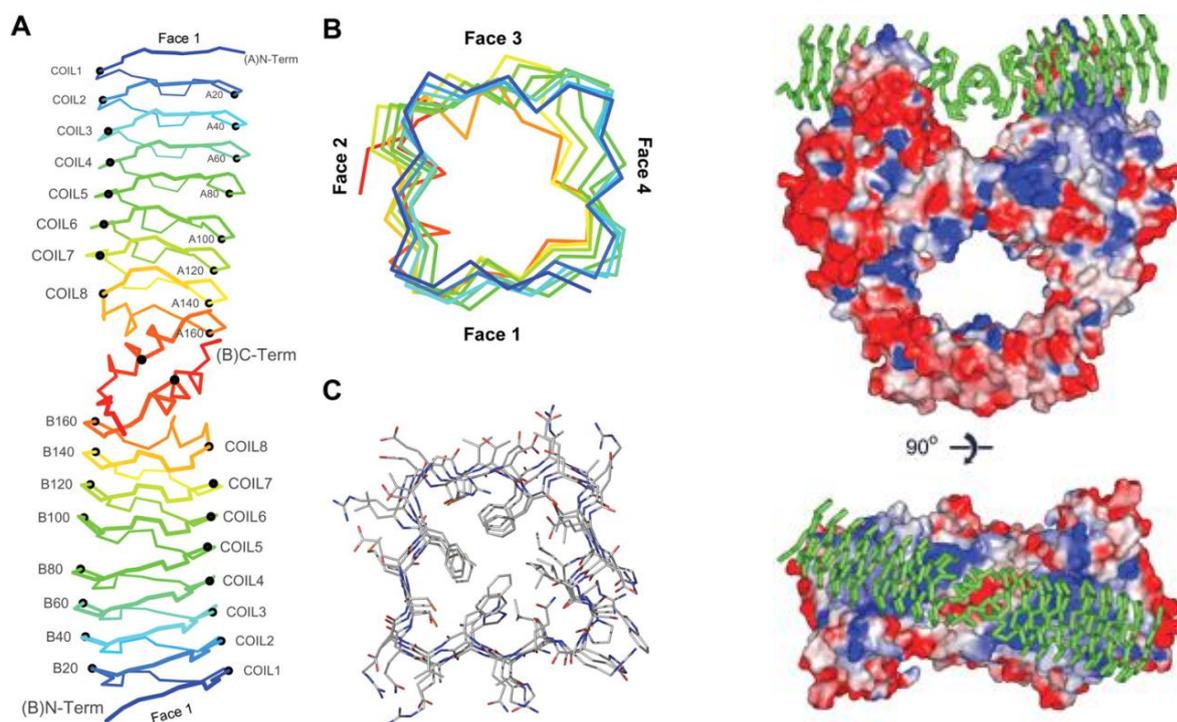


Figure 38- 1) Représentation schématique de la structure de MfpA. (A) Dimère de MfpA, chaque monomère étant représenté du bleu (partie N terminale) au rouge (partie C terminale). (B) Vue du dessus d'un monomère MfpA. (C) Représentation des résidus 2 à 81 (tours 1 à 4), (atome de carbone, gris; oxygène, rouge; azote, bleu; soufre, orange). 2) Modèle moléculaire de fixation du dimère MfpA (en vert) sur la partie N terminale de GyrA. Vues selon 2 orientations. D'après ³⁷⁵

2.8.5. Particularités du diagnostic de la résistance aux fluoroquinolones chez *M. tuberculosis*

Selon les études et les techniques de séquençage utilisées, une hétérorésistance a été observée chez 20 à 40% des souches cliniques de *Mtb* résistantes aux FQ ³⁷⁸⁻³⁸¹. La complexité de la détection de la résistance aux FQ *in vivo* a été également bien illustrée par les travaux réalisés par Bernard *et al.* ³⁸². La problématique de la détection de l'hétérorésistance est donc particulièrement prégnante pour les FQ.

Pour l'approche WGS, le seuil de détection est une véritable problématique car aucun consensus n'existe. La plupart des pipelines utilisés classiquement pour l'analyse WGS de *Mtb* ne permettent pas de détecter des variants à faible fréquence (microhétérorésistance). Dans une étude publiée en 2020 portant sur 42 isolats de *Mtb* résistants phénotypiquement aux FQ et 11 sensibles, Maruri *et al.* ont mis en évidence qu'avec un pipeline classique d'analyse du WGS,

31% des souches résistantes à l'ofloxacine n'avaient pas de mutation détectée dans *gyrA* et *gyrB*. En appliquant une méthode simple qui consiste à aller regarder « manuellement » les fréquences alléliques dans les fichiers VCF, Maruri *et al.* ont montré qu'il était possible d'augmenter considérablement la sensibilité de détection (passant de 69% à 86%) sans perdre en spécificité (la méthode phénotypique étant utilisée en référence), le tout étant de déterminer le juste seuil de fréquence allélique. Ce dernier a été déterminé dans cette étude à 2.5% *via* une approche par courbes ROC ³⁸³. Cette étude propose une approche intéressante pour la détection de variants minoritaires, cependant elle n'a été réalisée sur un faible nombre d'isolats et peu diversifiés en termes de lignée phylogénétique (lignée 4 principalement).

Non encore utilisée en routine, la PCR digitale (**décrite précédemment dans le § 1.4.4.2.3 Biologie moléculaire**) a été testée pour la détection de mutations dans *gyrA* entre autres dans des échantillons de crachats par Pholwat *et al.*. Cette étude a montré un seuil de détection de l'hétérorésistance de 1 mutant pour 1000 cellules (sensibilité atteinte si au moins 10^3 bacilles/mL dans l'échantillon, ce qui est en-dessous du seuil de l'examen microscopique) ³⁸⁴.

2.9. Résistance à la bédaquiline chez *M. tuberculosis*

2.9.1. Présentation générale de la bédaquiline

La bédaquiline (BDQ) a été identifiée après un criblage à haut débit de plus de 70 000 composés de la chimiothèque de Johnson&Johnson sur *M. smegmatis* dans le laboratoire de Janssen Pharmaceutica NV, sous le nom de code initial R207910. Le composé a été transféré pour développement clinique à Tibotec NV en 2004, sous la dénomination de TMC207. Lorsque la Food and Drug Administration (FDA) et l'European Medicine Agency (EMA) ont approuvé l'utilisation de la BDQ (respectivement en 2012 et 2014), aucun nouvel antituberculeux n'avait été mis sur le marché depuis plus de 40 ans.

La BDQ est le premier composé d'une nouvelle classe d'antimycobactériens, les **diarylquinolines**. Elle est commercialisée sous le nom de Sirturo® par Janssen Pharmaceuticals. Son nom chimique est 1-(6-bromo-2-méthoxy-quinoléine-3-yl)-4-diméthylamino-2-naphtalène-1-yl-1-phényl-butan-2-ol ; sa formule moléculaire est $C_{32}H_{31}BrN_2O_2$ et son poids moléculaire est de 555,51 daltons. La BDQ est un énantiomère pur à deux centres chiraux ³⁸⁵ (**Figure 39**).

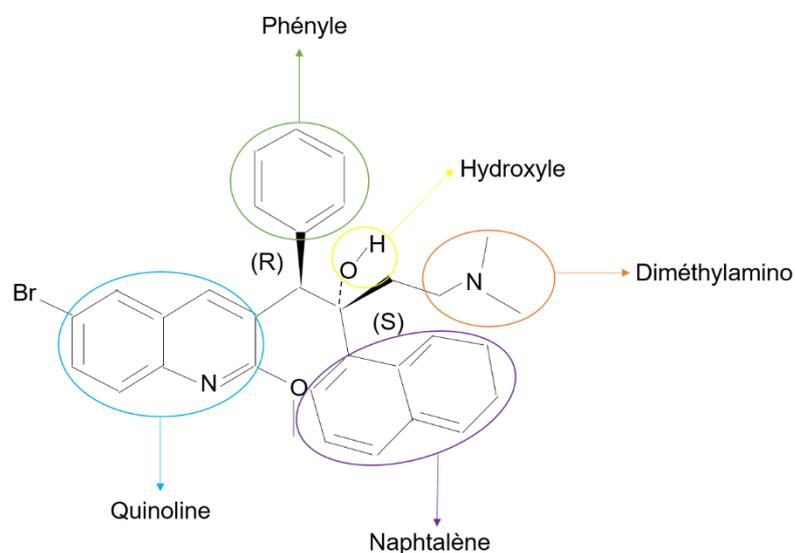


Figure 39- Structure chimique de la bédaquiline

Le cycle naphtalène et l'atome de brome (Br) sont responsables de la liposolubilité de la BDQ. La fonction diméthylamino est basique ($pK_a > 8$). Le noyau hétérocyclique central quinoline avec des chaînes latérales alcool et amine est responsable de l'activité antimycobactérienne ³⁸⁶.

2.9.2. Mécanismes d'action

La **BDQ agit en inhibant la synthèse de l'ATP**, processus crucial pour la croissance de *Mtb* et sa survie en phase de dormance^{387, 388}. Cette inhibition de la synthèse de l'ATP est due à la **fixation de la BDQ sur l'ATP synthase**³⁸⁹. L'**ATP synthase appartient à la chaîne respiratoire** (aussi dénommée chaîne de transport d'électrons de *Mtb*) et participe à la synthèse de l'ATP au cours d'une voie métabolique complexe, la phosphorylation oxydative, qui fait appel à d'autres protéines de cette chaîne de transport d'électrons. Au niveau de cette dernière, le NADH ou le succinate sont donneurs d'électrons pour des complexes membranaires protéiques ; ces complexes transfèrent ensuite les électrons à des oxydases ou des réductases grâce à la ménaquinone (transporteur d'électrons). Cette activité est couplée à la génération d'une force protomotrice *via* le transport de protons à travers la membrane. Cette force permet la rotation de l'anneau c de l'ATP synthase (cf. paragraphe suivant). Plusieurs antimycobactériens anciens (tels que la CFZ ou le pyrazinamide) ou plus récents (tels que le Q203 ou le SQ109) agissent en inhibant différentes protéines de la chaîne respiratoire (**Figure 40**)³⁹⁰.

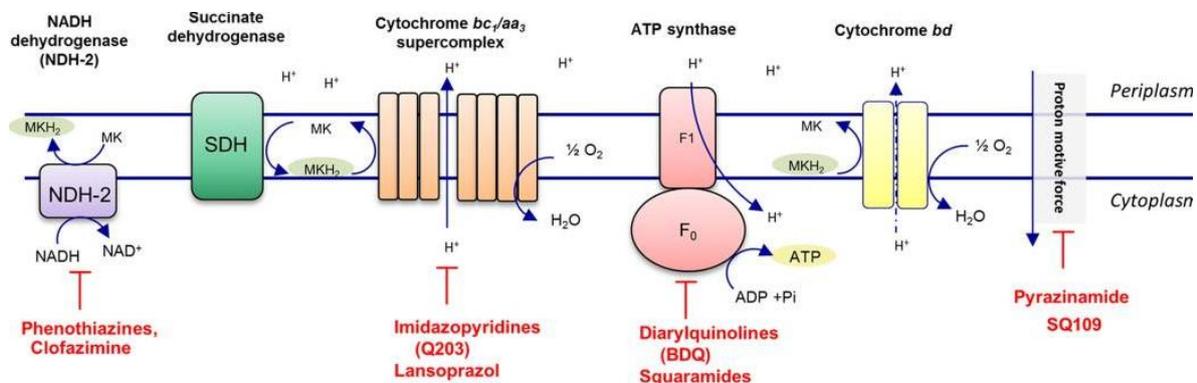


Figure 40- Phosphorylation oxydative et chaîne respiratoire chez *Mtb*. Les électrons issus du NADH permettent la réduction du pool de ménaquinone (MK/MKH₂) via la NADH déshydrogénase (NDH-2). Le pool de ménaquinone peut également être réduit via l'action de la succinate déshydrogénase (SDH). A partir du pool de ménaquinone, les électrons peuvent ensuite être transférés au super complexe cytochrome *bc₁/aa₃*, qui permet le transfert des électrons à l'oxygène. De façon alternative, l'oxygène peut être réduit par le cytochrome *bd*, directement à partir du pool de ménaquinone. Au cours du transport des électrons tout au long de la chaîne respiratoire, des protons sont transportés à travers la membrane, entraînant la force protomotrice. L'énergie générée par cette force protomotrice est employée par l'ATP synthase pour générer l'ATP. D'après³⁹⁰.

L'activité bactéricide de la BDQ est retardée ; en effet, la mort cellulaire ne survient pas immédiatement après la déplétion en ATP ³⁹¹. Des études transcriptomiques, protéomiques et de métabolomique ont montré qu'après l'inhibition de la synthèse de l'ATP engendrée par la fixation de la BDQ à l'ATP synthase, une cascade complexe d'évènements intracellulaires se produisait. Ainsi, Koul *et al.* ont mis en évidence chez *Mtb* que des voies de biosynthèse cellulaires majeures étaient sous-régulées sous l'action de la BDQ, telles que la synthèse des acides mycoliques, des protéines ou encore de l'ADN, de façon dose-dépendante, et ce, sans pour autant cibler l'un des acteurs de ces processus ³⁹¹. De plus, l'étude métabolomique de Wang *et al.* a montré chez *Mtb* que l'action de la BDQ avait des effets sur le métabolisme du nitrogène, et plus particulièrement l'activité de la glutamine synthétase (enzyme très sensible à la concentration d'ATP intracellulaire).

L'ATP synthase est une enzyme essentielle pour la croissance de *Mtb* ³⁹². Sa synthèse est codée par les huit gènes (*atpA – atpH*) de l'opéron *atp*. L'ATP synthase est une protéine transmembranaire qui synthétise l'adénosine triphosphate (ATP) à partir de l'adénosine diphosphate (ADP) et du phosphate inorganique (Pi) ($ADP + Pi = ATP$). L'ATP synthase est composée de deux moteurs rotatifs complémentaires, F_0 (*oligomycin binding domain*) et F_1 . La partie F_0 est transmembranaire et est composée de 3 sous-unités (a, b et c). La sous-unité oligomérique c'est la partie mobile qu'on appelle anneau rotor. La sous-unité a est une partie fixe appelé le stator. La sous-unité b forme un bras qui maintient les deux parties F_0 et F_1 ensemble. La partie F_1 est cytoplasmique et est composée de 5 sous-unités (α , β , γ , δ , ϵ). Trois sous-unités β et 3 sous-unités α sont positionnées en alternance et forment un cylindre. Les sous-unités β sont catalytiques et responsables de la synthèse d'ATP et les sous-unités α sont structurales. Les sous-unités γ et δ lient F_1 à F_0 . La sous-unité ϵ a un rôle dans la régulation de l'ATP synthase ³⁹³ (**Figure 41**).

La force protomotrice permet le fonctionnement de l'ATP synthase. Le proton entre dans la partie F_0 par la sous-unité a et sort dans le cytoplasme par la sous-unité c. Cela entraîne une rotation de l'anneau rotor, puis la rotation de la tige γ provoquant le déplacement de l'ADP et de la molécule Pi vers les sous-unités α et β de la partie F_1 pour produire l' ATP ³⁹⁴.

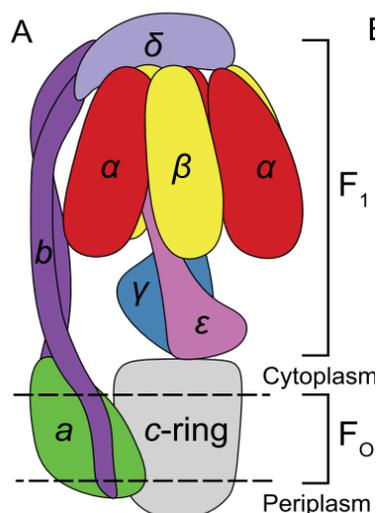


Figure 41- Représentation schématique de l'ATP synthase. D'après ³⁹³

L'anneau rotor, codé par le gène *atpE*, et la sous-unité ϵ de l'ATP synthase sont la cible de la BDQ ^{395,396}. La liaison de la BDQ à l'anneau rotor entraîne le blocage de sa rotation, tandis que la liaison de la BDQ à la sous-unité ϵ inhibe la propagation de la rotation de la sous-unité c vers $\alpha_3\beta_3$ de F₁ pour la synthèse de l'ATP.

Des données de docking avec la sous-unité c de *Mtb* ³⁹⁷ et de cristallographie réalisées à partir de l'anneau c de *Mycobacterium phlei* ^{398,399}, ont montré que la BDQ se fixerait à la sous-unité c au niveau des acides aminés Asp28, Glu61, Tyr64, Leu59, Ala63 et Ile66. Plus récemment, Guo *et al.* ont décrit deux nouveaux sites de fixation pour la BDQ chez *M. smegmatis*. En réalisant une expérience de saturation de l'ATP synthase avec la BDQ, il a été mis en évidence que sept molécules de BDQ se fixent autour de l'anneau c (**Figure 42**) : cinq molécules de BDQ sont fixées uniquement sur la sous-unité c, sur les sites précédemment décrits (**Figure 42** « *c-only site* » en jaune) et deux molécules sont fixées sur des nouveaux sites partagés entre la sous-unité a et la sous-unité c au niveau de l'entrée (**Figure 42** « *leading site* » en rose) et de la sortie du proton (**Figure 42** « *lagging site* » en bleu). La découverte de ces nouveaux sites de liaison explique l'activité de la BDQ à faible concentration, par l'inhibition de la force protomotrice ³⁹⁹.

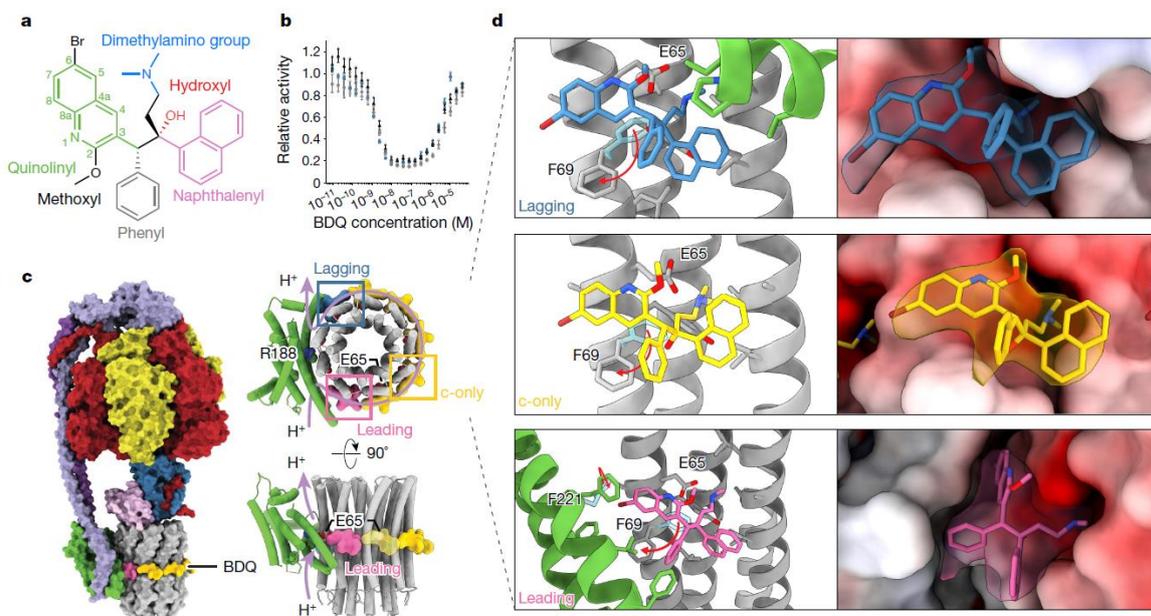


Figure 42- Fixation de la BDQ sur l'ATP synthase de *M. smegmatis*. Structure tridimensionnelle de l'ATP synthase de *M. smegmatis* saturée par la BDQ. La BDQ est fixée sur cinq sites de l'anneau c « *c-only site* » en jaune, un site au niveau de l'entrée du proton « *leading site* » en rose et un site au niveau de la sortie du proton « *lagging site* » en bleu. Le sens du flux de protons et de la rotation de l'anneau c sont indiqués par des flèches violettes. L'anneau c est en gris et la sous-unité a est en vert. D'après ³⁹³

2.9.3. Activité de la bédaciline sur *M. tuberculosis*

2.9.3.1. Activité *in vitro*

Le **spectre bactérien d'activité étroit** de la bédaciline est lié à une faible homologie entre les gènes *atpE* bactériens. C'est aussi ce qui explique la faible affinité de la BDQ pour l'ATP synthase mitochondriale humaine ; il faudrait une dose de BDQ 20 000 fois plus élevée que celle nécessaire pour inhiber la production d'ATP chez *M. smegmatis* dans les mitochondries humaines ^{400,401}.

Vis-à-vis de *Mtb*, la **CMI** de la BDQ est de 0,03 à 0,06 µg/mL pour des souches sauvages sur les milieux 7H10, 7H11 et 7H9 (Resazurin Microtiter Assay (REMA) et broth microdilution (BMD)). On observe un décalage des CMI en milieu MGIT et LJ avec une CMI médiane de 0,25 µg/mL et 13 µg/mL, respectivement. Ceci est en partie dû à la propriété de la BDQ de se lier aux protéines (telle que l'albumine), ainsi qu'au polypropylène. En effet, l'albumine est présente dans le milieu LJ et le polypropylène est le composé utilisé pour la fabrication des tubes MGIT ⁴⁰². Ainsi, pour déterminer les CMI de la BDQ par microdilution, il faut employer préférentiellement des plaques en polystyrène.

Les **CC** recommandées par l'OMS (**Tableau 5**- Concentrations critiques des antituberculeux définies par l'OMS selon le milieu de culture. D'après ^{225,178}**Tableau 5**) sont concordantes avec les ECOFF de la BDQ (0.25 µg/mL sur milieu solide (7H10 et 7H11) et de 0.12 µg/mL en milieu 7H9) déterminées dans l'étude DREAM (*Drug Resistance Emergence Assessment in Multidrug-resistant tuberculosis*) dans laquelle les CMI de 5036 souches cliniques de TB MDR collectées dans 11 pays (patients non traités par BDQ) sur une période de 5 ans (2015-2019) ont été déterminées ⁴⁰³.

La BDQ est **bactéricide** vis-à-vis de *Mtb*, que les bacilles soient en phase de croissance ou non. La CMB est de 2µg/mL en aérobiose et de 1µg/mL en anaérobiose (modèle de Wayne) après cinq jours d'exposition à la BDQ. Une activité résiduelle de l'ATP synthase est essentielle pour la survie des bacilles dormants expliquant l'activité bactéricide de la BDQ sur ces mêmes bacilles ³⁸⁷. En effet, il a été montré *in vitro* que la BDQ avait une forte activité sur les bacilles dormants, voire même que cette activité était supérieure à celle contre les bacilles en phase de réplication ³⁸⁷. Cela est corrélé à l'observation de l'activité stérilisante de la BDQ dans des modèles murins d'infection tuberculeuse ⁴⁰⁴, et à l'accélération du délai de négativation des cultures observée chez des patients traités avec de la BDQ ⁴⁰⁵ (cf paragraphes suivants).

2.9.3.2. *Activité in vivo dans des modèles murins de tuberculose*

La BDQ a été largement étudiée dans des modèles murins d'infection tuberculeuse. À la posologie de 25 mg/kg (équivalent à la posologie recommandée chez l'homme), la BDQ était bactéricide et significativement plus active que l'isoniazide ³⁸⁵. Des études combinées ont démontré que la BDQ augmentait l'activité bactéricide et stérilisante du traitement standard permettant d'envisager de réduire la durée du traitement de la tuberculose à bacilles sensibles ou résistants ^{385,406}. Des combinaisons contenant de nouveaux antituberculeux ont également été testées, montrant la possibilité de développer des schémas de courte durée contenant de la BDQ qui pourraient être très efficaces pour le traitement des TB à bacilles sensibles ou résistants ^{407,408}. Par exemple, l'association BDQ-PZA-CFZ permettait une négativation des cultures après deux mois de traitement ⁴⁰⁹.

2.9.3.3. *Utilisation de la bédaquiline dans le traitement de la tuberculose chez l'homme*

Des essais cliniques avaient permis de mettre en évidence que l'ajout de la BDQ permettait d'obtenir de façon significative : (i) une négativation des cultures plus rapide, (ii) un taux de conversion des cultures plus important, et (iii) un taux de guérison plus élevé ^{410, 411}. L'efficacité des combinaisons contenant de la BDQ pour le traitement des TB MDR a été confirmée dans différents contextes épidémiologiques ⁴¹²⁻⁴¹⁷ et une méta-analyse qui a conduit l'OMS à classer la BDQ parmi les antibiotiques recommandés en première intention pour le traitement des TB MDR ^{418,419}.

Plus récemment, des combinaisons de BDQ avec de nouveaux antituberculeux tels que le délamanide et le prétomanide ont fait l'objet d'évaluations ^{420, 324}, suivies de l'émission de nouvelles recommandations par l'OMS ⁴²¹. Le traitement combinant BDQ, prétomanide, linézolide, associée ou non à une FQ (Nix-TB), est devenu le traitement de référence des TB MDR et XDR ; il permet de guérir 90% des patients en six mois, mais au prix d'une toxicité non négligeable ⁴²⁰. Des traitements associant la BDQ et d'autres nouveaux antituberculeux, ne contenant pas d'isoniazide ni de rifampicine, permettant de traiter les TB à bacilles sensibles et/ou résistants sont en cours d'évaluation (SimpliciTB et TB-PRACTECAL) (<https://www.newtbdrugs.org/pipeline/trials>).

2.9.4. Mécanismes d'acquisition de la résistance

Deux phénomènes inquiétants ont émaillé la mise sur le marché de la BDQ : les **échecs de traitement** et des **souches résistantes à la BDQ chez des patients jamais traités** ont été rapportés rapidement ^{422,423}.

Le premier cas d'échec thérapeutique chez l'homme avec la BDQ a été rapporté chez un réfugié tibétain qui, après avoir été traité entre autres avec de la BDQ pendant six mois, présentait un échec avec isolement d'une souche résistante à la BDQ ⁴²².

Une revue de la littérature publiée récemment incluant 13 études (11 études de cohorte et deux essais cliniques randomisés) a mis en évidence que 2.8% (IQR 1.9%–3.3%) et 4.2% des patients (IQR 1.6%–5.9%) présentaient une **résistance primaire** à la BDQ, respectivement phénotypique et génotypique; tandis que la résistance secondaire, phénotypique et génotypique, était de 2.2% (IQR 1.1%–4.6%) et 4.4% (IQR 1.8%–5.8%), respectivement. Une des

hypothèses avancées pour expliquer la fréquence élevée de résistance primaire était la pression de sélection liée à l'utilisation thérapeutique de la CFZ à partir des années 1950s, bien que cette molécule ait davantage été employée dans le traitement de la lèpre ⁴²⁴. Cependant, van Dorp *et al.* ont montré que l'émergence des RAV était très antérieure à l'utilisation de tout antibiotique ⁴²⁴. Cependant, la pompe d'efflux MmpS5-MmpL5 n'a pas que la BDQ comme substrat et l'émergence de ces RAV dans *Rv0678* pourraient s'expliquer par des facteurs de stress environnementaux.

Les mécanismes de résistance à la BDQ chez *Mtb* sont mal encore mal connus ; différents mécanismes ont été proposés, certains étant impliqués dans la résistance croisée avec la CFZ et les azolés ⁴²⁵ :

- **modification de la cible (*atpE*)**,

- **défaut d'accumulation de l'antibiotique**, due à un **efflux (*Rv0678*)**. Ce mécanisme n'est pas spécifique de la BDQ, il confère une résistance croisée avec la CFZ et les azolés ; dépendant néanmoins de la nature de la mutation ^{426,427,428}. Les azolés, dont l'éconazole, sont une classe d'agents antifongiques qui ciblent le cytochrome P450 Cyp51 des levures et des champignons, dont certains ont une activité anti-mycobactérienne. Ainsi, l'éconazole réduit la charge bactérienne de *Mtb* de 90% dans le poumon et la rate de souris infectées avec un inoculum de 10^7 bacilles, après huit semaines de chimiothérapie, par rapport aux témoins non traités ⁴¹⁸. Pour caractériser les mutants spontanés résistants aux azolés, Milano *et al.* les a isolés par sélection directe sur des milieux solides contenant du bifonazole. La fréquence d'apparition de ces mutants était de 5×10^{-7} . Les mutations isolées étaient dans le gène *Rv0678* et leur CMI était supérieure à $64 \mu\text{g/mL}$ soit plus de 8 fois supérieure à la CMI d'une souche sauvage ($8 \mu\text{g/mL}$).

- **mécanisme(s) inconnu(s) lié(s) à des mutations dans *pepQ* et *Rv1979c***. Le gène *pepQ* est également impliqué dans la résistance croisée entre BDQ et la CFZ.

2.9.4.1. *Modification de la cible : mutations dans atpE*

Les mutations dans le gène *atpE* ont été les premières décrites. Elles ont été découvertes dans les premières études *in vitro* visant à déterminer la cible de la BDQ en sélectionnant des mutants résistants à la BDQ ³⁸⁵. Les mutations dans *atpE* sont associées à une augmentation importante des CMI, d'un facteur 8 à 133 relativement à la CMI d'une souche sauvage ⁴²⁷.

Les mutations dans *atpE* sont regroupées dans une région *hotspot* autour du résidu Glu61 qui est le site de liaison de la BDQ. Les résidus Asp28, Glu61, Ala63 et I66, sont les plus fréquemment affectés ⁴²⁹. Des mutations sur ces résidus sont retrouvées aussi bien *in vitro* que chez l'homme ⁴³⁰. Les mutations dans cette région *hotspot* perturbent les interactions clés avec la BDQ et entraînent une réduction de l'affinité de liaison avec l'ATP synthase ⁴²⁹ (**Figure 42**).

Les mutations dans *atpE* sont rarement décrites dans des souches cliniques ^{430,199} ce qui suggère un impact sur le fitness de ces souches supérieur chez l'hôte à ce qui se produit *in vitro* ⁴³¹.

2.9.4.2. Efflux : mutations dans *Rv0678*

En 2014, Hartkoorn a décrit pour la première fois une mutation du gène *Rv0678* conférant la résistance croisée entre la CFZ et la BDQ ⁴²⁶. La même année, Andries *et al.* ont confirmé l'implication de ce gène dans la résistance à la BDQ ⁴²⁷.

Le gène *Rv0678* code le **régulateur transcriptionnel MmpR de la pompe d'efflux MmpS5-MmpL5**. Cette protéine appartient à la famille des répresseurs de résistance aux antibiotiques multiples (*multiple antibiotic resistance repressor* - MarR) et contrôle le niveau de transcription d'une pompe d'efflux ⁴³². Cette pompe d'efflux est composée de deux protéines, MmpS5 (*mycobacterial membrane protein small*) et MmpL5 (*mycobacterial membrane protein large*) et appartient à la superfamille résistance-nodulation-division (RND). Le complexe MmpS5-MmpL5 est impliqué dans l'exportation de la mycobactine à travers la membrane cellulaire. La mycobactine est un sidérophore, facteur de virulence permettant la captation du fer extracellulaire ⁴³³.

MmpR se lie à la région intergénique située entre les gènes *Rv0678* et *mmpS5*. MmpR se lie aussi aux promoteurs des gènes *mmpS4-mmpL4* et *mmpS2-mmpL2*, régulant le niveau de transcription de ces pompes d'efflux ⁴³². Cette liaison entraîne une diminution de l'expression des protéines MmpS5, MmpL5 et MmpR. En réponse à un stimulus inconnu, le régulateur se détache de l'ADN et la transcription peut reprendre. Si la protéine MmpR produite n'est pas fonctionnelle, alors la transcription des gènes *mmpS5*, *mmpL5* et *Rv0678* sera augmentée. Si la protéine MmpR est produite mais avec des modifications fonctionnelles alors sa capacité de liaison à l'ADN peut être affectée. La conséquence finale sera une augmentation du niveau de transcription de MmpS5-MmpL5, permettant un efflux plus important de la BDQ ⁴²⁷ (**Figure 43**).

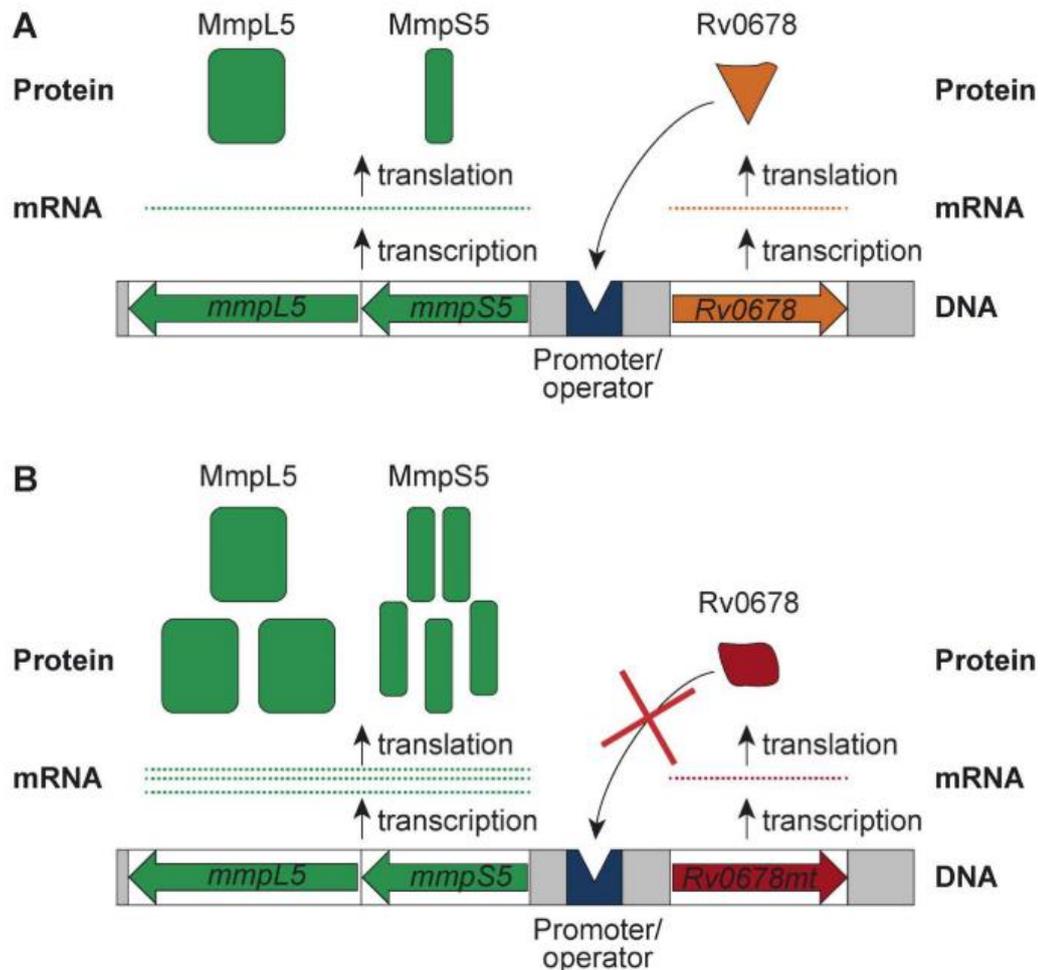


Figure 43- Régulation de la pompe d'efflux MmpS5-MmpL5 par son répresseur Rv0678 (*Rv0678*). A. Rv0678 est fonctionnel et la pompe d'efflux est réprimée. B. Le gène *Rv0678* est muté, le répresseur ne peut plus se fixer et la pompe d'efflux est exprimée ⁴²⁷.

Les mutations dans *Rv0678* sont associées à une faible augmentation de la CMI : augmentation d'un facteur de 2 à 8 par rapport à la CMI d'une souche sauvage ⁴²⁷.

Contrairement aux mutations dans le gène *atpE*, les mutations dans le gène *Rv0678* sont fréquemment trouvées dans les souches cliniques, phénotypiquement résistantes ou non à la BDQ ¹⁹⁹. Une revue publiée en 2020 incluant 54 études montrait que les mutations nucléotidiques aux positions 192-198 entraînant un décalage du cadre de lecture étaient les plus fréquentes. Ce type de mutation était trouvé chez 4% (52/1373) des souches cliniques de *Mtb* avant exposition à la BDQ ou à la CFZ ¹⁹⁹. Chez certains de ces isolats, des mutations de type *frameshift* dans *mmpL5* ont également été mises en évidence, entraînant possiblement une perte de fonction de la pompe, expliquant ainsi l'absence d'élévation significative de la CMI de la BDQ.

Ces données montrent que les méthodes génotypiques et phénotypiques présentent des différences dans la prédiction de la résistance⁴³⁴ qui s'explique notamment par le fait que toutes les mutations détectées dans *Rv0678* ne confèrent pas une résistance phénotypique⁴³⁵. Une autre étude publiée récemment sur la résistance primaire à la BDQ chez les souches MDR suggère que les mutations dans *Rv0678* ne sont pas un marqueur prédictif robuste de la résistance à la BDQ⁴³⁶.

2.9.4.3. Mutations dans le gène *pepQ*

Le gène *pepQ* (*Rv2535c*) code l'aminopeptidase PepQ spécifique à la proline. Cette protéine est composée de 372 acides aminés et possède deux domaines : un domaine α/β N-terminal de ~100 acides aminés et un domaine peptidase C-terminal de ~250 acides aminés. Cette prolidase est active sur les substrats qui ont l'acide aminé proline en position terminale, quel que soit l'acide aminé précédent⁴³⁷. La fonction exacte de PepQ n'est pas connue mais elle ne semble pas être une cible ou une enzyme activatrice pour la BDQ ou la CFZ.

Des mutations dans le gène *pepQ* ont été décrites deux fois seulement dans des souches résistantes à la BDQ et à la CFZ, *in vitro* et dans un modèle murin⁴³⁷. Ces mutations provoquant une augmentation faible de la CMI de la BDQ (4 fois celle d'une souche sauvage) responsable d'une diminution d'efficacité de la BDQ dans un modèle murin de TB⁴³⁷. Le mécanisme par lequel *pepQ* est responsable de la résistance à la BDQ pourrait être de l'efflux⁴³⁷.

2.9.4.4. Mutations dans le gène *Rv1979c*

Des mutations dans *Rv1979c*, qui code un transporteur non caractérisé (possiblement une perméase), ont été rapportées, mais sans augmentation significative de la CMI de la BDQ dans la grande majorité des cas⁴³⁰. En revanche, certaines mutations dans *Rv1979c*, telles que la substitution V52G, ont été décrites chez des souches cliniques résistantes à la CFZ mais sensibles à la BDQ¹⁹⁹.

2.9.5. Difficultés du diagnostic génotypique de la résistance à la bédaquiline

De façon intéressante, **aucune mutation n'est catégorisée comme impliquée dans la résistance à la BDQ dans le catalogue OMS des mutations** ^{291, 206}, ainsi, les seulement 11 mutations citées, dans *MmpL5* et *Rv1979c* sont-elles toutes considérées comme non impliquées dans la résistance ²⁹¹.

La BDQ illustre parfaitement la difficulté du diagnostic de la résistance. Le fait qu'aucune mutation rapportée ne répond aux critères d'association avec des phénotypes résistants à la BDQ ou à la CFZ tels que définis dans le catalogue de l'OMS est dû à plusieurs facteurs :

- la plupart des mutations dans *Rv0678* et *atpE* sont rares, bien que certaines soient fréquentes dans certains contextes ⁴³⁸,
- la diversité et la dispersion tout le long du gène des mutations identifiées dans *Rv0678* complexifie l'évaluation de leur impact sur la résistance à la BDQ. En effet, toutes les mutations détectées dans *Rv0678* ne confèrent pas une résistance phénotypique ⁴³⁵,
- les mutations dans *Rv0678* sont souvent associées à de l'hétérorésistance avec une fréquence allélique < 90 %, ce qui les excluent de l'analyse réalisée par l'OMS ^{291, 206} ¹²⁷. On estime à plus de 60% la fréquence d'hétérorésistance pour la BDQ ⁴³⁵. Ce chiffre n'est peut-être que la partie émergée de l'iceberg, compte-tenu des difficultés de détection de l'hétérorésistance. Pour les raisons que nous avons détaillées précédemment (§ 2.7.2.1 Principes et écueils communs aux méthodes génotypiques), ceci est un frein majeur au diagnostic optimal de la résistance à la BDQ. Une autre observation intéressante des travaux de Nimmo *et al.* est que les RAV observés dans *Rv0678* ne se fixaient pas le plus souvent, pour une raison biologique inconnue.
- certaines mutations *Rv0678* entraînent des CMI proches de la CC, avec pour conséquences des résultats d'antibiogrammes phénotypiques variables ^{240, 438, 291},
- la plupart des données phénotypiques publiées proviennent de l'étude CRyPTIC qui est basée sur des CC en cours d'évaluation et qui pourraient être révisées à la hausse ou à la baisse,
- l'épistasie peut être un facteur confondant. Ainsi, la présence de mutations dans l'opéron *mmpL5-mmpS5* entraînant un impact fonctionnel important sur la pompe *MmpS5-MmpL5* peuvent être responsables de l'absence d'impact sur la résistance à la BDQ de mutation dans *Rv0678* ¹⁹⁹. Cela complique la prédiction de la résistance à la BDQ basée

uniquement sur le séquençage de *Rv0678*, comme cela est le cas avec le Deeplex Myc-TB®. La recherche de mutation concomitante dans l'opéron *mmpL5-mmpS5* serait pertinente pour aider à évaluer l'impact dans la résistance à la BDQ d'un RAV dans *Rv0678* ⁴³⁹.

Ces difficultés de diagnostic de la résistance à la BDQ sont illustrées dans un cas clinique dont j'ai participé à la rédaction de la publication (**Publication 8**) ⁴⁴⁰. Chez un patient Géorgien pris en charge pour une TB MDR cavitaire, une hétérogénéité et une variabilité dans le temps des mutations dans *Rv0678* associées à une variabilité des CMI de la BDQ, comme déjà décrit, ont été observés ⁴³⁵. De plus, la mutation dans *atpE* (I66M), qui était présente dans le 2^{ème} isolat de façon hétérogène à 63% (M3 de traitement) mais pas dans le premier isolat (antérieur à l'initiation du traitement), n'a plus été trouvée dans le troisième isolat (M5 de traitement), semblant ne pas se fixer dans la population bacillaire, ce qui ne va pas dans le sens du schéma chronologique d'acquisition de la résistance à la BDQ proposé en 2019 par Ismail *et al* ⁴⁴¹.

2.10. Traitement des tuberculoses à bacilles résistants

Les recommandations de traitement des TB MDR proposé par l'OMS sont directement déduites des résultats de la méta-analyse de Ahmad *et al.*, en particulier de sa hiérarchisation des antituberculeux de seconde ligne en fonction de leur efficacité clinique (**Tableau 3**) ^{89,442}. Le traitement repose sur un régime d'au moins cinq molécules administrées pendant 18 à 20 mois (« *long-regimen* »). Dans la TB MDR, une importante réduction de la durée de traitement de 20 à 9 mois a pu être apportée par le régime dit « Bangladesh » associant gatifloxacine (ou moxifloxacine), CFZ, éthambutol, pyrazinamide avec en plus de fortes doses d'isoniazide, de la kanamycine et du prothionamide durant les 4 premiers mois de traitement ⁴⁴³.

L'efficacité limitée, les effets secondaires fréquents et potentiellement invalidants ainsi que la longue durée du traitement justifie la recherche de nouveaux régimes pour traiter les TB à bacilles résistants. Ces régimes visent notamment à réduire la durée du traitement et à être exclusivement à administration orale, afin de favoriser l'observance des patients et de limiter l'exposition aux antituberculeux et donc la toxicité. Trois nouvelles molécules orales, ayant indépendamment montré leur efficacité dans les TB MDR (le **linézolide**, le **BDQ** et le **prétomanide**), offrent l'opportunité de constituer un régime antituberculeux MDR/XDR qui contrairement aux précédents, ne contient que des molécules administrées par voie orale. Dans l'étude non comparative Nix-TB, ce régime administré pendant 26 semaines a permis de guérir

90% des patients atteints de tuberculose XDR ou MDR en échec de traitement, au prix d'une neurotoxicité importante (neuropathies périphériques) attribuées aux fortes doses de linézolide (1200 mg/jour) ⁴⁴⁴. Une nouvelle étude (ZeNix) a évalué l'efficacité de ce régime avec une durée d'exposition au linézolide limitée à 9 semaines ⁴²⁰.

De ces essais découlent de nouvelles recommandations concernant le traitement de la tuberculose MDR chez l'adulte émises dans un premier temps sous forme d'une *short communication* par l'OMS en mai 2022 ⁴²¹, et qui sont amenées à être consolidés dans des recommandations. Ces nouvelles recommandations se basent sur les données issues des études TB-PRACTECAL et ZeNix ⁴²⁰ qui ont évalué les nouveaux régimes thérapeutiques **BPaLM et BPaL** comprenant la BDQ, le prétomanide et le linézolide, avec ou sans moxifloxacine, avec une durée de traitement réduite à six mois. Effectivement, en cas de résistance documentée aux FQ, le régime BPaL (sans moxifloxacine), doit être employé. **Ces nouveaux régimes sous-tendent la nécessité d'un diagnostic optimal de la sensibilité à ces molécules, notamment aux FQ.** On peut se questionner sur le positionnement de ces nouveaux régimes thérapeutiques dans les pays n'ayant pas les ressources suffisantes pour bénéficier de moyens diagnostiques appropriés, qu'ils soient génotypiques ou phénotypiques.

3. Virulence de *M. tuberculosis*

Contrairement à d'autres bactéries pathogènes strictes qui produisent des toxines spécifiques ou un unique facteur de virulence, *Mtb* n'a pas un profil de virulence « classique ». Au contraire, *Mtb* possède la capacité de persister tout au long de l'infection et cela, en dépit d'une réponse immunitaire de l'hôte soutenue et de longue durée. **Les mécanismes de virulence de *Mtb* sont donc davantage des mécanismes de défense mis en place le rendant capable de manipuler la réponse de l'hôte à son avantage et ainsi d'échapper au système immunitaire.**

Bien que la TB soit le résultat d'une interaction de *Mtb* avec l'hôte, faisant intervenir des facteurs liés à ce dernier et au bacille tuberculeux il a été choisi dans ce manuscrit de ne décrire que les mécanismes liés à *Mtb*. Ce choix a été fait par souci de concision et du fait de la complexité des mécanismes immunologiques que mes compétences ne me permettent pas de maîtriser.

Dans les chapitres ci-dessous **seront détaillés les principaux mécanismes d'échappement du système immunitaire, ainsi que les facteurs bactériens principaux connus à ce jour**, à savoir (i) les systèmes de sécrétion de type VII (SST7), (ii) les lipides entrant dans la composition de la mycomembrane, et (iii) les protéines de la famille des PE/PPE⁴⁴⁵.

3.1. Mécanismes d'échappement du système immunitaire de *M. tuberculosis*

Mtb a développé de nombreuses stratégies d'adaptation lui permettant de transformer le macrophage, cellule classiquement dédiée à la défense de l'hôte, en une niche favorable à sa survie. Bien que d'autres cellules immunitaires interagissent avec *Mtb*, le macrophage joue un rôle clé dans le développement ultérieur de l'infection et dans l'initiation et l'orientation de la réponse immunitaire. Lors du premier contact entre *Mtb* et le macrophage, un dialogue complexe se met en place qui va conditionner la survie de *Mtb* au sein du macrophage. *Mtb* est ainsi capable d'interférer avec la maturation du phagosome pour prévenir la formation d'un phagolysosome après avoir été phagocyté par le macrophage, depuis l'étape initiale de reconnaissance du bacille jusqu'à la mort du macrophage.

Les principales étapes et facteurs bactériens impliqués dans ces mécanismes d'échappement sont résumés ci-après ⁴⁴⁵ :

- **l'inhibition de la maturation du phagosome.** Différentes protéines bactériennes sont capables de détourner les voies de signalisation de cette maturation, en affectant le recrutement et la fonction des petites GTPases Rabs, de leur effecteurs (phosphatidylinositol 3-kinases et EEA1), des protéines SNAREs (*Soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment protein receptors*) comme la Syntaxin 6, et la signalisation Coronine-1–calcineurine. La fusion du phagosome avec les lysosomes peut être inhibée par le recrutement et le maintien de la coronine-1 (ou TACO) à la membrane du phagosome. Cette protéine permet d'activer la calmoduline dépendante du Ca²⁺ qui inhibe la fusion des lysosomes avec le phagosome. Enfin, des composés lipidiques de l'enveloppe mycobactérienne sont également impliqués dans l'inhibition de la maturation du phagosome. Ces lipides et leurs rôles sont décrits ci-après dans le chapitre **3.3 Implication des lipides de la mycomembrane.**

- **survie de *Mtb* au sein du phagosome et résistance au stress oxydatif et au pH acide.** *Mtb* prévient la production d'espèces nitrées toxiques en inhibant l'adressage de la nitric oxide synthase inductible (iNOS) à la membrane phagosomale. *Mtb* produit aussi différentes enzymes, comme des superoxyde dismutases, SodA et SodC, qui transforment l'anion superoxyde O₂⁻ en peroxyde d'hydrogène H₂O₂, et la catalase-peroxydase KatG qui permet la décomposition de H₂O₂ en H₂O et O₂. Le contrôle du pH étant décisif pour la survie du bacille, la H⁺ V-ATPase est une cible majeure de *Mtb*. C'est la protéine tyrosine phosphatase, **PtpA**, sécrétée par *Mtb*, qui serait responsable de l'exclusion de la pompe en se liant à la H⁺ V-ATPase, prévenant ainsi l'acidification du phagosome.

- **rupture et échappement du phagosome.** Une fois son maintien au sein du phagosome assuré, *Mtb* est capable de s'échapper de cet environnement en induisant la rupture de la membrane du phagosome. Cet évènement est dépendant du système de sécrétion de type VII ESX-1 (pour *ESAT-6 secretion system 1*) et d'un composant de la mycomembrane (PDIM) décrits dans les chapitres suivants. Cet échappement du phagosome, l'accès au cytosol de *Mtb* et la reconnaissance par les récepteurs cytosoliques qui en découle induit la mise en place d'un système de réparation par le macrophage et déclenche la mort cellulaire. Les systèmes de réparation sont inhibés par un composant du système de sécrétion de type VII, ESX-3 (EsxH, décrit ci-après dans le chapitre **3.2.2 Autres systèmes ESX impliqués dans la virulence de *M. tuberculosis*.**

- **régulation de la mort cellulaire du macrophage par *Mtb***. *Mtb* est capable d'interférer avec différents mécanismes de mort cellulaire (apoptose, nécrose, pyroptose et autophagie), soit en les stimulant, soit en les imbibant, selon un processus dynamique complexe encore mal connu. Il est intéressant de noter que les macrophages nécrotiques constituent une niche pour la réplication de *Mtb*, *Mtb* y ayant un temps de doublement plus court que dans l'environnement extracellulaire ou dans des cellules vivantes. *Mtb* est capable de bloquer l'**apoptose**, via NuoG, PtpA, PknE, SecA2, SodA, ou encore SigH dont la production perturbe les voies de signalisation déclenchant l'apoptose, mais aussi de la favoriser. Ainsi, *Mtb* produit aussi des facteurs pro-apoptotiques parmi lesquelles les lipoprotéines LpqH et pstS1, PE_PGRS33, ou encore la protéine EsxA (ESAT-6) qui est le facteur le plus connu. Cette dernière joue aussi un rôle dans la **nécrose programmée**, notamment la pyroptose, la nécrose dépendante de la perte de potentiel mitochondrial et l'autophagie. Contrairement aux autres mécanismes de mort cellulaire, ESX-1, associé aux protéines PE-PGRS, peut aussi inhiber l'autophagie.

3.2. Systèmes de sécrétion de type VII (SST7 ou ESX)

Les systèmes de sécrétion (SS) ont été décrits chez toutes les bactéries. Les bactéries à Gram négatif possèdent des systèmes de sécrétion de type I à IV, VIII et IX ; un potentiel type X ayant été identifié récemment ⁴⁴⁶. Les bactéries à Gram positif et les mycobactéries possèdent des systèmes de sécrétion de type VII (SST7) ⁴⁴⁷. Les SST7 ont une structure bien différente des SS des bactéries à Gram négatif (**Figure 44**) ⁴⁴⁸. Parmi les mycobactéries, *Mtb* est l'espèce qui possède le plus grand nombre de **SST7, appelés également systèmes ESX** (6 kDa early secretory antigenic target (ESAT6) secretion) : **ESX-1, ESX-2, ESX-3, ESX-4 and ESX-5** (**Figure 44**) ⁴⁴⁹.

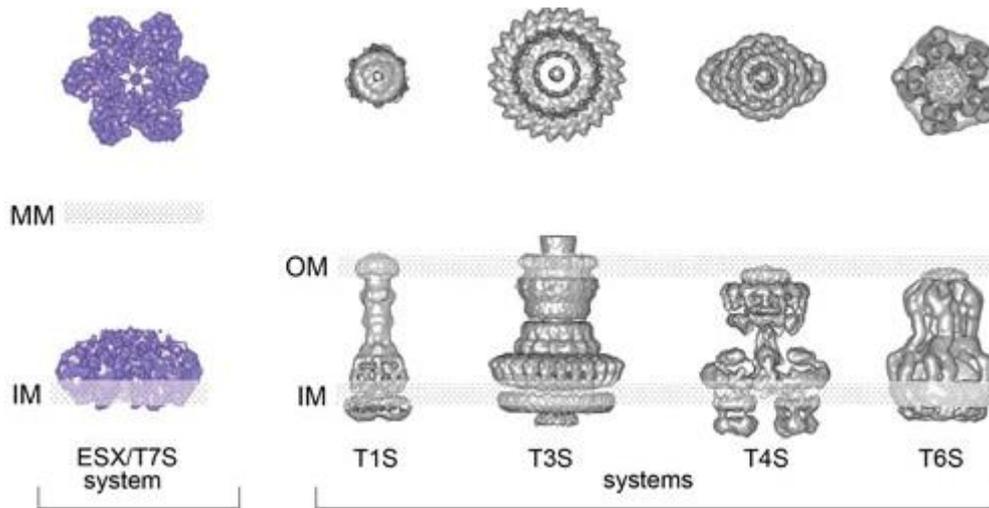


Figure 44- Représentation du système de sécrétion de type VII (en violet), basée sur la structure d'ESX-5 de *Mycobacterium xenopi*, en comparaison avec la structure des systèmes de sécrétion décrits chez les bacilles à Gram négatif (en gris). En haut, vue du dessus ; en bas : vue de côté.

IM : membrane cytoplasmique ; OM : membrane externe ; MM : mycomembrane. D'après ⁴⁴⁸.

Les systèmes ESX auraient différentes fonctions dans le métabolisme cellulaire, permettant entre autres aux bactéries de s'adapter à différents environnements. Chez les mycobactéries, les systèmes ESX permettent le transport de protéines à travers la paroi ⁴⁵⁰. Les systèmes ESX sont strictement localisés à la membrane cytoplasmique (**Figure 44**). Le mécanisme d'export de protéines dans le domaine extracellulaire et le passage au travers de la mycomembrane demeurent mystérieux.

Chez *Mtb*, les gènes qui codent les composants du système de sécrétion (*Esx conserved components, Ecc*) sont conservés (**Figure 45**). Il est probable que le système ESX ancestral était semblable à ESX-4, l'émergence des autres systèmes ESX ayant eu lieu suite à des mécanismes de duplications, diversification génique ou de transfert horizontal de gènes ⁴⁴⁹. En effet, ESX-4 est le plus simple et le plus primitif des cinq SST7 de *Mtb*, il est codé par un nombre réduit de gènes (**Figure 45**) et des orthologues d'ESX-4 sont trouvés dans de nombreuses espèces mycobactériennes, mais aussi chez d'autres bactéries du phylum *Actinobacteria* ⁴⁵⁰.

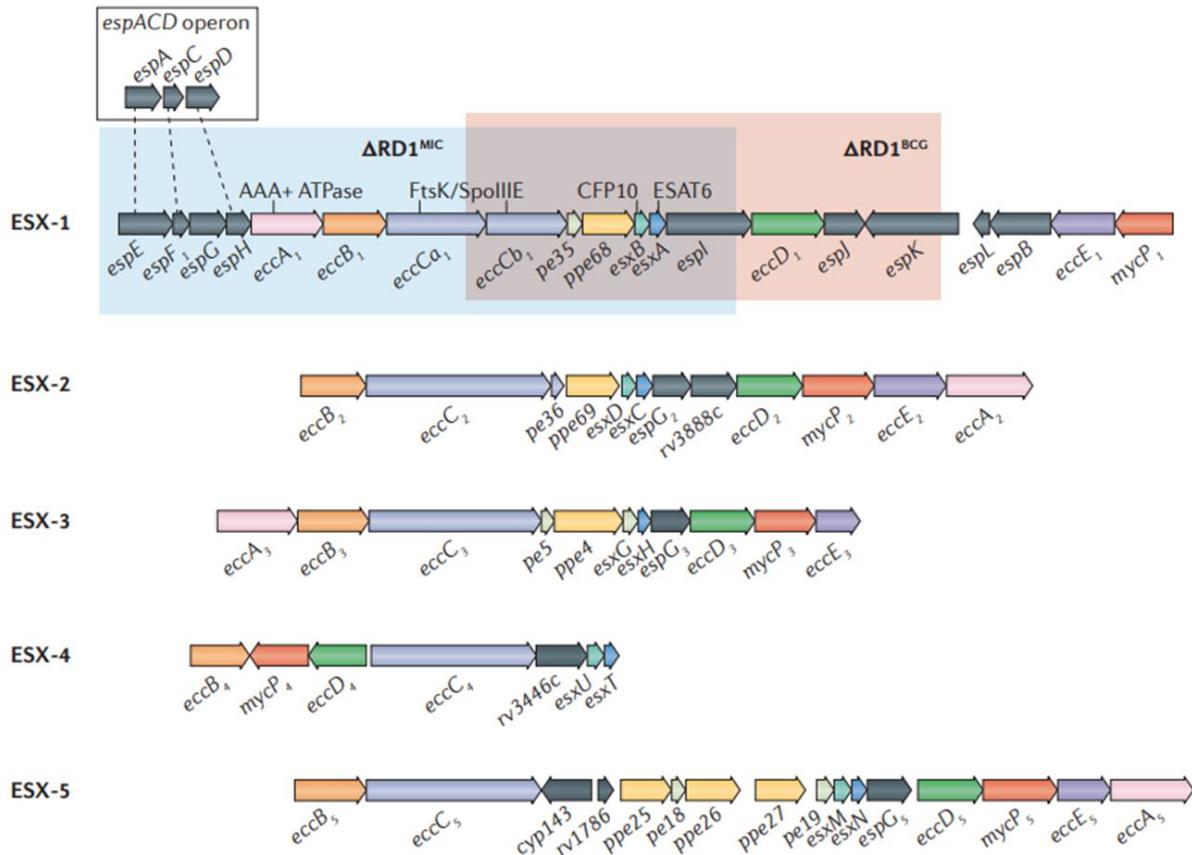


Figure 45- Structure génétique des cinq loci *esx* et de l'opéron *espACD* chez *M. tuberculosis* H37Rv. Le locus *esx-1* peut être considéré comme le locus modèle pour les systèmes ESX ; il comprend : (i) les gènes *esx* qui codent deux protéines effectrices sécrétées, EsxA et EsxB, (ii) des gènes *ecc* (*ESX-conserved components*) qui codent des protéines considérées comme conservées, et (iii) des gènes *esp* qui codent des protéines associées à la sécrétion. Les délétions spontanées dans *esx-1* dans les souches vaccinales de *M. bovis* BCG ($\Delta RD1^{BCG}$; en rouge) et *M. microti* ($\Delta RD1^{MIC}$; en bleu) seraient associées à une virulence atténuée. La délétion dans chacune de ces souches englobe une région différente, mais qui se chevauche, et qui, dans les deux souches, est connue sous le nom de région de différence 1 (RD1). L'opéron *espACD* est un locus distinct des cinq loci *esx* mais partage une homologie de séquence (lignes pointillées) avec l'opéron *espE*, *espF* et *espH* d'*esx-1*. D'après ⁴⁵⁰

Parmi les cinq SST7, au moins trois sont impliqués dans la « virulence » de *Mtb*, ESX-1, ESX-3 et ESX-5 ; ESX-1 étant celui qui joue le rôle le plus important.

3.2.1. Système ESX-1

3.2.1.1. Structure génétique et protéique

Le SST7 ESX-1 est codé par les gènes du locus *esx-1* et de l'opéron *espACD* ⁴⁵¹. Au niveau de ce locus (qui est utilisé comme modèle pour l'étude des autres loci *esx*), les gènes codant les deux protéines sécrétées EsxA et EsxB sont précédés par les gènes *pe35* et *ppe68* ; en amont se trouvent les gènes codant les deux composés de la Ftsk–SpoIIIE-like ATPase

(EccCa et EccCb). En aval des gènes *esxA* et *esxB*, on retrouve des gènes codant deux protéines transmembranaires, EccD et EccE. Le locus *esx-1* code aussi la sérine-protéase MycP₁ (mycosine 1), ainsi que plusieurs protéines associées à la sécrétion (Esp).

ESX-1 est présent à la fois chez les mycobactéries à croissance lente et à croissance rapide. Cependant, son implication dans la virulence n'a été montrée que chez les mycobactéries à croissance lente⁴⁴⁸. Les protéines du système ESX-1 sont hautement conservées chez *Mtb*, *M. bovis*, *M. africanum*, mais aussi chez les mycobactéries non tuberculeuses telles que *M. marinum*, *M. kansasii*, mais aussi *M. leprae*⁴⁵¹. Différentes études structurales ont permis de mettre en évidence que la section membranaire d'ESX-1 était une structure oligomérique composée de cinq protéines conservées : EccB1, EccCa1, EccCb1, EccD1, et EccE1. Cette structure permet de former un canal permettant la sécrétion des protéines Esx ou Esp⁴⁵² (**Figure 46**).

Les protéines Esp sont spécifiques d'ESX-1, sauf EspG qui a des homologues dans les autres systèmes ESX (**Figure 45**). EspB, sécrétée par le système ESX-1, est une protéine de 60 kDa tronquée à son extrémité C-terminale par le domaine sérine-protéase de MycP₁, au cours de sa translocation, résultant en la sécrétion d'une protéine de 50 kDa⁴⁵³. Une fois sécrétée, EspB forme une structure heptamérique en anneau qui serait impliquée dans la sécrétion médiée par l'appareil ESX-1. EspB assurerait une fonction propre dans la virulence de *Mtb*, via un mécanisme indépendant d'EsxA⁴⁵⁴. D'autres protéines Esp sont des substrats d'ESX-1, telles que les protéines codées par l'opéron *espACD*, qui est situé à 260 kb en aval du locus *esx-1*. Les sécrétions d'EspA, et EspC et d'EsxA et EsxB sont interdépendantes⁴⁵². Il a été montré que la protéine EspC, une fois sécrétée, formerait un polymère de haut poids moléculaire qui se fixerait à la mycomembrane. EspC étant requis pour la sécrétion d'EsxA, il est suspecté qu'EspC formerait une sorte « d'aiguille » au niveau de la mycomembrane, par homologie avec les SS des bactéries à Gram négatif⁴⁵⁵.

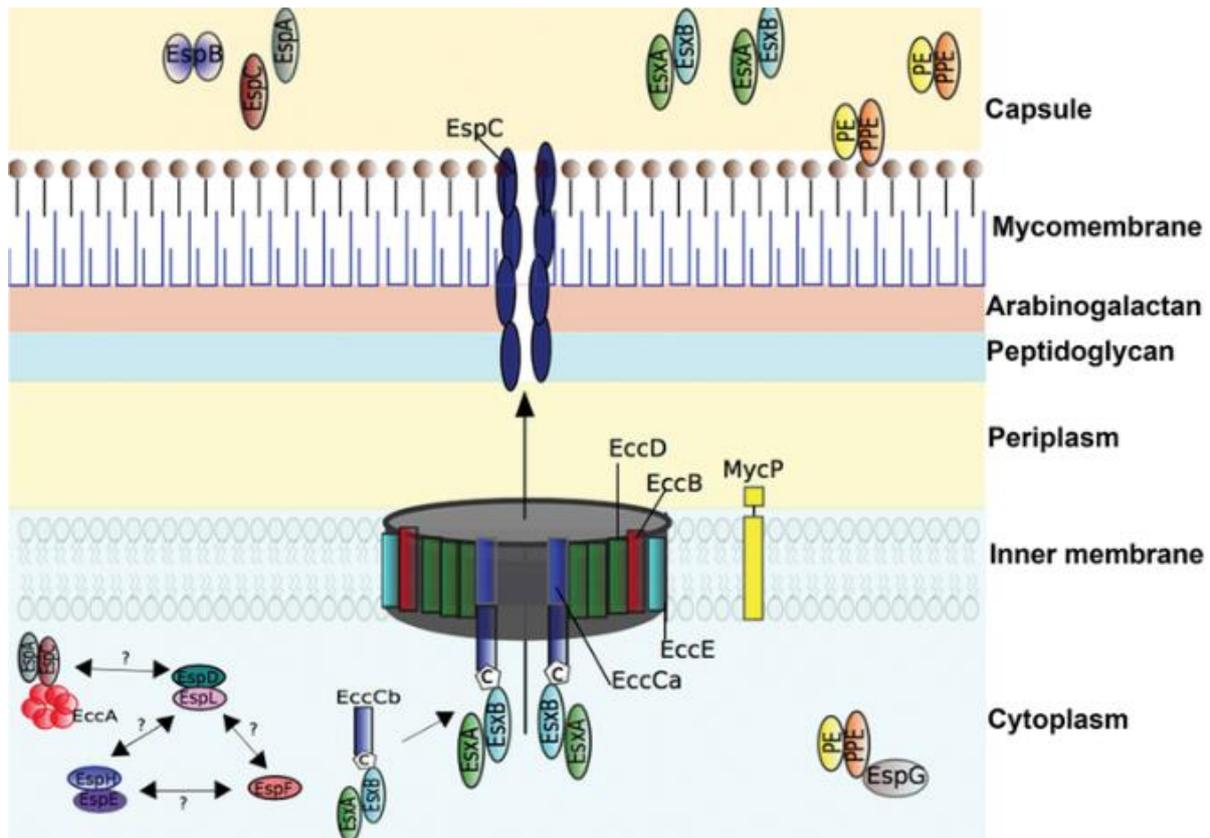


Figure 46- Modélisation du système ESX-1. La structure principale de l'appareil de sécrétion ESX-1 se situe au niveau de la membrane cytoplasmique (*inner membrane*), constituée des protéines conservées EccB, EccC, EccD, et EccE. EccC est une translocase constituée de deux sous-unités (a et b) qui sont assemblées après la fixation par EccB de l'hétérodimère EsxAB (via EsxB). La sécrétion d'EsxAB est co-dépendante de la sécrétion d'EspC/EspA, qui dépend également de l'interaction avec l'ATPase cytosolique EccA. EspC se polymérise pendant la sécrétion et forme une structure qui est suspectée de former un canal pour la sécrétion des substrats d'ESX-1 au travers de la mycomembrane. D'autres substrats importants d'ESX-1 sont les protéines PE/PPE, qui forment des hétérodimères et qui sont recrutées par la protéine chaperon EspG. EspB est également sécrétée par ESX-1, après une troncature réalisée par la protéase MycP. EspD, EspE et EspF sont cytosoliques, et il a été montré qu'elles étaient stabilisées via l'action de la protéine chaperon EspL. D'après ⁴⁵⁶

3.2.1.2. Régulation (Figure 47)

En plus de la régulation liée à l'interdépendance de la sécrétion de différents substrats d'ESX-1 (telles qu'avec EspA et EspC), une autre régulation est opérée par Whib6 ⁴⁵⁷. Ce régulateur transcriptionnel est codé par le gène *whiB6* qui est situé à l'extrémité 5' du locus *esx-1*. Son rôle a été mis en évidence par une étude transcriptomique comparative montrant une mutation (insertion d'un nucléotide) au niveau du promoteur de *whiB6* chez H37Rv et H37Ra conduisant à une transcription diminuée non seulement de *whiB6*, mais aussi de nombreuses protéines du système ESX-1. L'insertion était située au niveau du site de fixation de PhoP, qui fait partie du système à deux composants PhoP-PhoR ⁴⁵⁵.

EspR est également un régulateur transcriptionnel du système ESX-1, mais aussi de d'autres facteurs de virulence chez *Mtb*⁴⁵⁸. Il a été montré notamment qu'EspR régulaient la transcription de l'opéron *espACD*. La transcription d'EspR est elle-même régulée par les systèmes à deux composants PhoP/R et MprA/B.

Chez les souches de *M. africanum* de la lignée 6 (mais pas de la lignée 5) et chez les espèces de *MTBC* adaptées à l'animal, la délétion ancestrale de la RD8 (**Figure 47**), en amont de l'opéron *espACD*, court-circuite la boucle de régulation PhoP/R-EspR-MprA/B, permettant la sécrétion d'EsxA/B malgré une activité réduite de PhoP/R. Ainsi, la délétion de la RD8 pourrait être un mécanisme compensatoire des mutations dans PhoP/R présentes dans ces lignées qui entraînent une perte en fitness.

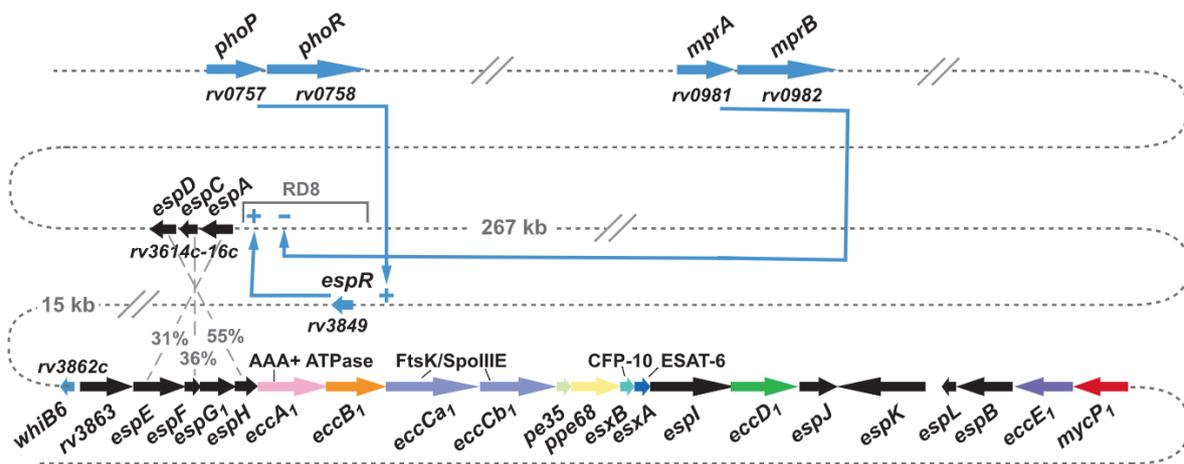


Figure 47- Représentation schématique des boucles impliquées dans la régulation de la sécrétion d'EsxA (ESAT-6) et d'EsxB (CFP-10). La sécrétion d'EsxA et d'EsxB est co-dépendante de la sécrétion d'EspA et d'EspC, qui est régulée chez *Mtb* par EspR, dont la transcription est elle-même régulée par les systèmes à deux composants PhoP/R et MprA/B. D'après⁴⁵⁵.

3.2.1.3. Rôle dans la virulence de *M. tuberculosis* (**Figure 48**)

Plusieurs études expérimentales ont permis de mettre en évidence le rôle prépondérant d'ESX-1 dans la virulence de *Mtb*, en particulier dans **la rupture et l'échappement de *Mtb* du phagosome** (**Figure 48**). Des études de génomique comparative de *Mtb* avec la souche vaccinale de *M. bovis* BCG et de *M. microti* (de virulence naturellement atténuée) ont montré que certaines parties du système ESX-1 étaient codées au sein des RD1 (RD1^{BCG} et RD1^{MIC} respectivement) (**Figure 45**)^{42, 33}. Ces régions codent deux protéines sécrétées : ESAT-6 et CFP-10 (*culture filtrate protein of 10 kDa*), également appelées EsxA et EsxB respectivement.

Ces deux protéines sont des antigènes reconnus par les lymphocytes T ⁴⁵⁹. Des études expérimentales avec la construction de mutants de *Mtb* H37Rv délétés pour la région RD1, ainsi que la complémentation de la région RD1 chez *M. bovis* BCG et *M. microti*, ont mis en évidence que la sécrétion d'EsxA et d'EsxB sont toutes deux nécessaires pour la virulence, ce qui sous-entend d'avoir un appareil de sécrétion ESX-1 fonctionnel ⁴⁶⁰. En effet, la capacité de *Mtb* à s'évader du phagosome a été reliée à ESX-1, car ni *M. bovis* BCG, ni un mutant de *Mtb* délété pour RD1 n'ont cette capacité ⁴⁶¹. Une étude récente a clairement mis en évidence le rôle d'EsxA, et plus particulièrement de son extrémité C-terminale, dans la rupture du phagosome et la virulence entraînés par *Mtb* ⁴⁶².

Le contact cytosolique de *Mtb* dans la cellule hôte médié entre autres par ESX-1 déclenche une cascade d'activation du système immunitaire. Ainsi, du fait de l'absence d'ESX-1, la souche vaccinale *M. bovis* BCG n'a pas la capacité de s'évader du phagosome, et n'induit donc pas cette cascade immunitaire, ce qui limite son pouvoir vaccinal.

Le système ESX-1 serait également impliqué dans la **formation et la maturation du granulome**, comme cela a été montré dans un modèle *zebrafish* chez *M. marinum* ⁴⁶³. L'induction de production de la métalloprotéinase 9 (MMP9) dans les cellules épithéliales proximales des macrophages infectés par ESX-1 favorise le recrutement de macrophages, ce qui contribue à la maturation du granulome ⁴⁶⁴.

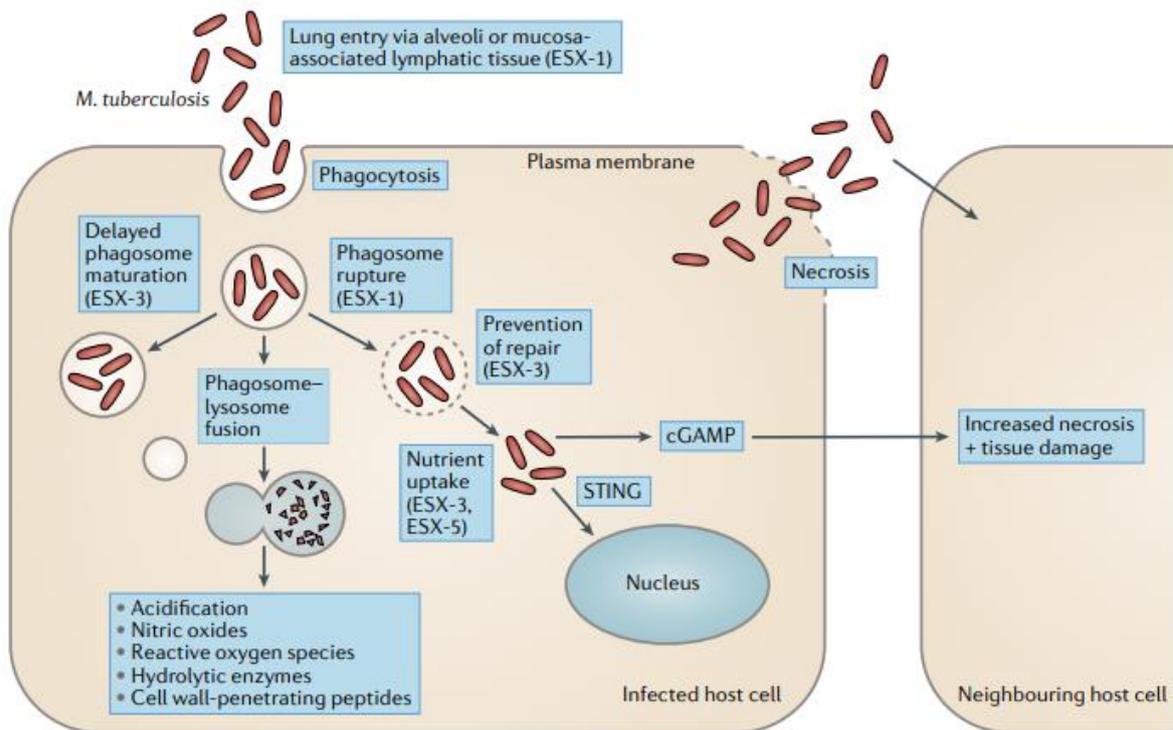


Figure 48- Rôles des systèmes de sécrétion de type VII dans la virulence de *Mtb*. Après sa pénétration dans les alvéoles pulmonaires, *Mtb* est phagocyté par les macrophages alvéolaires. La fusion du phagosome et du lysosome est retardée par l'action d'ESX-3. En cas de formation du phagolysosome, *Mtb* serait détruit du fait de l'environnement hostile généré par l'acidification, la production de dérivés du NO et de ROS, et par l'action d'enzymes hydrolytiques et de peptides antimicrobiens. ESX-1 permet de rompre le phagosome et ESX-3 empêche la réparation de celui-ci. La rupture du phagosome permet la libération des bacilles tuberculeux dans le cytoplasme, qui est un environnement plus riche en nutriments et donc propice à la réplication des bacilles. L'import de nutriments est médié par ESX-3 (fer) et ESX-5. La présence de *Mtb* dans le cytosol active la voie de la GMP-AMP cyclique (cGAMP) synthase (cGAS)-stimulateur des gènes de l'IFN (STING), qui favorise la nécrose des cellules de l'hôte, entraînant ainsi des dommages tissulaires et la propagation des bacilles tuberculeux. D'après ⁴⁶⁵.

3.2.2. Autres systèmes ESX impliqués dans la virulence de *M. tuberculosis*

Seuls ESX-3 et dans une moindre mesure ESX-5, sont impliqués dans la virulence de *Mtb*. En effet, le rôle d'ESX-4 et d'ESX-2 est inconnu. Cependant, il est probable qu'ils ne soient pas essentiels à bactérie et ne jouent pas de rôle dans la virulence car : (i) aucun de ces deux systèmes n'est requis pour la croissance de *Mtb*, y compris *in vivo* chez la souris ⁴⁵² (ii), *M. leprae* et de *M. lepromatosis* ne possèdent pas ces deux systèmes ².

Les gènes qui codent le système **ESX-3** sont conservés entre les différentes espèces mycobactériennes, ce qui suggère un rôle important de ce dernier dans la survie ⁴⁶⁶. **ESX-3 joue un rôle dans l'échappement de *Mtb* au système immunitaire en inhibant la maturation du phagosome et en induisant la mort cellulaire.** Ainsi, ESX-3 participe à la sécrétion de protéines PE/PPE, d'EsxH et d'EsxG qui jouent un rôle dans le blocage de la maturation du

phagosome en phagolysosome ⁴⁶⁷ et ESX-3 empêche la réparation du phagosome après sa rupture par ESX-1 ⁴⁵² (**Figure 48**). ESX-3 est également impliqué dans l'acquisition du fer médiée par la mycobactine ⁴⁶⁶.

ESX-5 n'est présent que chez les mycobactéries à croissance lente (tout comme ESX-2), et a été mis en évidence pour la première fois chez *M. marinum* ⁴⁶⁸. La restriction d'ESX-2 et d'ESX-5 aux mycobactéries à croissance lente suggère que ce sont les deux systèmes les plus récents en terme d'évolution ESX-5 étant le plus récent des deux ⁴⁵⁰. Le système ESX-5 est composé de quatre protéines, EccB5, EccC5, EccD5, et EccE5, qui sont organisées en un complexe hexamérique ⁴⁶⁹. **Son rôle principal dans la virulence de *Mtb* intervient au stade de latence où ESX-5, tout comme ESX-1, contribue à l'activation de l'inflammasome et à la sécrétion d'IL-1 β** (Abdallah et al. 2008). Sa principale fonction est de sécréter des protéines appartenant majoritairement à la famille des PE/PPE ; protéines qui participent elles aussi à la virulence de *Mtb*. Ainsi, l'inactivation d'ESX-5 entraîne un défaut de sécrétion des protéines PE/PPE, une perte d'intégrité de la paroi cellulaire et une atténuation de la virulence ⁴⁷⁰. Contrairement à ESX-1, ESX-5 n'a aucun rôle dans l'échappement de *Mtb* du phagosome, en tout cas cela n'a pas été mis en évidence.

3.3. Implication des lipides de la mycomembrane

Les lipides peuvent être classés en fonction de leurs propriétés physiques. Une grande majorité d'entre eux possède une tête glycosylée qui leur confère en partie un rôle dans la virulence. En opposition, on trouve les lipides non glycosylés et entièrement apolaires dont le rôle dans la virulence n'est pas démontré.

Les glycolipides sont impliqués dans la virulence car ils jouent un rôle essentiel dans la modulation de la réponse inflammatoire. La production préférentielle de certaines espèces lipidiques par rapport à d'autres peut stimuler ou au contraire diminuer la réponse inflammatoire. Il a d'ailleurs été proposé la notion « d'immunostat lipidique », où d'un côté, les **DAT/PAT** (Di-Acyl Trehalose/Poly-Acyl Trehalose), les **SL** (SulfoLipids) et les **PGL** (PhenolGlycoLipides) qui diminuent la réponse inflammatoire, alors que les **TDM** (Trehalose Di-Mycolates), **PIM** (PhosphatidylInositol Manosides), les phthiocerol di-mycocerosates (**PDIM**) et **LAM/ManLAM** (LipoArabinoMannanes) ont tendance à l'augmenter ⁴⁷¹. La reconnaissance de leur tête glycosylée déclenche l'activation du macrophage et la mise en place de la réponse immunitaire et/ou de l'internalisation de la bactérie. Par exemple, la liaison du

TDM au récepteur Mincle, qui participe à l'activation des macrophages et des cellules dendritiques, est essentielle pour la formation et la maintenance du granulome ⁴⁷². De même, les **DAT/PAT** jouent aussi un rôle, plus modeste, dans l'entrée, la persistance de la bactérie et la maturation phagosomale ⁴⁷³.

Le rôle de ces lipides ne se limite pas seulement à leur activité de modulateurs de la réponse inflammatoire. Une fois dans le phagosome, la plupart d'entre eux jouent aussi un rôle plus ou moins important dans l'inhibition de la maturation du phagosome. Le plus caractérisé est le **ManLAM**, qui inhibe l'activation de la calmoduline, qui permet normalement le recrutement de la PI3K et du facteurs EEA-1, essentiels à la fusion du phagosome avec les endosomes tardifs et les lysosomes ⁴⁷⁴.

Les **PDIM** seraient indispensables à plusieurs étapes clés de l'infection par Mtb : entrée dans le macrophage, blocage de l'acidification du phagosome et rupture du phagosome médiée par ESX-1 ⁴⁷⁵ (**Figure 49**).

Le **TDM**, également appelé « cord factor », joue aussi un rôle dans le trafic vésiculaire intracellulaire en inhibant la fusion du phagosome avec les lysosomes ⁴⁷⁶. Enfin, un rôle plus modeste dans l'inhibition de la maturation du phagosome a été observé pour les **PGL** ⁴⁷⁷, les **SL** et les **DAT/PAT** ⁴⁷³. Néanmoins les mécanismes d'inhibition de la maturation phagosomale par ces lipides restent largement méconnus.

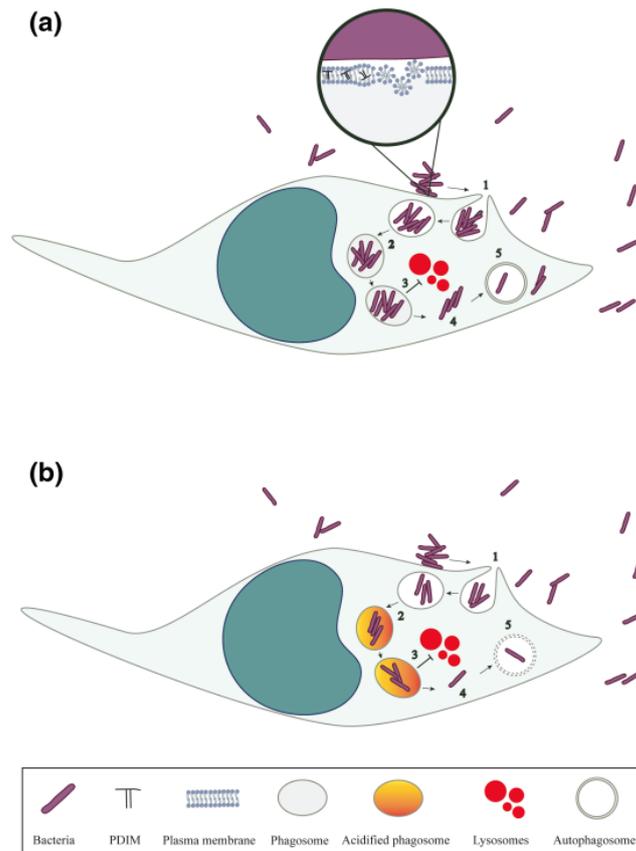


Figure 49- Rôles des PDIM dans la virulence de *Mtb*. Les étapes de la phagocytose de *Mtb* comprennent : l'entrée dans le macrophage (1), l'acidification du phagosome (2), la fusion du phagolysosome (3), l'échappement du phagosome (4) et la xénophagie (5). (a) Souche de *Mtb* sauvage. Les PDIMs de *Mtb* augmentent la phagocytose en médiant le remodelage de la membrane plasmique du macrophage. À l'intérieur du macrophage, *Mtb* échappe à l'acidification du phagosome et à la fusion ultérieure avec les lysosomes. Les bacilles peuvent ensuite s'échapper du phagosome pour atteindre le cytosol. Grâce à la modulation de la réponse de l'hôte, les voies de déclenchement de l'autophagie sont inhibées et très peu de bacilles subiront l'autophagie. (b) Souches de *Mtb* dépourvues de PDIMs. Les bacilles pénètrent dans les macrophages environ 50% moins efficacement que les souches sauvages. A l'intérieur du macrophage, les phagosomes contenant les bacilles subissent une acidification progressive, mais la fusion avec les lysosomes reste tout de même bloquée. Moins de bacilles sont capables d'atteindre le cytosol et par conséquent, environ 50% de moins seront ciblés par la xénophagie. D'après ⁴⁷⁵

3.4. Protéines PE/PPE

Les protéines PE/PPE sont complexes à étudier car les gènes les codant possèdent un très haut GC%, des régions répétées et des duplications, et sont de grande taille (jusqu'à 1400 acides aminés) ^{279 478}.

3.4.1. Structure et classification

Les protéines PE et PPE sont nommées ainsi du fait de leurs motifs Pro(P)-Glu(E) et Pro-Pro-Glu caractéristiques à leur extrémité N-terminale. Environ 10% de la partie codante du

génomique de *Mtb* correspond aux gènes *pe/ppe*. La majorité de ces gènes sont situés en dehors des loci *esx*⁴⁴⁷. Plusieurs protéines PPE possèdent également un motif W-X-G au sein de leur motif *helix-turn-helix*. Les PE/PPE sont sécrétées sous formes d'hétérodimères, dont la structure ressemble fortement à celle des hétérodimères formés par les protéines Esx, telles que EsxA-EsxB⁴⁷⁸. La structure des PE/PPE est aussi très proche de celle de certaines protéines Esp, telles que EspA/C et EspB⁴⁷⁸. La grande majorité des PE/PPE est sécrétée par ESX-5, d'autres le sont *via* ESX-1, ESX-2 ou ESX-3⁴⁷⁸. Il a été mis en évidence que PPE38 était requis pour la sécrétion de deux sous-familles de protéines PE/PPE, les PE_PGRS et les PPE-MPTR⁴⁷⁹. De façon intéressante, il a été montré que **la délétion dans le locus *pe38* qui est trouvée chez les souches modernes de la lignée Beijing (lignée 2) et qui entraîne le blocage de la sécrétion des PE_PGRS et des PPE-MTR, contribuait à la virulence de ces souches à leur succès**⁴⁷⁹.

La reconnaissance des PE/PPE avec un système ESX est liée à la protéine chaperon se fixant sur les PE/PPE. Ainsi, il a été mis en évidence chez *M. marinum* que le remplacement du domaine qui interagit avec EspG de PPE68 (sécrétée habituellement par ESX-1) par celui de PPE18 (sécrété par ESX-5) était suffisant pour orienter la sécrétion de PPE68 par ESX-5⁴⁸⁰.

Une classification en lignées des PE/PPE a également été proposée⁴⁸¹. Le sous-groupe le plus récent est celui des PPE-MPTR (pour *Major Polymorphic Tandem Repeat*) (**Tableau 9**).

3.4.2. Fonctions

Différents rôles dans la virulence et l'immunomodulation ont été attribués aux PE/PPE :

- **favoriser la formation de canaux au travers de la mycomembrane pour l'import de nutriments**, à l'instar des porines chez les bactéries à Gram négatif^{467, 361, 482}.
- **favoriser l'interaction hôte-pathogène ou l'évasion du système immunitaire, avec des fonctions complémentaires des systèmes ESX ou des lipides de la mycomembrane**⁴⁸³.

Il est important de garder à l'esprit qu'une des difficultés pour appréhender le rôle des PE/PPE chez *Mtb* est lié au fait que le modèle d'étude le plus souvent utilisé était *M. smegmatis*, mycobactérie à croissance rapide dépourvue de système ESX-5 fonctionnel et incapable de transloquer la majorité des PE/PPE au travers de la membrane cytoplasmique⁴⁸⁴. L'utilisation

de ce modèle explique aussi certains résultats discordants. Ainsi, de nombreuses souches virulentes, telles que les souches Beijing de la lignée 2 moderne, ne sécrètent pas de PE_PGRS ni les PPE-MTR, ce qui suggère que ces deux familles de PE/PPE ne sont pas indispensables à la virulence de *Mtb* chez l'homme ⁴⁷⁹. Cependant, plusieurs travaux expérimentaux (résumées dans la revue publiée par Delogu *et al.* en 2017 ⁴⁸⁵) ont montré un rôle de PE_PGRS dans la virulence de *Mtb*. Plusieurs de ces travaux ont utilisé *M. smegmatis* pour modèle (**Tableau 9**), ^{478, 486}.

Malgré les limites évoquées ci-dessus et bien que les connaissances sur les fonctions de cette grande famille de protéines soient très parcellaires, les connaissances concernant le rôle des PE/PPE dans la virulence de *Mtb* ont été synthétisées dans le **Tableau 9**. Cette synthèse a été faite à partir des données expérimentales publiées dans deux revues publiées récemment ^{478, 486}.

Tableau 9- Protéines PE/PPE : mécanisme de sécrétion et rôle suspecté chez *Mtb* d'après des études expérimentales. Basé sur ^{478, 486}

Famille	Nom	Sécrétion	Rôle suspecté chez <i>Mtb</i>	Références	Espèce/souche utilisée	Conditions ^a	
PE_PGRS	PE_PGRS3	ESX-5 (avec PPE38)	Facilite l'adhésion aux macrophages Augmentation de la persistance	487	<i>Msmeg</i> recombinant	<i>In vitro</i> et <i>in vivo</i>	
	PE_PGRS5		Induction de l'apoptose médiée par la caspase 8 <i>via</i> activation du TLR-4	488	<i>Mtb</i> H37Rv	<i>In vitro</i>	
	PE_PGRS11		Résistance au stress oxydatif	489	<i>Mtb</i> H37Rv et HR7Ra et <i>Msmeg</i> recombinant	<i>In vitro</i> Modèle de dormance avec H37Ra (modèle de Wayne)	
	PE_PGRS17		Induction de la sécrétion de TNF- α Activation de la voie de signalisation du NF- κ B <i>via</i> le TLR-2	(T. Chen et al. 2013)	<i>Msmeg</i> recombinant	<i>In vitro</i>	
	PE_PGRS18		Induction de l'apoptose et de la sécrétion d'IL-12	(Yang et al. 2017)	<i>Msmeg</i> recombinant	<i>In vitro</i>	
	PE_PGRS29		Induction de l'autophagie avec clairance des bacilles tuberculeux cytosoliques <i>via</i> ubiquitination	492	<i>Mtb</i> H37Rv	<i>In vitro</i> et <i>in vivo</i>	
	PE_PGRS30		Blocage de la maturation du phagosome permettant de prolonger la survie intracellulaire de <i>Mtb</i>	493	<i>Mtb</i> H37Rv	<i>In vitro</i> et <i>in vivo</i>	
	PE_PGRS33			Induction de la mort cellulaire et de l'inflammation <i>via</i> le TLR-2	494	<i>Mtb</i> H37Rv	<i>In vitro</i> et <i>in vivo</i>
				Entrée dans le macrophage <i>via</i> la voie de signalisation TLR-2/CR-3	495	<i>Msmeg</i> recombinant	<i>In vitro</i>
				Induction de lésions tissulaires et de la persistance dans le tissu pulmonaire	496 497	<i>Mtb</i> H37Rv <i>Msmeg</i> recombinant	<i>In vitro</i> et <i>in vivo</i> <i>In vitro</i>
PE_PGRS41	Inhibition de l'autophagie Blocage de la sécrétion de TNF- α , de l'IL-12 et de l'IL-6	498	<i>Msmeg</i> recombinant	<i>In vitro</i>			
PE_PGRS47	Blocage de l'autophagie et de l'acidification du phagosome Inhibition de la présentation par le MHC-II (suppression de la réponse <i>Mtb</i> -spécifique des LT CD4+)	483	<i>Mtb</i> H37Rv et <i>Msmeg</i> recombinant	<i>In vitro</i> et <i>in vivo</i>			
PPE-PPW	PPE4 et PE5	ESX-3	Acquisition du fer médiée par la mycobactine	467	<i>Mtb</i> H37Rv et <i>Msmeg</i> recombinant	<i>In vitro</i> et <i>in vivo</i>	
	PPE36 et PPE37	ESX-3	Acquisition du fer	499	<i>Mtb</i> Erdman <i>Mtb</i> CDC1551 ^b <i>Mtb</i> HN878 ^b <i>M. bovis</i> et <i>M. bovis</i> BCG		
PPE-SVP	PPE38	ESX-5	Requis pour la sécrétion des PE_PGRS et des PPE-MPTR	479	<i>Mtb</i> CDC1551 ^b <i>Mmar</i> recombinant	<i>In vitro</i> et <i>in vivo</i>	
PPE-MPTR	PPE62	ESX-5 (avec PPE38)	Acquisition du fer	500	<i>Mtb</i> H37Rv <i>Mtb</i> H37Ra mc ² 6206	<i>In vitro</i> et <i>in vivo</i>	
PE	PE19	ESX-5	Homéostasie du phosphate Résistance au stress	501	<i>Mtb</i> Erdman <i>Mtb</i> H37Ra mc ² 7000	<i>In vitro</i> et <i>in vivo</i>	

^a toutes les études avec des conditions *in vivo* ont utilisé un modèle murin ; ^b Souches considérées comme hypervirulentes

IL : Interleukine; LT : Lymphocytes T; MHC : Complexe Majeur d'Histocompatibilité; *Mmar* : *M. marinum* ; *Msmeg* : *M. smegmatis* ; TLR : Toll-Like Receptor; TNF : Tumor Necrosis Factor

CONTEXTE ET OBJECTIFS

Le travail qui m'a été confié s'inscrit dans la nécessité de lutte contre l'émergence et la dissémination de la TB résistante aux antibiotiques.

Cette lutte repose sur :

1. **le traitement précoce et efficace des patients afin de limiter la contagiosité** ; pour cela, il est indispensable de diagnostiquer la résistance avec fiabilité et rapidité, notamment aux antituberculeux de seconde ligne. Etant donné la vitesse de croissance lente de *Mtb*, cela passe par l'amélioration du diagnostic moléculaire de la résistance.
2. **la compréhension des mécanismes de dissémination des souches MDR/XDR**, afin d'identifier des pistes pour stopper cette dissémination.

Ce travail de thèse s'inscrit dans ces deux grands enjeux en s'appuyant sur une approche génomique.

Ainsi, les objectifs de mon travail de thèse étaient : (i) d'améliorer le diagnostic de la résistance aux antituberculeux de seconde ligne, notamment les antituberculeux majeurs que sont les FQ, et (ii), d'investiguer les mécanismes moléculaires d'adaptation et de dissémination d'un cluster particulier de souches de *Mtb* MDR.

Pour y parvenir, les travaux suivants ont été réalisés (**Figure 50**) :

1. Au-delà du travail expérimental nécessaire pour mener à bien ma thèse, j'ai développé une expertise technique et microbiologique dans le domaine de la mycobactériologie dans le cadre de mon travail d'assistante hospitalo-universitaire au CNR-MyRMA. Ainsi, des **travaux et publications en lien avec le contexte du sujet et me permettant de bien appréhender mon projet de thèse** ont été réalisés. Ces travaux sont cités dans la partie bibliographique de ce manuscrit de thèse et les pdf sont inclus dans le manuscrit dans les pages suivantes (**Publications 1 à 8**).
2. **Caractérisation des mécanismes moléculaires de résistance aux FQ non liés à l'ADN gyrase (Publication 9)**.

3. **Investigation des mécanismes moléculaires d'adaptation et de dissémination d'un cluster particulier de souches de *Mtb* MDR.** Les résultats obtenus sont présentés ci-après (§ III Travaux portant sur l'investigation des mécanismes moléculaires de dissémination d'un cluster particulier de souches de *M. tuberculosis* MDR).

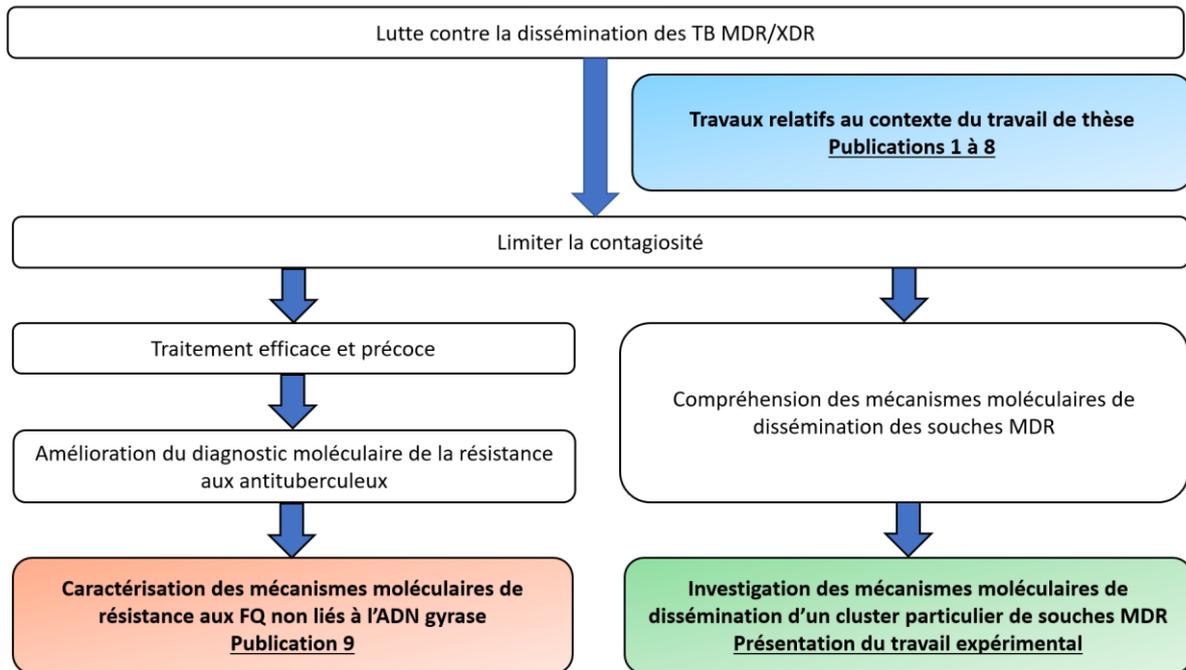


Figure 50- Représentation schématique du contexte et des objectifs du travail de thèse, ainsi que des travaux originaux réalisés pour y répondre.

TRAVAUX ORIGINAUX

I. Travaux relatifs au contexte du travail de thèse

Ces travaux ont concerné :

- le diagnostic de la TB :
 - aide au diagnostic d'un cas particulier de BCGite (**Publication 1**),
 - stratégie de prélèvement pour le diagnostic de la TB pulmonaire (**Publication 2**),
 - diagnostic moléculaire de la TB (**Publication 3**).
- la résistance aux antituberculeux :
 - impact de la nouvelle définition de la TB-XDR en France (**Publication 5**),
 - diagnostic génotypique de la résistance aux antituberculeux :
 - évaluation de nouvelles techniques moléculaires pour le diagnostic de la résistance aux antituberculeux : test MDR/MTB ELITE MGB[®] (**Publication 4**) et Deeplex Myc-TB[®] (**Publication 7**),
 - diagnostic de la résistance aux antituberculeux de seconde ligne : éthionamide (**Publication 6**) et bédaquiline (**Publication 8**).

Publication 1: Gies V, Dieudonné Y, **Morel F**, Sougakoff W, Carapito R, Martin A, Weingertner N, Jacquel L, Hubele F, Kuhnert C, Jung S, Schramm F, Boyer P, Hansmann Y, Danion F, Korganow AS, Guffroy A. Case Report: Acquired Disseminated BCG in the Context of a Delayed Immune Reconstitution After Hematological Malignancy. *Front Immunol.* 2021 Aug 3;12:696268. doi: 10.3389/fimmu.2021.696268. PMID: 34413849; PMCID: PMC8369751.



Case Report: Acquired Disseminated BCG in the Context of a Delayed Immune Reconstitution After Hematological Malignancy

Vincent Gies^{1,2,3}, Yannick Dieudonné^{1,2}, Florence Morel^{4,5}, Wladimir Sougakoff^{4,5}, Raphaël Carapito^{2,6}, Aurélie Martin⁷, Noëlle Weingertner⁸, Léa Jacquel^{1,2}, Fabrice Hubele⁹, Cornelia Kuhnert¹⁰, Sophie Jung^{2,11}, Frederic Schramm¹², Pierre Boyer¹², Yves Hansmann⁷, François Danion⁷, Anne-Sophie Korganow^{1,2} and Aurélien Guffroy^{1,2*}

¹ Department of Clinical Immunology and Internal Medicine, National Reference Center for Systemic Autoimmune Diseases (CNR RESQ), Tertiary Center for Primary Immunodeficiency, Strasbourg University Hospital, Strasbourg, France, ² Université de Strasbourg, INSERM UMR-S1109, Institut thématique interdisciplinaire (ITI) de Médecine de Précision de Strasbourg, Transplantex NG, Faculté de médecine, Fédération Hospitalo-Universitaire OMICARE, Fédération de Médecine Translationnelle de Strasbourg (FMTS), Strasbourg, France, ³ Université de Strasbourg, Faculty of Pharmacy, Illkirch, France, ⁴ APHP, Sorbonne Université, Hôpital Pitié-Salpêtrière, Laboratoire de Bactériologie-Hygiène, Centre National de Référence des Mycobactéries et de la Résistance des Mycobactéries aux Antituberculeux (CNR-MYRMA), Paris, France, ⁵ Sorbonne Universités, Inserm, Centre d'Immunologie et des Maladies Infectieuses (CIMI-Paris), UMR 1135, Paris, France, ⁶ Immunology Laboratory, Strasbourg University Hospital, Strasbourg, France, ⁷ Department of Infectology, Strasbourg University Hospital, Strasbourg, France, ⁸ Department of Pathology, Strasbourg University Hospital, Strasbourg, France, ⁹ Department of Nuclear Medicine and Molecular Imaging, ICANS, University Hospital of Strasbourg, Strasbourg, France, ¹⁰ Department of Internal Medicine, Strasbourg University Hospital, Strasbourg, France, ¹¹ Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Centre de Référence Maladies Rares Orales et Dentaires (O-Rares), Pôle de Médecine et de Chirurgie Bucco-Dentaires, Strasbourg, France, ¹² Laboratory of Bacteriology, Strasbourg University Hospital, Veulence bactérienne Précoce UR7290-Lyme Borelliosis Group, FMTS-CHRU Strasbourg, Institut de Bactériologie, Strasbourg, France

OPEN ACCESS

Edited by:

Sergio Roserzweig,
National Institutes of Health (NIH),
United States

Reviewed by:

Saul Oswaldo Lugo Reyes,
National Institute of Pediatrics, Mexico
Hassan Abofhasani,
Karolinska University Hospital,
Sweden

*Correspondence:

Aurélien Guffroy
aurelien.guffroy@chru-strasbourg.fr

Specialty section:

This article was submitted to
Primary Immunodeficiencies,
a section of the journal
Frontiers in Immunology

Received: 16 April 2021

Accepted: 15 July 2021

Published: 03 August 2021

Citation:

Gies V, Dieudonné Y, Morel F, Sougakoff W, Carapito R, Martin A, Weingertner N, Jacquel L, Hubele F, Kuhnert C, Jung S, Schramm F, Boyer P, Hansmann Y, Danion F, Korganow A-S and Guffroy A (2021) Case Report: Acquired Disseminated BCG in the Context of a Delayed Immune Reconstitution After Hematological Malignancy. *Front. Immunol.* 12:696268. doi: 10.3389/fimmu.2021.696268

Context: Disseminated infections due to *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guérin (BCG) are unusual and occur mostly in patients with inborn error of immunity (IEI) or acquired immunodeficiency. However, cases of secondary BCGosis due to intravesical BCG instillation have been described. Herein, we present a case of severe BCGosis occurring in an unusual situation.

Case Description: We report one case of severe disseminated BCG disease occurring after hematological malignancy in a 48-year-old man without BCG instillation and previously vaccinated in infancy with no complication. Laboratory investigations demonstrated that he was not affected by any known or candidate gene of IEI or intrinsic cellular defect involving IFN γ pathway. Whole genome sequencing of the BCG strain showed that it was most closely related to the *M. bovis* BCG Tice strain, suggesting an unexpected relationship between the secondary immunodeficiency of the patient and the acquired BCG infection.

Conclusion: This case highlights the fact that, in addition to the IEI, physicians, as well as microbiologists and pharmacists should be aware of possible acquired disseminated BCG disease in secondary immunocompromised patients treated in centers that administrate BCG for bladder cancers.

Keywords: BCG, BCGosis-susceptible PIDs, Immunodeficiency, hematological malignancies, contamination, case report

INTRODUCTION

Disseminated infections due to *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guèrin (BCG) are rare and occur in three types of conditions. First, it occurs in rare cases of inborn errors of immunity (IEI) involving phagocytosis, such as chronic granulomatous diseases (CGD), or interferon-gamma (IFN γ) pathways (called Mendelian susceptibility to mycobacterial diseases or MSMD) at the time of BCG vaccination. The second situation concerns cases associated with acquired immunodeficiency to IFN γ pathways that are described as a phenocopy of IEI. They lead to opportunistic infections (fungi, parasites, and bacteria), tuberculosis, and infection due to non-tuberculosis mycobacteria (1–4). Finally, reactivations are described in immunocompromised patients with human immunodeficiency virus (HIV) (5, 6), and cases of secondary disseminated BCG disease (BCGosis) are also reported under BCG therapy for bladder malignancy (7, 8). Here, we described a case of severe secondary BCGosis occurring after hematological malignancy in an adult without BCG instillation and previously vaccinated in infancy with no complication.

CASE DESCRIPTION

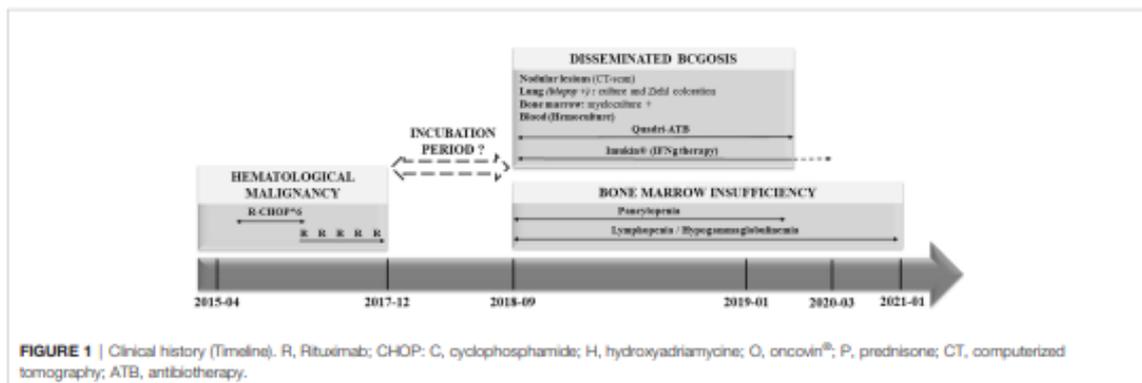
A 48-year-old Caucasian man was referred to our department for progressive asthenia, anorexia, and cachexia (–12 kg in 9 months).

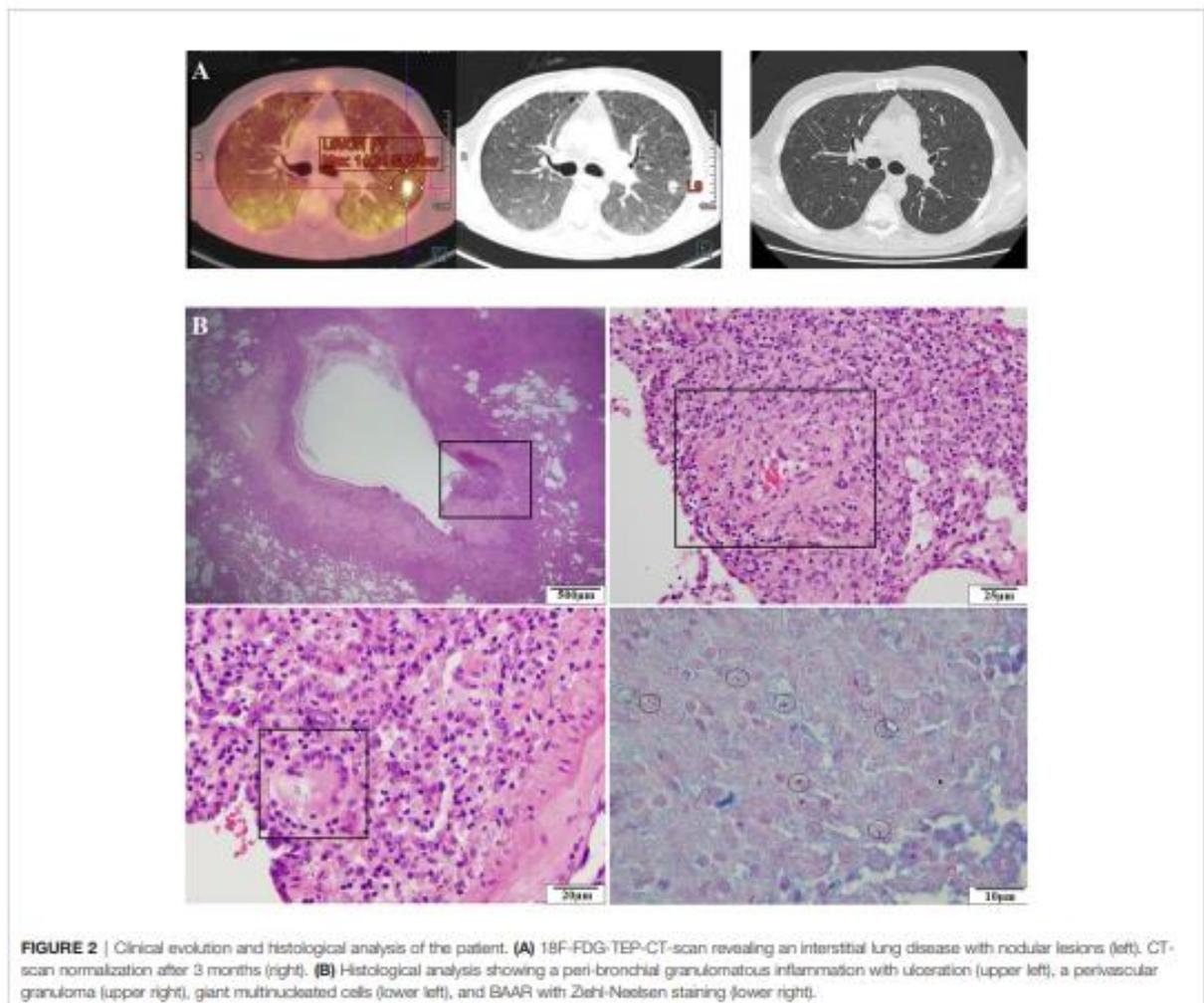
His main medical history was a hematological malignancy (OMS 2008 grade 1–2 follicular lymphoma) diagnosed 3 years before and involving the lacrimal gland and the bowel. Biopsies (right part of the colon) revealed a monotypic lymphoid infiltrate made of CD20+, CD5–, CD10+, and Bcl6+ lymphocytes with a Ki67 index at 50%. Lungs were not involved at this time (Supplementary Figure S1). He was treated with combined chemotherapy (R-CHOP) and a maintenance therapy with Rituximab every 2 months, for 18 months. He had experienced neither opportunistic nor severe infections nor autoimmune diseases. Timeline of his medical history is resumed in Figure 1.

Seven months after the last Rituximab therapy, the patient presented fever, splenomegaly (17 cm), and fine dry crackles at

pulmonary auscultation with dyspnea (New York Heart Association Classification class II–IV). An interstitial lung disease with nodular lesions was diagnosed on CT-scan with a decline of alveolar exchanges on breath tests (Figure 2A). Broncho-alveolar lavage (BAL) revealed an alveolar lymphocytosis (230,000 cells/ml, 67% lymphocytes, 28% macrophages) with inverted CD4/CD8 ratio and without any virus (screened by PCR), bacteria, or parasite in culture. Biology showed inflammatory syndrome, acute renal failure, pancytopenia with severe lymphopenia, mild neutropenia, thrombopenia and anemia, as well as hypogammaglobulinemia (Supplementary Table S1). Bone marrow aspiration revealed a poor cellularity and fat involution (reflecting likely the nutritional deficiency state) without malignant cells. Considering kidney failure, a biopsy was made and revealed an acute interstitial nephritis without glomerular lesions. 18F-FDG PET/CT-scan showed several hypermetabolic lesions (tonsil, lung nodules, and parenchyma) but no hypermetabolism of the spleen. Within a couple of days, the condition of the patient worsened with hypoxemia requiring increasing level of oxygen despite probabilistic antibiotherapy (sulfamethoxazole/trimethoprim for *Pneumocystis jirovecii* PCR+ in BAL and large-spectrum antibacterial therapy with piperacillin/tazobactam). Corticosteroids were added and transiently improved the respiratory state. A lung biopsy was performed that finally revealed invasive infection by *M. bovis* BCG, suspected by Ziehl-Neelsen coloration and confirmed by PCR and culture (Figure 2B). The *M. bovis* BCG strain was also found in the bone marrow and blood cultures. The strain was phenotypically susceptible to rifampicin, isoniazid, and ethambutol. *Cryptococcus neoformans* was also identified in lung biopsy but without central nervous system involvement. HIV PCR and serology were negative. Phagocytosis assays were normal, discarding the hypothesis of chronic granulomatous disease.

Despite a treatment regimen of isoniazid, rifampin, pyrazinamide, and ethambutol for BCGosis, initiated before the strain identification, and fluconazole for *Cryptococcus*, the patient state worsened with need for intensive care unit support. Corticosteroids were re-introduced, and G-CSF therapy was added two times per week. We hypothesized a primary or secondary defect in IFN γ pathway, such as an autoimmunization





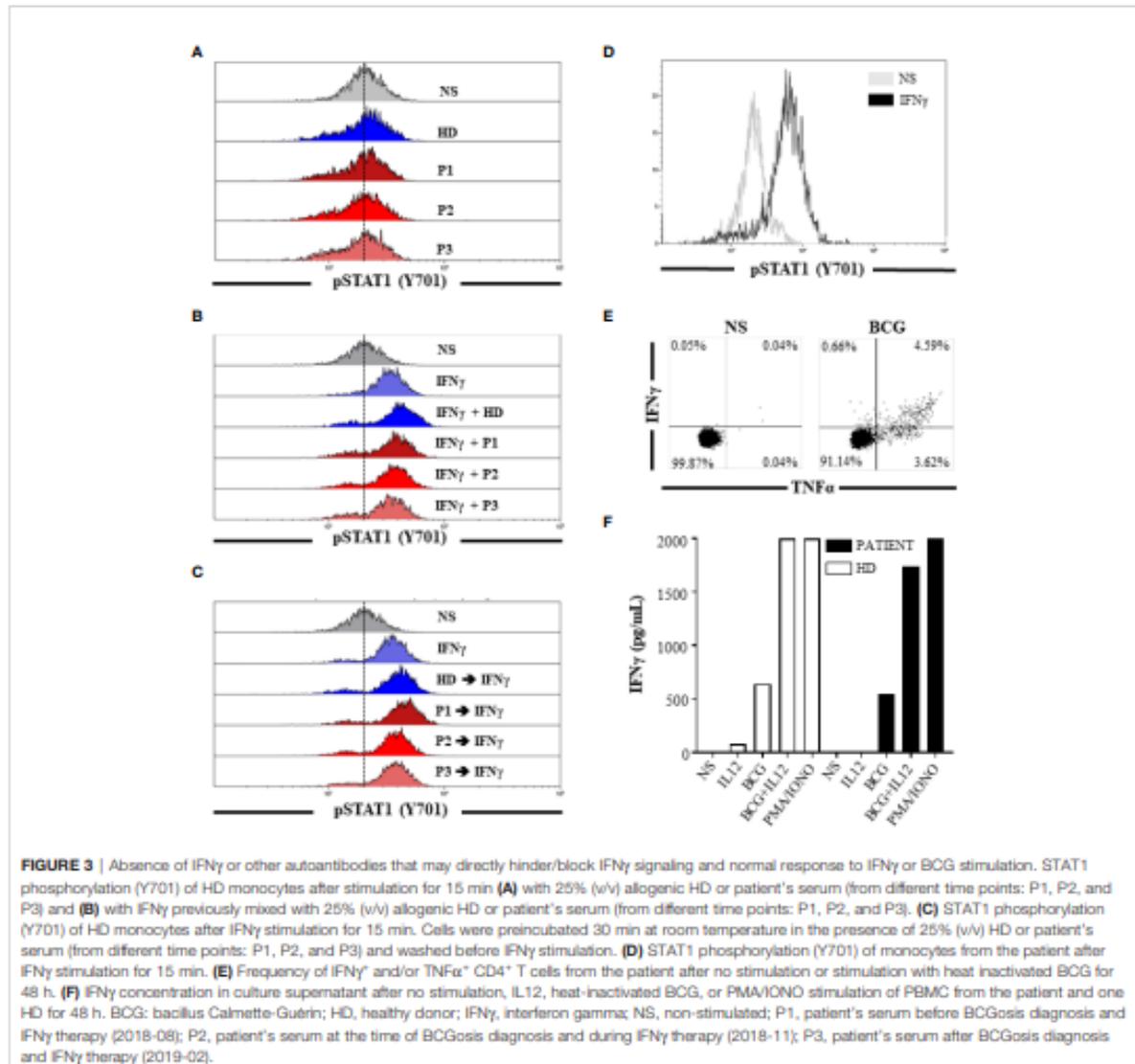
against IFN γ , and we decided to introduce Imukin[®] as an add-on therapy (50 μ g S.C. three times/week and after 2 weeks at 100 μ g S.C. three times/week) (**Supplementary Table S1**). This strategy finally allowed an improvement of the patient's condition with CT-scan and TEP-scan complete normalization after 3 and 6 months, respectively (**Figure 2A**). Interferon therapy was maintained during 12 months with bi-antibiotherapy (rifampicin and isoniazid) and fluconazole after the complete remission in order to avoid any relapse, and 12 months after treatment's discontinuation, the patient remained in complete remission.

Functional Analysis

The patient harbored a severe post-chemotherapy lymphopenia with delayed immune reconstitution of B-cell and T-cell compartment, i.e., very low level of CD19⁺ cells with a selective lack of IgM production, and low levels of naive CD45RA⁺ T cells. CD4/CD8 ratio was conserved in proportion (**Supplementary**

Table S1). The absolute number of monocytes was normal with 55% of classical, 18% of intermediate, and 27% non-classical monocytes.

Potential IFN pathway defects that may lead to ineffective response towards BCG were explored. IFN γ stimulation of peripheral mononuclear cells (PBMCs) from a healthy donor (HD) in the presence of 25% (v/v) allogenic HD or patient's serum (from different time points, i.e., before, during, and after IFN γ therapy) did not impair STAT1 phosphorylation. Similarly, no significant difference in STAT1 phosphorylation was observed when we mixed the IFN γ and the patient's serum before using it to stimulate PBMCs from HD. These results suggested for the absence of anti-IFN γ autoantibodies or any other autoantibodies that may directly hinder/block IFN γ signaling (**Figures 3A–C**). Absence of anti-GM-CSF autoantibodies was also confirmed (data not shown). STAT1 phosphorylation, after IFN γ stimulation of monocytes from the patient, was preserved (**Figure 3D**). CD4⁺ T cells from the



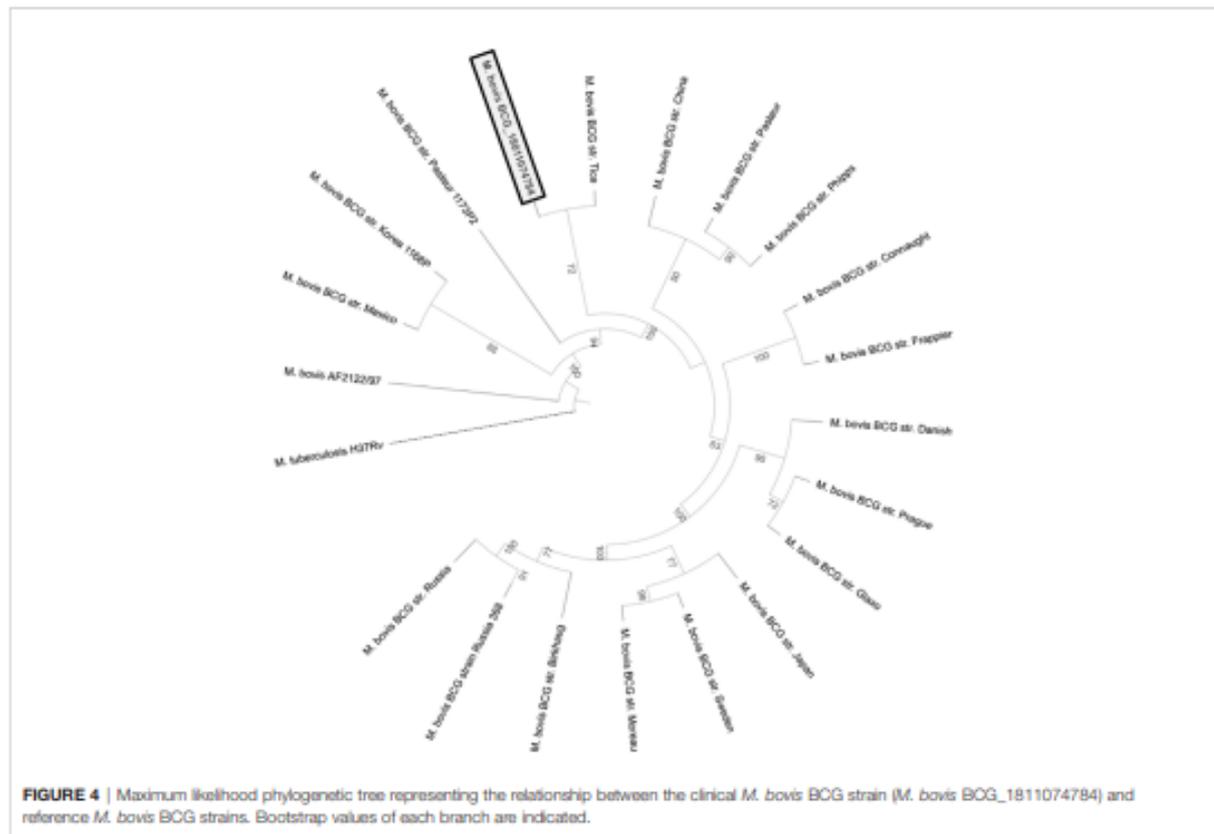
patient responded to BCG (**Figure 3E**) and showed no apparent defect of IFN γ production after BCG \pm IL12 stimulation (**Figure 3F**). Altogether, these results did not support the hypothesis of an IEI or acquired immunodeficiency related to defective host defense mechanisms against BCG.

Genomic Analysis

Whole exome sequencing (WES) was performed but did not reveal/detect any known mutations or unknown variants with high *in silico* predicted consequence (CADD > 10, MAF <

0.005%) involved in MSMD (i.e., *IL12RB1*, *IL12B*, *IL12RB2*, *IL23R*, *IFNGR1*, *IFNGR2*, *STAT1*, *CYBB*, *IRF8*, *SPPL2A*, *TYK2*, *ISG15*, *RORC*, *JAK1*, and *NEMO*) (9). Similarly, no candidate genes of IEI were found (**Supplementary Table S2**).

Whole genome sequencing (WGS) of *M. bovis* BCG strain and comparative phylogenomic analysis with the genomes of reference *M. bovis* BCG strains were performed at the National Reference Center for Mycobacteria and Resistance of Mycobacteria to Antituberculosis (CNR-MyRMA). The results showed that the patient's strain (*M. bovis* BCG_1811074784, **Figure 4**) was most closely related to the *M. bovis* BCG Tice strain.



DISCUSSION

Because of the opportunistic features of infection (severe BCGosis, *Cryptococcus*) and considering the remission of the patient after IFN γ therapy introduction, we suspected a late-onset IEI. However, no rare monogenic causes of genetic susceptibility to tuberculosis, or genetic risk factor such as P1104A *TYK2* allele (10), were found; neither did we find other known pathogenic variants involved in IEI. Although we cannot totally exclude the existence of some unknown genetic susceptibility factors not evidenced by our WES analysis, the fact that the patient was vaccinated several times (because of anergy to the intradermoreaction test) with BCG vaccine during infancy and did not develop any symptom argues against an IEI. Moreover, none of his relatives were infected by BCG or other mycobacteria, even after exposition to BCG for vaccination. Additionally, no intrinsic defect in IFN γ production or IFN γ response was detected. Anti-cytokine autoantibodies are known to be a cause of adult-onset infection susceptibility (also called “phenocopies” of IEI) (1, 11–13), but the presence of anti-IFN γ or anti-GM-CSF has been excluded.

Finally, WGS and comparative phylogenomic analysis of the isolated *M. bovis* BCG revealed that this clinical strain was more closely related to the *M. bovis* BCG Tice. *M. bovis* BCG vaccine strains were derived by the repeated *in vitro* passage of *M. bovis*

leading to its attenuation. The original BCG strain was distributed to many laboratories all around the world, which, in turn, carried out subcultures, generating daughter strains named according to their geographical origin. The BCG Tice strain is actually used as adjunctive therapy for superficial bladder cancer (OncoTICE[®]). Intravesical instillation of BCG for bladder cancer has been previously reported to be responsible for disseminated BCGosis in both immunocompromised and immunocompetent patients (7, 8, 14–16). The delay for BCGosis development is usually lower than 1 year, and some authors argued that the strain used in bladder installation could correlate with the frequency and severity of BCGosis (17). However, no vesical instillations were performed in our case and the results of the phylogenomic comparison might suggest the possibility of an acquired BCG infection during one of the chemotherapy sessions with an infection that remained latent during several months before becoming invasive. Interestingly, some cases of BCGosis have also been reported in patients with hematological malignancies who had never received intravesical BCG instillation (18–21), and a possible role of iatrogenic infection through central catheter was suggested (22) (**Supplementary Table S3**). Most of these cases were already linked to BCG Tice strain; the possible mechanism could be environmental contamination through aerosol generation during intra-vesical instillation or colonization of the outside of the central catheter by colonized gloves (18–21).

PERSPECTIVES

We report herein one case of severe BCGosis, possibly linked to intrahospital acquisition of the BCG Tice strain. We excluded the possibility of an underlying IEI and we showed an unexpected relationship between the secondary immunodeficiency of the patient, due to the lymphoma and its treatment, and the acquired BCG infection. Using IFN γ therapy in association with antibiotherapy, corticosteroids, and G-CSF, the patient progressively recovered with a complete remission after several months. Although only assumptions about the origin of this contamination can be made from this single case, physicians, especially hematologists and oncologists, as well as pharmacists and microbiologists should be aware of the risk of disseminated BCGosis in immunocompromised patients treated in centers that administrate BCG for bladder cancers.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The original contributions presented in the study are included in the article/**Supplementary Material**. Further inquiries can be directed to the corresponding author.

ETHICS STATEMENT

The patient's written consent was obtained.

REFERENCES

- Liew W-K, Thoon K-C, Chong C-Y, Tan NWH, Cheng D-T, Chan BSW, et al. Juvenile-Onset Immunodeficiency Secondary to Anti-Interferon-Gamma Autoantibodies. *J Clin Immunol* (2019) 39:512–8. doi: 10.1007/s10875-019-00652-1
- Bustamante J, Boisson-Dupuis S, Abel L, Casanova J-L. Mendelian Susceptibility to Mycobacterial Disease: Genetic, Immunological, and Clinical Features of Inborn Errors of IFN- γ Immunity. *Semin Immunol* (2014) 26:454–70. doi: 10.1016/j.smim.2014.09.008
- Al-Muhsen S, Casanova J-L. The Genetic Heterogeneity of Mendelian Susceptibility to Mycobacterial Diseases. *J Allergy Clin Immunol* (2008) 122:1043–51. doi: 10.1016/j.jaci.2008.10.037
- Fekrvand S, Yazdani R, Olbrich P, Gennery A, Rosenzweig SD, Condino-Neto A, et al. Primary Immunodeficiency Diseases and Bacillus Calmette-Guérin (Bcg)-Vaccine-Derived Complications: A Systematic Review. *J Allergy Clin Immunol Pract* (2020) 8:1371–86. doi: 10.1016/j.jaip.2020.01.038
- Saharia KK, Koup RA. T Cell Susceptibility to HIV Influences Outcome of Opportunistic Infections. *Cell* (2013) 155:505–14. doi: 10.1016/j.cell.2013.09.045
- Girardi E, Sabin CA, d'Arminio Monforte A, Hogg B, Phillips AN, Gill MJ, et al. Incidence of Tuberculosis Among HIV-Infected Patients Receiving Highly Active Antiretroviral Therapy in Europe and North America. *Clin Infect Dis* (2005) 41:1772–82. doi: 10.1086/498315
- Oladiran O, Nwosu I, Oladunjoye A, Oladunjoye O. Disseminated BCG Sepsis Following Intravesical Therapy for Bladder Carcinoma: A Case Report and Review of Literature. *J Community Hosp Internat Med Perspect* (2020) 10:168–70. doi: 10.1080/20009666.2020.1742475
- To U, Kim J, Chia D. Disseminated BCG: Complications of Intravesical Bladder Cancer Treatment. *Case Rep Med* (2014) 2014:e362845. doi: 10.1155/2014/362845

AUTHOR CONTRIBUTIONS

VG, A-SK, and AG contributed to conception and design of the study. YD, FM, WS, AM, NW, LJ, FH, CK, SJ, FS, PB, YH, FD, A-SK, and AG contributed to the collection of the data. VG, YD, FM, WS, RC, FS, PB, and AG performed the analysis. VG and AG wrote the first draft of the manuscript. YD, FM, WS, RC, AM, NW, LJ, FH, CK, SJ, FS, PB, YH, FD, A-SK, and AG wrote sections of the manuscript. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the physicians who helped us to take care of the patient reported in the manuscript. We thank the "Hôpitaux Universitaires de Strasbourg" for their support; the ERNs (European Reference Networks for rare disease), RITA (Rare Immunodeficiency, Autoinflammatory and Autoimmune Diseases), and ReCONNET (European Reference Network on Rare and Complex Connective Tissue and Musculoskeletal Diseases); and the INTERREG V program [PERSONALIS project, co-financed by the European regional development fund (ERDF)].

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2021.696268/full#supplementary-material>

- Bousfiha A, Jeddane L, Picard C, Al-Herz W, Ailal F, Chatila T, et al. Human Inborn Errors of Immunity: 2019 Update of the IUIS Phenotypical Classification. *J Clin Immunol* (2020) 40:66–81. doi: 10.1007/s10875-020-00758-x
- Boisson-Dupuis S, Ramirez-Alejo N, Li Z, Patin E, Rao G, Kerner G, et al. Tuberculosis and Impaired IL-23-Dependent IFN- γ Immunity in Humans Homozygous for a Common TYK2 Missense Variant. *Sci Immunol* (2018) 3(30):eaau8714. doi: 10.1126/sciimmunol.aau8714
- Browne SK, Holland SM. Anticytokine Autoantibodies in Infectious Diseases: Pathogenesis and Mechanisms. *Lancet Infect Dis* (2010) 10:875–85. doi: 10.1016/S1473-3099(10)70196-1
- Uchida K, Beck DC, Yamamoto T, Berclaz P-Y, Abe S, Staudt MK, et al. Gm-Csf Autoantibodies and Neutrophil Dysfunction in Pulmonary Alveolar Proteinosis. *N Engl J Med* (2007) 356:567–79. doi: 10.1056/NEJMoa062505
- Kampmann B, Hemingway C, Stephens A, Davidson R, Goodsall A, Anderson S, et al. Acquired Predisposition to Mycobacterial Disease Due to Autoantibodies to IFN- γ . *J Clin Invest* (2005) 115:2480–8. doi: 10.1172/JCI19316
- Pérez-Jacoste Asin MA, Fernández-Ruiz M, López-Medrano F, Lumbrenas C, Tejido A, San Juan R, et al. Bacillus Calmette-Guérin (Bcg) Infection Following Intravesical Bcg Administration as Adjuvant Therapy For Bladder Cancer. *Med (Baltimore)* (2014) 93(17):236–54. doi: 10.1097/MD.0000000000000119
- Lukacs S, Tschobotko B, Szabo NA, Symes A. Systemic BCG-Osis as a Rare Side Effect of Intravesical Bcg Treatment for Superficial Bladder Cancer. *Case Rep Urol* (2013) 2013:821526. doi: 10.1155/2013/821526
- Westhovens IM, Vanden Abeele M-E, Messiaen PE, van der Hilst JC. Systemic BCG Infection in a Patient With Pancytopenia and Fever 9 Years After Intravesical BCG Administration for Bladder Cancer. *BMJ Case Rep* (2016) 2016:bcr2016215599. doi: 10.1136/bcr-2016-215599
- Levi LI, Schlemmer F, de Castro N, Brun O, Veziris N, Argemi X, et al. Bacillus Calmette-Guérin Infection Following Intravesical Instillation: Does the Strain Matter? *Med Mal Infect* (2019) 49:350–5. doi: 10.1016/j.medmal.2018.11.014

18. Coppes MJ, Olivieri NF, Howes M, Pusic M, Gold R, Richardson SE. Mycobacterial Brain Abscess Possibly Due to Bacille Calmette-Guérin in an Immunocompromised Child. *Clin Infect Dis* (1992) 14:662–5. doi: 10.1093/cid/14.3.662
19. Stone MM, Vannier AM, Storch SK, Peterson C, Nitta AT, Zhang Y. Meningitis Due to Iatrogenic Bcg Infection in Two Immunocompromised Children. *New Engl J Med* (1995) 333:561–3. doi: 10.1056/NEJM199508313330905
20. Waecker NJ, Stefanova R, Cave MD, Davis CE, Dankner WM. Nosocomial Transmission of Mycobacterium Bovis Bacille Calmette-Guérin to Children Receiving Cancer Therapy and to Their Health Care Providers. *Clin Infect Dis* (2000) 30:356–62. doi: 10.1086/313652
21. Vos MC, de Haas PEW, Verbrugh HA, Renders NHM, Hartwig NG, de Man P, et al. Nosocomial Mycobacterium Bovis-Bacille Calmette-Guérin Infections Due to Contamination of Chemotherapeutics: Case Finding and Route of Transmission. *J Infect Dis* (2003) 188:1332–5. doi: 10.1086/379034
22. Meije Y, Martinez-Montauti J, Caylà JA, Loureiro J, Ortega L, Clemente M, et al. Healthcare-Associated Mycobacterium Bovis-Bacille Calmette-Guérin (Bcg) Infection in Cancer Patients Without Prior BCG Instillation. *Clin Infect Dis* (2017) 65:1136–43. doi: 10.1093/cid/cix496

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 Gies, Dieudonné, Morel, Sougikoff, Carapito, Martin, Weingartner, Jacquel, Hubele, Kuhnert, Jung, Schramm, Boyer, Hausmann, Danion, Korganow and Guffroy. 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 2: Maitre T, Ok V, **Morel F**, Bonnet I, Sougakoff W, Robert J, Trosini V, Caumes E, Aubry A, Veziris N. Sampling strategy for bacteriological diagnosis of intrathoracic tuberculosis. *Respir Med Res.* 2021 May;79:100825. doi: 10.1016/j.resmer.2021.100825. Epub 2021 Apr 27. PMID: 33971432.



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 R35, 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).

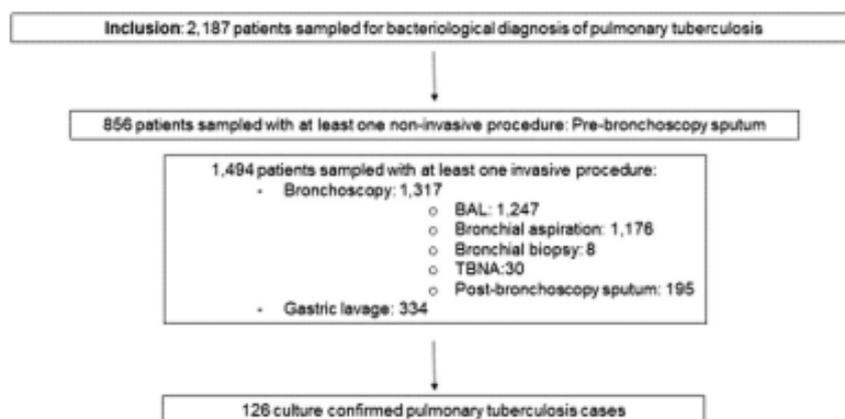


Fig. 1. Flow chart of the study design.

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).

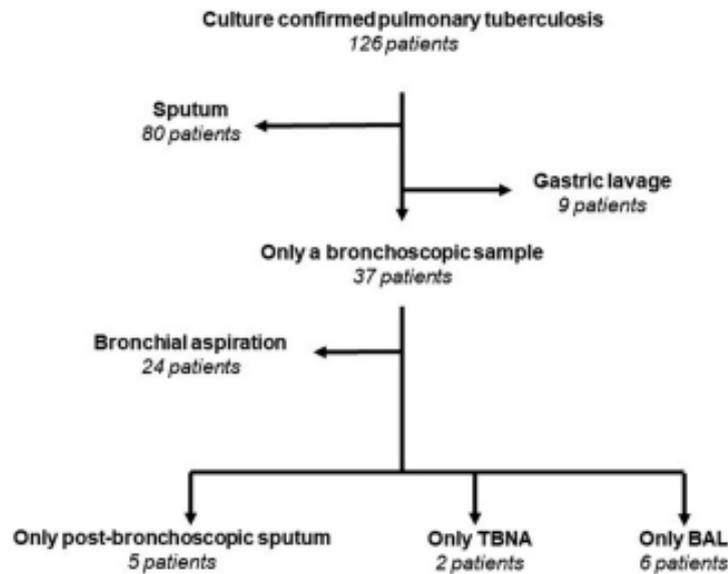


Fig. 2. Distribution of *M. tuberculosis* complex positive culture specimens leading to 126 pulmonary tuberculosis diagnoses: BAL: bronchiolo-alveolar lavage; TBNA: trans-bronchial needle aspiration.

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

- World Health Organization. Global tuberculosis report. Geneva; 2019. p. 27–73.
- Story A, Antoine D. Editorial. Tuberculose et inégalités de santé. *Bull Epidemiol Hebd* 2020;194–5.
- 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>.
- Nienhaus A, Gariepy 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>.
- 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>.
- 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>.
- Valade S, Raikine 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.
- Gehanno J-F, Abteboul 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>.
- 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>.
- Urbanowski ME, Ordóñez 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).
- 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>.
- 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>.
- 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>.
- 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>.
- 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>.
- 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.0000000000000161>.
- 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>.
- Nelson SM, Delke MA, Cartwright CP. Value of examining multiple sputum specimens in the diagnosis of pulmonary tuberculosis. *J Clin Microbiol* 1998;36:467–9.
- 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.
- 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>.
- Lewinsohn DM, Leonard MK, LoBue PA, Cobn 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>.
- 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>.
- 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>.
- Navani N, Molyneux 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>.
- 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/juoeh.42.223>.
- 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>.
- 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>.
- 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>.
- Lin C-K, Keng L-T, Lin 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>.
- BIDRAD. 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>.
- 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>.
- 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>.
- 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.jmimet.2017.01.011>.
- 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).
- 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>.
- 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.
- Cracco C, Fattoukh M, Prodanovic H, Azoulay E, Chenivesse 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>.
- 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>.
- 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>.
- Malek Mohammad 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>.
- Patel VB, Theron G, Lenders I, 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>.
- 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>.

Publication 3: Morel F, Jaffré J, Sougakoff W, Aubry A, Veziris N. Place de la biologie moléculaire dans le diagnostic de la tuberculose [*Molecular diagnosis of tuberculosis*]. Rev Mal Respir. 2020 May;37(5):412-416. French. doi: 10.1016/j.rmr.2019.09.004. Epub 2020 Apr 22. PMID: 32334967.



Disponible en ligne sur

ScienceDirect
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France

EM|consulte
www.em-consulte.com



MINI SÉRIE "GREPI"

Place de la biologie moléculaire dans le diagnostic de la tuberculose[☆]



Molecular diagnosis of tuberculosis

F. Morel^a, J. Jaffré^a, W. Sougakoff^a, A. Aubry^a,
N. Véziris^{b,*}

^a Sorbonne universités, Inserm, centre d'immunologie et des maladies infectieuses (Cimi-Paris), UMR 1135, laboratoire de bactériologie-hygiène, centre national de référence des mycobactéries, assistance publique-hôpitaux de Paris, Paris

^b Sorbonne universités, Inserm, centre d'immunologie et des maladies infectieuses (Cimi-Paris), UMR 1135, département de bactériologie, hôpitaux universitaires de l'Est Parisien, centre national de référence des mycobactéries, assistance publique-hôpitaux de Paris, Paris

Reçu le 14 juin 2019 ; accepté le 24 septembre 2019

Disponible sur Internet le 22 avril 2020

MOTS CLÉS

Tuberculose ;
Diagnostic ;
Biologie moléculaire ;
Valeur prédictive des tests ;
Antituberculeux

Résumé La tuberculose est due au complexe *M. tuberculosis*, dont la croissance lente entraîne un long délai de rendu des tests phénotypiques utilisés pour le diagnostic bactériologique. La biologie moléculaire a réduit considérablement ce délai, notamment grâce au déploiement de la méthode Xpert[®] MTB/RIF (Cepheid) qui permet de détecter le complexe *M. tuberculosis* et la résistance à la rifampicine en 2 heures. D'autres tests détectant en plus la résistance à l'isoniazide et aux antituberculeux de seconde ligne ont été développés. Cependant, les performances de ces tests sont nettement moins bonnes si l'examen microscopique est négatif. Il est donc crucial de restreindre leur indication aux fortes suspicions cliniques. Les tests de détection de la résistance n'explorent que certaines positions caractérisées ; or, toutes les mutations responsables de l'acquisition de résistance ne sont pas connues. De plus, les performances sont variables pour les différents antituberculeux. L'avènement du séquençage génomique est une perspective prometteuse. La faisabilité en routine doit encore être évaluée et l'analyse des données reste à standardiser. L'essor des techniques de biologie moléculaire a révolutionné le diagnostic de la tuberculose et de la résistance. Cependant, elles restent des tests de dépistage dont les résultats doivent être confrontés aux méthodes phénotypiques de référence.

© 2020 Publié par Elsevier Masson SAS au nom de SPLF.

[☆] Ce texte a été rédigé à l'occasion de la communication orale de N. Véziris lors des 6e Journées du Groupe pour la recherche et l'enseignement en pneumo-infectiologie (GrepI) de la Société de pneumologie de langue française.

* Auteur-correspondant. Département de bactériologie, hôpitaux universitaires de l'Est Parisien, 184, rue du Faubourg Saint-Antoine, 75012 Paris.

Adresse e-mail : nicolas.veziris@sorbonne-universite.fr (N. Véziris).

<https://doi.org/10.1016/j.rmr.2019.09.004>

0761-8425/© 2020 Publié par Elsevier Masson SAS au nom de SPLF.

KEYWORDS

Tuberculosis;
Diagnosis;
Molecular biology;
Predictive value of
tests;
Antituberculous
agents

Summary Tuberculosis is caused by the *M. tuberculosis* complex. Its slow growth delays the bacteriological diagnosis based on phenotypic tests. Molecular biology has significantly reduced this delay, notably thanks to the deployment of the Xpert® MTB/RIF test (Cepheid), which detects the *M. tuberculosis* complex and rifampicin resistance in 2 hours. Other tests detecting isoniazid and second-line antituberculous drugs resistance have been developed. However, the performances of molecular tests are significantly reduced if the acid-fast bacilli microscopy screening is negative. It is therefore crucial to limit their indication to strong clinical suspicions. Resistance detection tests only explore certain characterized positions; however, not all drug-resistance mutations are known. Moreover, the performances vary for different antituberculous drugs. The advent of genomic sequencing is promising. Its integration into routine workflow still needs to be evaluated and the data analysis remains to be standardized. The rise of molecular biology techniques has revolutionized the diagnosis of tuberculosis and drug resistance. However, they remain screening tests; results still have to be confirmed by phenotypic reference methods.

© 2020 Published by Elsevier Masson SAS on behalf of SPLF.

La tuberculose est une infection due aux bactéries du complexe *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis sensu stricto* ou bacille de Koch, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. cannetii*, *M. orygis*, *M. caprae*). Le diagnostic bactériologique repose depuis la première description de *M. tuberculosis* sur des techniques phénotypiques. Ces dernières s'attachent à caractériser le comportement de la bactérie : modification après coloration, croissance dans certains milieux de culture en présence ou pas d'antibiotiques, etc.

En dehors de l'examen microscopique après coloration, toutes ces techniques nécessitent une phase de croissance *in vitro* (également appelée culture). Compte tenu de la lenteur de division de *M. tuberculosis* (environ 12 à 24 heures) [1], la détection d'une culture positive se fait après un délai qui se compte en semaines. Les stratégies diagnostiques et thérapeutiques se sont adaptées à cette lenteur et ont en particulier inclus l'absence de connaissance de la sensibilité aux antibiotiques au début du traitement, conduisant à la quadrithérapie actuelle qui permet de s'assurer de l'activité contre les souches sensibles mais également résistantes à l'isoniazide.

Diagnostic de la tuberculose maladie

Les tests génotypiques reposant sur l'amplification et la détection des acides nucléiques (ADN ou ARN) permettent de s'affranchir de l'étape de culture et donc d'envisager un raccourcissement des délais de diagnostic de la tuberculose. En pratique ces tests se sont avérés tout à fait performants sur des prélèvements avec bacilles acido-alcoolo-résistants (BAAR) à l'examen microscopique et ont permis dans ces cas de confirmer que ces BAAR appartenaient bien au complexe *M. tuberculosis* et non pas à une espèce de mycobactérie non tuberculeuse. Les performances sont beaucoup moins bonnes sur les prélèvements dans lesquels on ne voit pas

de BAAR à l'examen microscopique. En effet, parmi ces derniers, la proportion de ceux qui contiennent effectivement des bacilles tuberculeux (qui seront *in fine* positifs en culture) est très faible, soit de l'ordre de 5 %. Par conséquent, les quelques faux positifs générés par le petit manque de spécificité des tests génotypiques se trouvent être aussi nombreux que les quelques vrais positifs. La valeur prédictive positive (VPP) de ces tests sur prélèvements BAAR négatifs est donc très faible. Devant ce constat, deux pistes d'amélioration sont possibles :

- améliorer les performances intrinsèques des tests génotypiques ;
- mieux cibler les indications de ces tests.

L'amélioration des performances des tests est difficile à apprécier à la lecture de la littérature. En effet, les premières études d'un test sont souvent très encourageantes par rapport aux performances constatées en routine. Le [Tableau 1](#) montre l'évolution de la sensibilité sur plusieurs générations et met en évidence une grande hétérogénéité. Si la dernière version du test Xpert® MTB/RIF dite Ultra semble présenter une meilleure sensibilité par rapport à la version originale, il faut savoir que ce gain de sensibilité s'est fait au prix d'une moins bonne spécificité qui va donc se traduire par une nouvelle baisse de la VPP [2,3]. L'augmentation de sensibilité peut donc avoir un intérêt dans des pays de prévalence élevée de tuberculose tandis que, dans des pays de faible prévalence, c'est la spécificité qui est la plus importante.

L'option la plus réaliste pour améliorer la VPP est de bien sélectionner les indications des tests génotypiques pour le diagnostic de tuberculose. De ce fait, la probabilité de tuberculose dite pré-test étant améliorée, la VPP s'améliorera aussi. Par exemple, si le test Xpert® MTB/RIF est réalisé en France sur un patient infecté par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH), sans domicile fixe, présentant une toux depuis plus de deux semaines [4] la VPP

Tableau 1 Sensibilité des tests génotypiques pour la détection de *M. tuberculosis complex* parmi des prélèvements respiratoires sans BAAR à l'examen microscopique (M-) [2,7,20,21].

Référence	Type d'étude	Technologie	Sensibilité parmi M- respiratoires
Sarmiento et al. [20]	Méta-analyse	Plusieurs	72 %
Boehme et al. [7]	Étude prospective	Xpert® MTB/RIF	72 %
Steingart et al. [21]	Méta-analyse	Xpert® MTB/RIF	67 %
Dorman et al. [2]	Étude prospective	Xpert® MTB/RIF Ultra	63 %
Chakravorty et al., <i>mBio</i> 2017	Étude prospective et rétrospective	Xpert® MTB/RIF Ultra	79 %
Opota et al., <i>J. Clin. Microbiol.</i> 2019	Étude prospective	Xpert® MTB/RIF Ultra	92 %

devrait monter à 92 %. En pratique, si un tel test a été pratiqué sur un patient ayant une faible suspicion clinique et qu'il revient positif, il convient de refaire le test sur un autre prélèvement avant de retenir le diagnostic. Un tel raisonnement est appliqué couramment depuis des années pour la sérologie VIH.

Diagnostic de la résistance aux antituberculeux

La résistance aux antituberculeux émerge quand un traitement est administré en monothérapie : on parle alors de résistance acquise ou secondaire. Un patient hébergeant une telle souche peut, s'il a une tuberculose contagieuse, contaminer son entourage qui aura alors une tuberculose avec résistance d'emblée : on parlera alors de résistance primaire. Du fait de cette transmission interhumaine, il n'est pas possible de prévoir la sensibilité aux antibiotiques devant un nouveau cas de tuberculose (à part si on connaît le contaminateur) et il est donc indispensable de réaliser une mesure de la sensibilité aux antibiotiques (antibiogramme).

Comme pour l'identification, la première méthode décrite et qui reste la référence à ce jour est une méthode phénotypique. Il s'agit de la méthode des proportions. Il faut rappeler ici que c'est une méthode mise au point en France et dont l'article princeps a été publié dans l'ancêtre de la *Revue des Maladies Respiratoires* qui s'appelait alors la *Revue de Tuberculose et de Pneumologie* [5]. Sans rentrer dans les détails de cette méthode, il faut savoir qu'elle a été élaborée pour dépasser une complexité propre à la tuberculose, qui est la lenteur du processus de sélection de mutants résistants. Cette lenteur a pour conséquence la coexistence pendant plusieurs mois de bacilles résistants et sensibles chez un même patient. La méthode des proportions mesure précisément cette proportion de bacilles résistants au sein de la population bacillaire totale. Par convention, il a été défini une proportion critique de bacilles résistants au sein de la population totale de 1 %. Quand la population bacillaire résistante dépasse 1 % de la population totale, la souche est catégorisée comme résistante.

L'inconvénient des méthodes phénotypiques est leur délai, le résultat étant en général disponible 1 à 2 mois après le début du traitement. Le diagnostic génotypique de la résistance aux antituberculeux repose, lui, sur la mise en évidence de mutations dans des gènes impliqués dans la

résistance. Les tests moléculaires de détection de la résistance aux antituberculeux ont permis de considérablement diminuer le délai de rendu en l'abaissant à 2-3 jours. Ces tests nécessitent donc de connaître les gènes impliqués dans la résistance et l'impact de chaque mutation sur celle-ci. C'est la raison pour laquelle les tests commercialisés en France reposent sur l'analyse de certaines positions qui sont connues comme impliquées dans la résistance. L'avantage de cette approche est que la spécificité est en général très bonne, mais pas la sensibilité, ce qui se traduit par une bonne VPP mais une moins bonne valeur prédictive négative. Dit autrement, ces tests font le diagnostic de la résistance mais pas de la sensibilité aux antibiotiques. Les kits commercialisés en France (tels que les kits Genotype® MTBDRplus et MTBDRsl, Hain Lifesciences) peuvent être utilisés avec de l'ADN extrait à partir de colonies bactériennes obtenues par culture, mais également directement à partir de prélèvements cliniques.

Le test le plus répandu est celui qui fait le diagnostic de la résistance à la rifampicine. Il repose sur l'analyse d'une petite portion du gène *rpoB* (qui code la sous unité bêta de l'ARN polymérase, qui est la cible de la rifampicine). La première démonstration de la possibilité de ce diagnostic génotypique date de 25 ans [6], mais c'est la technologie totalement automatisée de PCR en temps réel Xpert®MTB/RIF (Cepheid) qui, il y a une dizaine d'années, a démocratisé ce diagnostic en le rendant accessible à des laboratoires non équipés pour le diagnostic moléculaire [7]. Ce test, qui permet en environ 2 heures de détecter à la fois le complexe *M. tuberculosis* et la résistance à la rifampicine, est désormais recommandé en France pour tout nouveau cas de tuberculose, qu'il soit diagnostiqué par culture ou sur prélèvement par l'examen microscopique (BAAR +) [8]. Cette recommandation est rendue possible par la diffusion large de la technique Xpert® MTB/RIF et est justifiée par le fait que 90 % des souches résistantes à la rifampicine le sont aussi à l'isoniazide et sont donc multirésistantes. Leur identification rapide permet donc de mettre en route précocement une prise en charge diagnostique et thérapeutique adaptée, mais aussi de prévenir la sélection de bacilles résistants. Il faut toutefois noter que les limites annoncées plus haut s'appliquent ici aussi. Un diagnostic de résistance à la rifampicine chez un patient sans facteurs de risque de résistance a 1 chance sur 2 d'être un faux résistant. Il convient dans ce cas de figure de répéter le test, idéalement sur un autre prélèvement avec une autre technique.

Tableau 2 Sensibilité et spécificité des tests Xpert® MTB/RIF, MTBDRplus et MTBDRsl pour le diagnostic de la résistance aux antituberculeux [22–25].

	Gène cible	Test	Sensibilité	Spécificité
Rifampicine	<i>rpoB</i>	MTBDRplus	98 %	99 %
		Xpert® MTB/RIF	94 %	98 %
Isoniazide	<i>katG</i> , promoteur d' <i>inhA</i>	MTBDRplus	84 %	99 %
Fluoroquinolones	<i>gyrA</i> , <i>gyrB</i> (V2)	MTBDRsl	87 % (95 %V2)	97 %
Amikacine	<i>rrs</i>		83 %	99 %
Kanamycine	<i>rrs</i> , promoteur d' <i>eis</i> (V2)		44 % (91 % V2)	99 %
Capréomycine	<i>rrs</i>		82 %	97 %
Ethambutol	<i>embB</i>		68 %	80 %

S'agissant des autres antituberculeux, les performances sont variables, allant de bonnes pour l'isoniazide et les fluoroquinolones à médiocres pour la kanamycine ou l'éthambutol (Tableau 2). On voit donc que le diagnostic génotypique des résistances aux antituberculeux a fait de grands progrès et permet aujourd'hui une accélération du diagnostic des résistances. Il faut toutefois connaître quelques limites de ces tests :

- tous les mécanismes de résistance ne sont pas connus : les tests actuels ne reposant que sur l'analyse d'une portion du génome, ils ont par définition une sensibilité < 100 % [9] ;
- certaines mutations ne confèrent pas la résistance voire peuvent conférer une sensibilité accrue [10–12] ;
- toutes les mutations ne sont pas équivalentes dans le niveau de résistance qu'elles entraînent ;
- les techniques génotypiques ont des performances médiocres en cas de population hétérogène, qui est la situation pour laquelle la méthode des proportions a été mise au point (cf supra) [13–15].

Pour toutes ces raisons, les tests génotypiques de diagnostic de la résistance aux antituberculeux doivent être considérés aujourd'hui comme des tests de dépistage qui nécessitent la confirmation par la technique de référence qui reste l'antibiogramme phénotypique.

Enfin, les techniques de séquençage complet du génome permettent en théorie de s'affranchir des limites des tests actuels puisqu'au lieu de n'étudier qu'une portion du génome, elles l'analysent entièrement. Cependant, les données générées par ces nouvelles techniques sont volumineuses et nécessitent l'implémentation d'algorithmes d'analyse standardisés. Les premières études montrent effectivement des performances meilleures mais qui ne sont pour l'instant pas encore applicables en routine car :

- elles restent hétérogènes d'une étude à l'autre [16,17] ;
- des résultats prometteurs n'ont pas encore été confirmés dans des études de routine prenant en compte les délais de prise en charge des patients [18,19].

Déclaration de liens d'intérêts

Les auteurs déclarent ne pas avoir de liens d'intérêts.

Points forts

- La biologie moléculaire permet de réduire considérablement le délai diagnostique de la tuberculose.
- Cependant, les performances des tests sont nettement moins bonnes dans le cas d'un examen microscopique négatif.
- Ainsi, il est crucial de bien cibler les indications du diagnostic moléculaire en fonction du niveau de suspicion clinique et des résultats de l'examen microscopique.
- L'antibiogramme phénotypique reste la méthode de référence pour le diagnostic de la résistance aux antituberculeux. Cependant, son délai de rendu est long (un à deux mois).
- Les tests moléculaires de détection de la résistance aux antituberculeux, qui sont très spécifiques mais peu sensibles, ont permis d'abaisser considérablement ce délai à 2-3 jours.
- La technologie Xpert® MTB/RIF (Cepheid) a permis à de nombreux laboratoires de faire le diagnostic de la résistance à la rifampicine. Ce test est désormais recommandé en France pour tout nouveau cas de tuberculose du fait de la probabilité très élevée de multirésistance en cas de détection de résistance à la rifampicine.
- Cependant, les tests moléculaires restent des tests de dépistage dont les résultats doivent être confirmés par l'antibiogramme phénotypique.

Références

- [1] Harshey RM, Ramakrishnan T. Rate of ribonucleic acid chain growth in *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *J Bacteriol* 1977;129:616–22.
- [2] 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.
- [3] Kendall EA, Schumacher SG, Denkinger CM, et al. Estimated clinical impact of the Xpert MTB/RIF Ultra cartridge for diagnosis of pulmonary tuberculosis: A modeling study. *PLOS Med* 2017;14:e1002472.
- [4] Guthmann J-P. Épidémiologie de la tuberculose en France en 2015. Impact de la suspension de l'obligation vaccinale BCG sur la tuberculose de l'enfant. *Bull Epidemiol Hebd* 2017;2007–2015:116–26.

- [5] Canetti G, Rist N, Grosset J. Mesure de la sensibilité du bacille tuberculeux aux drogues antibacillaires par la méthode des proportions: méthodologie, critères de résistance, résultats, interprétation. *Rev Tuberc Pneumol* 1963;27:217–72.
- [6] Telenti A, Imboden P, Marchesi F, et al. Detection of rifampicin-resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *Lancet* 1993;341:647–50.
- [7] Boehme CC, Nabeta P, Hillemann D, et al. Rapid molecular detection of tuberculosis and rifampin resistance. *N Engl J Med* 2010;363:1005–15.
- [8] HCSP. Tuberculoses à bacilles résistants: diagnostic et prise en charge. Paris: Haut Conseil de la Santé Publique; 2014.
- [9] Makhado NA, Matabane E, Faccin M, et al. Outbreak of multidrug-resistant tuberculosis in South Africa undetected by WHO-endorsed commercial tests: an observational study. *Lancet Infect Dis* 2018;18:1350–9.
- [10] Aubry A, Sougakoff W, Bodzongo P, et al. First evaluation of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from Congo revealed misdetection of fluoroquinolone resistance by line probe assay due to a double substitution T80A-A90G in GyrA. *PLoS One* 2014;9:e95083.
- [11] Villellas C, Coeck N, Meehan CJ, et al. Unexpected high prevalence of resistance-associated Rv0678 variants in MDR-TB patients without documented prior use of clofazimine or bedaquiline. *J Antimicrob Chemother* 2016.
- [12] Bernard C, Veziris N, Brossier F, et al. Molecular diagnosis of fluoroquinolone resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2015;59:1519–24.
- [13] Folkvardsen DB, Svensson E, Thomsen VØ, et al. Can molecular methods detect 1 % isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*? *J Clin Microbiol* 2013.
- [14] Zetola NM, Shin SS, Tumedli KA, et al. Mixed *Mycobacterium tuberculosis* complex infections and false-negative results for rifampin resistance by GeneXpert MTB/RIF are associated with poor clinical outcomes. *J Clin Microbiol* 2014;52:2422–9.
- [15] Bernard C, Aubry A, Chauffour A, et al. In vivo *Mycobacterium tuberculosis* fluoroquinolone resistance emergence: a complex phenomenon poorly detected by current diagnostic tests. *J Antimicrob Chemother* 2016;71:3465–72.
- [16] Papaventsis D, Casali N, Kontsevaya I, et al. Whole genome sequencing of *Mycobacterium tuberculosis* for detection of drug resistance: a systematic review. *Clin Microbiol Infect* 2017;23:61–8.
- [17] Quan TP, Bawa Z, Foster D, et al. Evaluation of whole-genome sequencing for mycobacterial species identification and drug susceptibility testing in a clinical setting: A large-scale prospective assessment of performance against line probe assays and phenotyping. *J Clin Microbiol* 2018;56.
- [18] Shea J, Halse TA, Lapierre P, et al. Comprehensive whole-genome sequencing and reporting of drug resistance profiles on clinical cases of *Mycobacterium tuberculosis* in New York state. *J Clin Microbiol* 2017;55:1871–82.
- [19] Consortium CRyPTIC, the 100,000 Genomes Project, et al. Prediction of susceptibility to first-line tuberculosis drugs by DNA sequencing. *N Engl J Med* 2018;379:1403–15.
- [20] Sarmiento OL, Weigle KA, Alexander J, et al. Assessment by meta-analysis of PCR for diagnosis of smear-negative pulmonary tuberculosis. *J Clin Microbiol* 2003;41:3233–40.
- [21] Steingart KR, Schiller I, Horne DJ, et al. Xpert® MTB/RIF assay for pulmonary tuberculosis and rifampicin resistance in adults. *Cochrane Database Syst Rev* 2014 [CD009593].
- [22] Steingart KR, Sohn H, Schiller I, et al. Xpert® MTB/RIF assay for pulmonary tuberculosis and rifampicin resistance in adults. *Cochrane Database Syst Rev* 2013 [CD009593].
- [23] Feng Y, Liu S, Wang Q, et al. Rapid diagnosis of drug resistance to fluoroquinolones, amikacin, capreomycin, kanamycin and ethambutol using Genotype MTBDRsl assay: A meta-analysis. *PLoS ONE* 2013;8:e55292.
- [24] 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;54:1573–80.
- [25] Ling DI, Zwerling AA, Pai M, et al. assays for the diagnosis of multidrug-resistant tuberculosis: a meta-analysis. *Eur Respir J* 2008;32:1165–74.

Publication 4: 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 (Basel)*. 2021 Jun 30;10(7):797. doi: 10.3390/antibiotics10070797. PMID: 34208899; PMCID: PMC8300793.



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



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/>).

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

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 MTBDR^{plus} (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 MTBDR^{plus}

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 (n)	Susceptible (n)	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 (<i>n</i>)	Susceptible (<i>n</i>)	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 κ = 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 MTBDRplus 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 MTBDRplus, 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 MTBDRplus 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 MTBDRplus 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 (ELITeGroup 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, L.; 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. Opoa, 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]

Publication 5: Veziris N, Bonnet I, **Morel F**, Guglielmetti L, Maitre T, Fournier Le Ray L, Sougakoff W, Robert J, Aubry A; CNR MyRMA; Members of the CNR-MyRMA (French National Reference Center for Mycobacteria). Impact of the revised definition of extensively drug-resistant tuberculosis. Eur Respir J. 2021 Aug 19;58(2):2100641. doi: 10.1183/13993003.00641-2021. PMID: 33926973.



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^a	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

^a: 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 Veziris ¹, Isabelle Bonnet², Florence Morel², Lorenzo Guglielmetti², Thomas Maitre ³, Laure Fournier Le Ray³, Wladimir Sougakoff², Jérôme Robert² and Alexandra Aubry², on behalf of the CNR MyRMA⁴

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^a	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

^a: 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 Veziris ¹, Isabelle Bonnet², Florence Morel², Lorenzo Guglielmetti², Thomas Maitre ³, 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>

Publication 6: Maitre T, Morel F, Brossier F, Sougakoff W, Jaffre J, Cheng S, Veziris N, Aubry A, On Behalf of the NRC-MyRMA. How a PCR Sequencing Strategy Can Bring New Data to Improve the Diagnosis of Ethionamide Resistance. Microorganisms. 2022 Jul 15;10(7):1436. doi: 10.3390/microorganisms10071436. PMID: 35889155; PMCID: PMC9316172.



Article

How a PCR Sequencing Strategy Can Bring New Data to Improve the Diagnosis of Ethionamide Resistance

Thomas Maitre ^{1,2,3,†}, Florence Morel ^{1,2,*} , Florence Brossier ^{1,2,‡}, Wladimir Sougakoff ^{1,2,‡}, Jérémy Jaffre ^{1,2}, Sokleaph Cheng ¹, Nicolas Veziris ^{1,2,4}, Alexandra Aubry ^{1,2,*} and on behalf of the NRC-MyRMA [§]

¹ Centre National de Référence des Mycobactéries et de la Résistance des Mycobactéries aux Antituberculeux, Hôpital Pitié-Salpêtrière, AP-HP (Assistance Publique Hôpitaux de Paris), Sorbonne-Université, F-75013 Paris, France; thomas.maitre@aphp.fr (T.M.); florence.morel2@aphp.fr (F.M.); florence.brossier@aphp.fr (F.B.); wladimir.sougakoff@aphp.fr (W.S.); jeremy.jaffre@aphp.fr (J.J.); sokleaph.cheng@aphp.fr (S.C.); nicolas.veziris@sorbonne-universite.fr (N.V.)

² Centre d'Immunologie et des Maladies Infectieuses, Sorbonne Université, INSERM, U1135, Cimi-Paris, F-75013 Paris, France

³ Department of Pneumology and Thoracic Oncology, Reference Centre for Rare Lung Diseases, Tenon Hospital, AP-HP, F-75020 Paris, France

⁴ Département de Bactériologie, AP-HP, Hôpital Saint-Antoine, Sorbonne-Université, F-75012 Paris, France

* Correspondence: alexandra.aubry@sorbonne-universite.fr; Tel.: +33-1-40-77-97-68

† These authors contributed equally to this work.

‡ Deceased.

§ The members of the CNR MyRMA (French National Reference Center for Mycobacteria) are: Isabelle Bonnet, Emmanuelle Cambau, Faiza Mougari, Vichita Ok, Jérôme Robert.



Citation: Maitre, T.; Morel, F.; Brossier, F.; Sougakoff, W.; Jaffre, J.; Cheng, S.; Veziris, N.; Aubry, A.; on behalf of the NRC-MyRMA. How a PCR Sequencing Strategy Can Bring New Data to Improve the Diagnosis of Ethionamide Resistance. *Microorganisms* **2022**, *10*, 1436. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10071436>

Academic Editor: Véronique Fontaine

Received: 11 June 2022

Accepted: 10 July 2022

Published: 15 July 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/>).

Abstract: Ethionamide (ETH) is a second-line antituberculosis drug. ETH resistance (ETH-R) is mainly related to the mutations of the monooxygenase-activating ETH (EthA), the ETH target (InhA), and the *inhA* promoter. Nonetheless, diagnosing ETH-R is still challenging. We assessed the strategy used for detecting ETH-R at the French National Reference Center for Mycobacteria in 497 MDR-TB isolates received from 2008 to 2016. The genotypic ETH's resistance detection was performed by sequencing *ethA*, *ethR*, the *ethA-ethR* intergenic region, and the *inhA* promoter in the 497 multidrug-resistant isolates, whereas the phenotypic ETH susceptibility testing (PST) was performed using the reference proportion method. Mutations were found in up to 76% of the 387 resistant isolates and in up to 28% of the 110 susceptible isolates. Our results do not support the role of *ethR* mutations in ETH resistance. Altogether, the positive predictive value of our genotypic strategy to diagnose ETH-R was improved when only considering the variants included in the WHO catalogue and in other databases, such as TB-Profiler. Therefore, our work will help to update the list of mutations that could be graded as being associated with resistance to improve ETH-R diagnosis.

Keywords: ethionamide; tuberculosis; resistance; molecular diagnosis

1. Introduction

The emergence of multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB), i.e., resistant to at least rifampin and isoniazid (INH), further threatens TB control worldwide [1]. MDR-TB remains challenging to treat, requiring second-line anti-TB drugs such as ethionamide (ETH).

Over the past several years, molecular techniques have been developed for the rapid detection of resistance to antituberculous agents since the quick detection of drug resistance is crucial for designing appropriate antituberculosis drug regimens, preventing treatment failure and/or relapse, and reducing the spread of drug-resistant isolates. Molecular assays for the detection of mutations related to resistance have been increasingly used and have led to shortening the time to detection of resistance to one working day [2].

Ethionamide (ETH) is a derivative of isonicotinic acid that is structurally similar to INH. ETH and INH are pro-drugs requiring activation by different pathways: the KatG

catalase-peroxidase for INH and the EthA monooxygenase (negatively regulated by EthR) for ETH [3]. ETH and INH have a common target: the enoyl-ACP reductase InhA. EthA is a NADPH-specific flavin adenine dinucleotide-containing monooxygenase and a Baeyer-Villiger monooxygenase and is involved in cell wall biosynthesis [4,5]. Previous studies have reported that mutations of *ethA* and *inhA* are the main mutations reported in ETH-R strains: *ethA* mutations caused 37% to 100% of ETH-R in *M. tuberculosis*, and mutations in *inhA* caused 25% to 100% of ETH-R in *M. tuberculosis*, whereas mutations in EthR and the *inhA* promoter were less frequent [6,7].

The increasing use of genotypic diagnosis of resistance in tuberculosis management requires the extensive study and classification of mutations identified in genes involved in drug resistance, i.e., genotypic/phenotypic correlation. For ETH, only 24 mutations were confidently graded by the WHO as being associated with resistance in *ethA*, *inhA*, and the promoter region of *inhA*, which stresses the need to add new data enabling an update to that list (without taking into account the mutations graded as “uncertain significance” that are listed in the extended catalogue [8]).

Therefore, the present study aimed to investigate the prevalence of mutations in *ethA*, *ethR*, the *inhA* gene, and the promoter region of *inhA* associated with independent resistance to ethionamide (ETH-R) in *M. tuberculosis* isolates based on a prospective genotyping strategy used at the French National Reference Center (NRC) for Mycobacteria to diagnose ETH-R.

2. Materials and Methods

2.1. Mycobacterium tuberculosis Complex Clinical Isolates

A total of 497 MDR *M. tuberculosis* complex isolates from TB cases diagnosed in France and received at the French National Reference Center for Mycobacteria were collected over a 9-year (2008–2016) period. On the basis of the results of DST, the 497 MDR isolates were classified as ETH-R ($n = 387$) or as susceptible to ETH (ETH-S) ($n = 110$) (Table 1).

Table 1. Mutations in *ethA*, *inhA* and its promoter, *ethR*, and *ethA-ethR* intergenic region for the 387 ETH-R MDR-TB isolates.

N° of Isolates	Sequencing Results *				
	<i>ethA</i>	<i>inhA</i> Promoter	<i>inhA</i>	<i>ethR</i>	<i>ethA-ethR</i> Intergenic Region
1	MLR	wt	np	wt	wt
2	G11S	wt	np	wt	wt
2	S15P	c-15t	np	wt	wt
1	A19V	g-17t	np	wt	wt
1	H22P	wt	np	wt	wt
1	H22P	c-15t	np	wt	wt
3	H22P	c-15t	np	F110L	wt
1	C27W	wt	np	wt	wt
1	C27W	g-17t	np	wt	wt
1	G36D	wt	np	wt	wt
1	G42V, P334A	wt	np	wt	wt
1	F48S	wt	np	wt	wt
1	Y50C	wt	np	wt	wt
1	S55C	wt	np	wt	wt
1	F66L, G299D	wt	np	wt	wt
1	G78D	c-15t	np	wt	wt
1	A89E, S266R	wt	np	wt	wt
1	A89E, R99Q, S266R	wt	np	wt	a-9g
1	D95N	wt	np	wt	wt
1	D95N	c-15t	S94A	wt	wt
1	D95N	c-15t	np	wt	wt

Table 1. Cont.

N° of Isolates	Sequencing Results *				
	<i>ethA</i>	<i>inhA</i> Promoter	<i>inhA</i>	<i>ethR</i>	<i>ethA-ethR</i> Intergenic Region
1	W109 !	wt	np	wt	wt
1	G124D	wt	np	wt	wt
2	L136R	<u>t-8a</u>	np	wt	wt
2	C137R	wt	np	wt	wt
1	G139D	wt	np	wt	wt
2	Y140 !	wt	np	wt	wt
1	Y141C, I367_ins_7nt	wt	np	M142I, Q143K	wt
1	<u>Y147!</u>	wt	np	wt	wt
6	<u>Q165P</u>	wt	np	wt	wt
2	W167G	wt	np	wt	wt
1	S183R	<u>c-15t</u>	np	wt	wt
1	P192S	<u>c-15t</u>	np	wt	wt
1	P192T	wt	np	wt	wt
1	V202G	wt	np	wt	wt
1	<u>Q206 !</u>	wt	np	wt	wt
2	S208 !	wt	np	wt	wt
1	Y211S	<u>c-15t</u>	np	wt	wt
1	<u>E223K</u>	<u>c-15t</u>	np	wt	wt
1	N226D	wt	np	wt	wt
3	V238G	wt	np	wt	wt
1	R239L	wt	np	wt	wt
1	Q254P	<u>c-15t</u>	np	wt	wt
1	W256 !	wt	np	wt	wt
4	P257S	<u>c-15t</u>	np	wt	wt
3	S266R	wt	np	wt	wt
1	S266R	wt	np	D23G	wt
9	<u>Q269 !</u>	<u>c-15t</u>	np	wt	wt
1	<u>Q269 !</u>	<u>c-15t</u>	np	wt	a-9g
1	L272P	wt	np	wt	wt
4	H281P	<u>c-15t</u>	np	wt	wt
1	C294Y	<u>c-15t</u>	np	wt	wt
1	I305N	wt	np	wt	wt
2	T314I	wt	np	wt	wt
2	T314I	<u>c-15t</u>	np	wt	wt
1	T314I	<u>t-8c</u>	np	wt	wt
1	I337V	WT	V78A	wt	wt
3	<u>I338S</u>	<u>c-15t</u>	np	wt	wt
1	<u>T342K</u>	wt	np	wt	wt
1	M372R	wt	np	wt	wt
2	N379D	wt	np	wt	wt
1	<u>G385D</u>	wt	np	wt	wt
2	C403R	wt	np	wt	wt
2	P422L	wt	np	wt	wt
2	L440P	wt	np	wt	wt
1	Q449R	wt	np	wt	wt
1	D464G	wt	np	wt	wt
1	R471P	<u>c-15t</u>	np	wt	wt
1	R483T	wt	np	wt	wt
1	32_del_g	wt	np	wt	wt
1	57_ins_4nt	<u>t-8c</u>	np	wt	wt
1	109_del_a	<u>t-8c</u>	np	wt	wt
19	<u>110_del_a</u>	wt	np	wt	wt
1	<u>110_del_a</u>	<u>t-8c</u>	np	wt	wt
1	137_del_a	<u>t-8c</u>	np	wt	wt
1	328_ins_t	wt	np	wt	wt

Table 1. Cont.

N° of Isolates	Sequencing Results ^a				
	<i>ethA</i>	<i>inhA</i> Promoter	<i>inhA</i>	<i>ethR</i>	<i>ethA-ethR</i> Intergenic Region
1	373_ins_a	<u>c-15t</u>	np	wt	wt
1	390_del_c	wt	np	wt	wt
1	437_ins_g	wt	np	wt	wt
1	477_del_g	wt	np	wt	wt
1	509_del_a	wt	np	M102T	wt
1	522_del_c	wt	np	wt	wt
1	537-790_del	wt	np	wt	wt
1	626_del_cc	wt	np	wt	wt
3	639_del_gt	wt	np	wt	wt
5	703_del_t	wt	np	wt	wt
1	751_del_a	wt	np	wt	wt
1	752_ins_g	wt	np	wt	wt
9	768_del_g	wt	np	wt	wt
1	778_del_a	<u>c-15t</u>	np	wt	wt
2	831-837_del	<u>c-15t</u>	np	wt	wt
4	884_del_t	wt	np	wt	wt
1	935_ins_t	wt	np	wt	wt
1	1010_del_t	wt	np	wt	wt
1	1034_del_a	wt	np	wt	wt
1	1054_del_g	<u>t-8c</u>	np	wt	wt
1	1061_ins_c	<u>c-15t</u>	np	wt	wt
1	1222_del_t	wt	np	wt	wt
6	1242_del_t	wt	np	wt	wt
1	1281_ins_a	wt	np	wt	wt
1	1292_del_t	wt	np	wt	wt
1	1292_del_t	wt	np	wt	a-9g
1	1343_del_a	<u>c-15t</u>	np	wt	wt
1	1391_ins_a	<u>c-15t</u>	np	wt	wt
1	1431_ins_t	WT	np	wt	wt
1	1466_del_tt	<u>c-15t</u>	np	wt	wt
5	1470_del_g	wt	np	wt	wt
1	933-1737_del	wt	np	wt	a-40g
3	large deletion	wt	np	large deletion	large deletion
1	large deletion	wt	np	wt	wt
1	wt	wt	<u>S94A</u>	wt	wt
1	wt	wt	<u>S94A</u>	wt	wt
1	wt	wt	<u>S94A</u>	wt	wt
8	wt	wt	wt	wt	a-68g
1	wt	wt	wt	T149A	wt
1	wt	wt	wt	S131R	wt
1	wt	wt	wt	M142L, Q143K	wt
1	wt	wt	wt	P195L	wt
82	wt	<u>c-15t</u>	np	wt	wt
93	wt	wt	WT	wt	wt

Mutations are indicated as amino acids for all proteins encoded by the corresponding genes except for the *inhA* promoter and the *ethA-ethR* intergenic region, for which mutations are indicated in nucleotide. Mutations reported in the WHO catalogue as being associated with ETH-R are bolded and underlined. Mutations not listed in the WHO catalogue but mentioned in other published databases are bolded. Phylogenetic SNPs are indicated in italics. Stop codon is represented with "!". ^a wt: wild-type; mut: mutated; np: not performed.

2.2. Phenotypic Drug Susceptibility Testing and Quality Controls

DST was performed on Löwenstein-Jensen medium using the reference standard proportion method [9] and concentrations of 40 mg/L for ETH [10,11]. Resistance to ETH was defined as a proportion of resistant mutants $\geq 1\%$ at 40 mg/L [10,11]. Quality controls were performed for each new batch of LJ medium containing ETH using the reference

strain *M. tuberculosis* H37Rv. The laboratory underwent external quality validation through the External Quality Assurance (EQA) systems, ensuring the accurate diagnosis of TB and drug-resistant TB through the European TB reference laboratory network (ERLTB-Net) organized by INSTAND.

2.3. DNA Sequencing of Genes Associated with Ethionamide Resistance

For all of the MDR-TB isolates received at the French NRC, the entire *ethA* and *ethR* genes, and the *ethA-ethR* intergenic region were prospectively sequenced, and mutations in the *inhA* promoter region were determined by using the Genotype MTBDRplus test (Hain Lifescience GmbH, Nehren, Germany) according to the manufacturer's instructions. For the isolates in which wild-type *ethA* and *inhA* promoter were observed, the entire *inhA* gene and its promoter were retrospectively sequenced in ETH-R isolates. *EthA*, *ethR*, the *ethA/ethR* intergenic region, and *inhA* and its promoter were amplified and sequenced using the primers previously described [6]. Genomic DNA was isolated from bacteria grown on Lowenstein–Jensen medium. A loop of culture was resuspended in water (500 µL) and inactivated by heating at 95 °C for 15 min. DNA (5 µL) obtained by heat shock extraction (1 min at 95 °C and 1 min in ice, repeated five times) was used for PCR amplification with the following steps: denaturation of 5 min at 95 °C followed by 35 cycles of 1 min at 95 °C, 1 min at the primer-dependent annealing temperature (T_a), 1 min at 72 °C, and a final extension step of 7 min at 72 °C. The PCR products were purified by filtration with Microcon 100 microconcentrators (Amicon Inc., Beverly, MA, USA), and the PCR for Sanger sequencing was conducted using a BigDye Terminator cycle sequencing ready kit (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France).

2.4. Databases

The impact of the mutations on ETH-R was evaluated by looking for those graded as being associated with resistance in the WHO catalogue. For those not graded as being associated with ETH-R in the catalogue, we checked if they were listed in other published databases, such as TB-Profiler [12,13], PhyResSE [14], and the one published by Manson et al. [15].

2.5. Statistical Analysis

The proportion of the ETH-R and ETH-S isolates with the different mutations were compared using Fisher's exact test. The *p* values were two-tailed, and *p* values of ≤ 0.05 were considered significant. Sensitivity, specificity, positive predictive value, and negative predictive value of the prospective genotypic strategy used at the French NRC were determined by considering the phenotypic DST as the reference standard. Since the entire *inhA* gene was only sequenced retrospectively in ETH-R isolates displaying wild-type *ethA* and the *inhA* promoter, it is not considered as part of the prospective genotypic strategy.

3. Results

Among the 497 MDR-TB isolates, 78% ($n = 387$) were classified as ETH-R and 22% ($n = 110$) as ETH-S by phenotypic DST (Tables 1 and 2). A total of 123 mutations were evidenced in *ethA*, *ethR*, the *ethA/ethR* intergenic region, and *inhA* and its promoter.

Most of the alterations observed had never been reported, no matter their susceptibility to ETH [6,16–19], and only 6 (5%) were cited as being associated with resistance in the WHO catalogue [20], and 20 additional mutations among the 123 (17%) were cited in published databases of drug resistance mutations (Tables 1 and 2). Altogether, among the 387 ETH-R isolates, 294 (76%) had at least one mutation in *ethA*, *ethR*, the *ethA-ethR* intergenic region, and the *inhA* promoter, and 93 (24%) had no mutation, whereas among the 110 ETH-S isolates, 79 (72%) had no mutations in *ethA*, *ethR*, the *ethA-ethR* intergenic region, and the *inhA* promoter, and 31 (28%) had at least one mutation ($p < 10^{-5}$) (Table 1).

Table 2. Mutations in *ethA*, *inhA* and its promoter, *ethR*, and *ethA-ethR* intergenic region for the 110 ETH-S MDR-TB isolates.

N° of Isolates	Sequencing Results ^a				
	<i>ethA</i>	<i>inhA</i> Promoter	<i>inhA</i>	<i>ethR</i>	<i>ethA-ethR</i> Intergenic Region
2	I9T	wt	np	wt	wt
1	G11D	wt	np	wt	wt
2	D95N, 768_del_g	wt	np	wt	wt
1	C131Y	wt	np	wt	wt
2	W167S, S266R	wt	np	S131R	wt
1	I178S	wt	np	wt	wt
3	S266R	wt	np	wt	wt
1	C294Y	wt	np	wt	wt
1	T314I	wt	np	wt	wt
1	P334A	wt	np	wt	wt
1	N379D	wt	np	wt	wt
1	110_del_a	wt	np	wt	wt
1	382_ins_g	wt	np	wt	wt
1	626_del_cc	wt	np	wt	wt
3	703_del_t	wt	np	wt	wt
2	768_del_g	wt	np	wt	wt
1	851_ins_c	wt	np	wt	wt
1	935_ins_t	wt	np	wt	wt
1	1034_del_a	wt	np	wt	wt
1	1242_del_t	wt	np	wt	wt
1	wt	wt	np	65_ins_cg	wt
2	wt	c-15t	np	wt	wt
79	wt	wt	np	wt	wt

Mutations are indicated as amino acids for all proteins encoded by the corresponding genes except for the *inhA* promoter and the *ethA-ethR* intergenic region for which mutations are indicated in nucleotide. Mutations reported in the WHO catalogue as being associated with ETH-R are bolded and underlined. Mutations not listed in the WHO catalogue but mentioned in other published databases are bolded. Phylogenetic SNPs are indicated in italics. ^a wt: wild-type; mut: mutated, np: not performed.

Among the 123 mutations evidenced in *ethA*, *ethR*, the *ethA/ethR* intergenic region, and *inhA* and its promoter, 4 corresponded to phylogenetic SNPs: G124D, S266R, and 768_del_g in *EthA* and V78A in *InhA* (Table 3) [21], and therefore, they have no impact on ETH susceptibility.

Table 3. Performances of the sequencing strategy used to diagnose ETH-R (i.e., PCR sequencing of *ethA*, *inhA* and its promoter, *ethR*, and *ethA-ethR* intergenic region) regarding the criteria used to interpret the results, compared to the phenotypic DST as a gold standard.

Criteria Used to Interpret the Mutations	Sensitivity	Specificity	PPV ^a	NPV ^b
none ^c	78.6	71.8	90.7	48.8
none, <i>ethR</i> mutations excluded	74.9	72.7	90.6	45.2
none, polymorphisms excluded	77.8	76.4	92	49.4
none, polymorphisms and <i>ethR</i> mutations excluded	75.2	76.4	91.8	46.7
WHO catalogue only	36.7	98.2	98.6	30.6
WHO catalogue + databases	53.2	98.2	99.0	37.4
WHO catalogue + databases (<i>ethR</i> mutation excluded)	52.9	98.2	99.0	37.2

^a PPV: positive predictive value; ^b NPV: negative predictive value; ^c all mutations are taken into account.

Among the 123 mutations, 112 (91%) were only evidenced in the ETH-R strains. Among these 112 mutations, after the exclusion of known polymorphisms, 61 (54%) were

the only mutations evidenced, and no other mutation was found in the candidate genes. Among the 112 different mutations that were only observed in ETH-R strains, almost half ($n = 57.5\%$) are reported as being associated with ETH-R in the WHO catalogue and/or other databases (Table 1).

Interestingly, the mutations suspected to have an important impact on protein function (i.e., the introduction of a stop codon and large deletions) were not evidenced at all in the ETH-S strains (Table 2).

By comparing the proportions of the mutated strains in the ETH-R and ETH-S strains per gene, the difference was statistically significant for *ethA* (197/387 (51%) versus 28/110 (25%), $p < 10^{-5}$), the *inhA* promoter (139/387 (36%) versus 2/110 (2%), $p < 10^{-5}$), and the *ethA-ethR* intergenic region (15/387 (4%) versus 0/110 (0%), $p = 0.035$), but not for *ethR* (13/387 (3%) versus 3/110 (3%), $p = 0.74$) (Tables 1 and 2).

By using the phenotypic data as the reference, the genotyping strategy used in the French National Reference Center (NRC) for Mycobacteria had 78.8% sensitivity to diagnose ETH-R, 76.4% specificity, 92.0% positive predictive value (PPV), and 49.4% negative predictive value (NPV) (with the exclusion of known phylogenetic SNPs). Modifying this strategy by deleting *ethR* mutations whose role in ETH-R is unclear [6,22,23] and did not modify its performance (Table 3), whereas only considering the mutations mentioned in the WHO catalogue dramatically increased the PPV performance [20]. Interestingly, when combining the interpretation of the impact of the mutations and the published databases to the WHO catalogue, the sensitivity increased dramatically (36.7% vs. 52.9%), but the PPV of the genotyping strategy used to predict ETH-R only slightly increased at the expense of the NPV value (Table 3).

4. Discussion

The old antibiotic ETH, which was used for a long time to treat drug-resistant TB [1], is benefiting from a renewal since the development of new compounds boosting its activity in vivo [24,25] are currently being assessed in a Phase 1 trial (ClinicalTrials.gov n° NCT04654143).

The increase in the proportion of ETH-R isolates among the MDR-TB isolates received at the French NRC from 2008–2009 (44%) to 2010–2016 (77%) represents a challenge to the existing health care facilities for the management of MDR-TB and XDR-TB who follow programmatic regimens, and this underscores the need for reliable methods for ETH DST [26].

The previously published studies aiming at deciphering the molecular bases of resistance to ETH [6,27–32] had some limitations: Firstly, most of the studies were performed on retrospectively chosen isolates, either ETH-R isolates exclusively or in a high prevalence of ETH-R isolates. Secondly, no study included the sequencing of all of the main genes described as being implicated in ETH-R (i.e., *ethA*, *ethR*, the *ethA-ethR* intergenic region, and *inhA* and its promoter). Therefore, our study prospectively evaluated the performance of a genotypic strategy based on the sequencing of the main genes known to be involved in ETH-R to diagnose ETH-R, which brings useful light into the field, especially as whole genome sequencing becomes widely used, making it even more complex to diagnose the resistance of a drug such as ETH.

Overall, the performance of our genotypic strategy to diagnose ETH-R had suboptimal performance (Table 3). Interestingly, the performance of our genotypic strategy was enhanced by combining the interpretation of the mutations based on the data from the WHO catalogue and other databases (Table 3), as illustrated by the improvement in the specificity (98.2% vs. 76.4%) and the PPV (99.0% vs. 92.0%). Since the role of *ethR* mutations in ETH-R is doubtful, we propose to avoid taking these mutations into account to diagnose ETH-R [6,22,23]. Our genotypic strategy, when either taking the *ethR* mutations into account or not, did not modify the diagnostic performance, confirming the probable lack of involvement in the resistance of *ethR* mutations (Table 3).

In light of these results, carefully analyzing the strains without genotypic/phenotypic correlation is of great interest. The 26 ETH-S isolates with at least one alteration, phylogenetic SNPs excluded (Table 2), may be explained by the fact that (i) the genetic alteration observed is not implicated in ETH-R, (ii) the strains have a low level of ETH-R which is not detected by the phenotypic DST [33–36], or (iii) compensatory mutations restore ETH susceptibility. Other flavin monooxygenases such as EthA2 or MymA are involved in ETH activation [24,37]. These alternative activation pathways may compensate for the impact of mutations in EthA that are suspected to provide a loss of protein function (i.e., deletion or insertion) by restoring susceptibility to ETH despite the presence of an EthA mutation (Table 2). It is worth noticing that no mutations that are suspected to provide an important loss of protein function (stop codon and large deletions) were observed in the ETH-S strains (Table 2). The 96 ETH-R isolates without any mutations (phylogenetic SNPs excluded) may be explained by the fact that (i) mutations are present in genes other than those studied (*mshA*, *Rv3083*, *nah*, *Rv0565c* [38,39]), and (ii) the strains were wrongly classified as resistant by the phenotypic DST (see below).

Overall, both false results questioned the ability of genotyping, but also of phenotypic DST, to properly classify strains as susceptible or resistant. The challenges associated with *M. tuberculosis* DST are well known, especially for ETH. First, the drug is thermolabile, which makes DST difficult [33]. Second, discriminating ETH-resistant and -susceptible strains can be a challenge since the distribution of their Minimum Inhibitory Concentrations (MICs) partially overlap [34]. This is similar to what has been described for ethambutol, supporting the idea that the reporting of strains with MICs close to the ECOFF could be affected by reproducibility issues, as the classification into susceptible or resistant highly depends on methodological variation [34]. Third, ETH DST has been shown to have poor concordance and reproducibility compared to other drugs [35,36]. As previously suggested, creating an intermediate susceptibility classification for ETH-S strains with gene alteration, supported by the unfavorable pharmacodynamic indices, could be warranted to increase reproducibility and to account for methodological variation [34].

Most of the alterations described in our study (about half of the mutations exclusively found in ETH-R strains) had never been described before, and little is currently known about the effects of the different mutations found in *ethA*, *ethR*, and the *ethA-ethR* intergenic region. Therefore, we have provided new data that can contribute to enriching the listed mutations that are associated with ETH-R in the WHO catalogue and other databases.

Author Contributions: Conceptualization, F.B. and A.A.; methodology, T.M., F.M., F.B., W.S. and J.J.; software, T.M., F.M. and F.B.; validation, T.M., F.M., F.B., W.S., J.J., S.C., N.V. and A.A.; formal analysis, F.M., F.B., W.S. and A.A.; investigation, T.M., F.M., F.B., W.S., J.J., S.C., N.V. and A.A.; resources, N.V. and A.A.; data curation, T.M., F.M. and A.A.; writing—original draft preparation, T.M., F.M., W.S., F.B., N.V. and A.A.; writing—review and editing, T.M., F.M., J.J., S.C., N.V. and A.A.; visualization, T.M., F.M., F.B., W.S., J.J., S.C., N.V. and A.A.; supervision, A.A.; project administration, A.A.; funding acquisition, T.M., N.V. and A.A. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by grants from the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), and annual grants from Santé Publique France and Sorbonne Université.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

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

Acknowledgments: We wish to honor the memory of our colleagues, Florence Brossier and Wladimir Sougakoff. We thank all the technicians working at the French NRC for their dedication to this work.

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

References

- World Health Organization WHO. *Consolidated Guidelines on Drug-Resistant Tuberculosis Treatment*; WHO: Geneva, Switzerland, 2019.
- Brossier, F.; Sougakoff, W. French National Reference Center for Mycobacteria. Molecular Detection Methods of Resistance to Antituberculosis Drugs in Mycobacterium Tuberculosis. *Med. Mal. Infect.* **2017**, *47*, 340–348. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Baulard, A.R.; Betts, J.C.; Engohang-Ndong, J.; Quan, S.; McAdam, R.A.; Brennan, P.J.; Locht, C.; Besra, G.S. Activation of the Pro-Drug Ethionamide Is Regulated in Mycobacteria. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 28326–28331. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Dover, L.G.; Alahari, A.; Grattraud, P.; Gomes, J.M.; Bhowruth, V.; Reynolds, R.C.; Besra, G.S.; Kremer, L. EthA, a Common Activator of Thiocarbamide-Containing Drugs Acting on Different Mycobacterial Targets. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2007**, *51*, 1055–1063. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Quémard, A.; Lanéelle, G.; Lacave, C. Mycolic Acid Synthesis: A Target for Ethionamide in Mycobacteria? *Antimicrob. Agents Chemother.* **1992**, *36*, 1316–1321. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Brossier, F.; Veziris, N.; Truffot-Pernot, C.; Jarlier, V.; Sougakoff, W. Molecular Investigation of Resistance to the Antituberculous Drug Ethionamide in Multidrug-Resistant Clinical Isolates of Mycobacterium Tuberculosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2011**, *55*, 355–360. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- DeBarber, A.E.; Mdluli, K.; Bosman, M.; Bekker, L.G.; Barry, C.E. Ethionamide Activation and Sensitivity in Multidrug-Resistant Mycobacterium Tuberculosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 9677–9682. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- World Health Organization. *Target Product Profile for Next-Generation Drug-Susceptibility Testing at Peripheral Centres*; World Health Organization: Geneva, Switzerland, 2021; ISBN 978-92-4-003236-1.
- Canetti, G.; Rist, N.; Grosset, J. Measurement of sensitivity of the tuberculous bacillus to antibiologic drugs by the method of proportions. Methodology, resistance criteria, results and interpretation. *Rev. Tuberc. Pneumol.* **1963**, *27*, 217–272.
- Barrera, L.; Cooreman, E.; de Dieu Iragena, J.; Drobniewski, F.; Duda, P.; Havelkova, M.; Hoffner, S.; Kam, K.M.; Kim, S.J.; Labelle, S.; et al. *Policy Guidance on Drug-Susceptibility Testing (DST) of Second-Line Antituberculosis Drugs*; WHO Guidelines Approved by the Guidelines Review Committee; World Health Organization: Geneva, Switzerland, 2008.
- Kam, K.M.; Sloutsky, A.; Yip, C.W.; Bulled, N.; Seung, K.J.; Zignol, M.; Espinal, M.; Kim, S.J. Determination of Critical Concentrations of Second-Line Anti-Tuberculosis Drugs with Clinical and Microbiological Relevance. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* **2010**, *14*, 282–288.
- Phelan, J.E.; O’Sullivan, D.M.; Machado, D.; Ramos, J.; Oppong, Y.E.A.; Campino, S.; O’Grady, J.; McNerney, R.; Hibberd, M.L.; Viveiros, M.; et al. Integrating Informatics Tools and Portable Sequencing Technology for Rapid Detection of Resistance to Anti-Tuberculous Drugs. *Genome Med.* **2019**, *11*, 41. [[CrossRef](#)]
- Coll, F.; McNerney, R.; Preston, M.D.; Guerra-Assunção, J.A.; Warry, A.; Hill-Cawthorne, G.; Mallard, K.; Nair, M.; Miranda, A.; Alves, A.; et al. Rapid Determination of Anti-Tuberculosis Drug Resistance from Whole-Genome Sequences. *Genome Med.* **2015**, *7*, 51. [[CrossRef](#)]
- Feuerriegel, S.; Schleusener, V.; Beckert, P.; Kohl, T.A.; Miotto, P.; Cirillo, D.M.; Cabibbe, A.M.; Niemann, S.; Fellenberg, K. PhyResSE: A Web Tool Delineating Mycobacterium Tuberculosis Antibiotic Resistance and Lineage from Whole-Genome Sequencing Data. *J. Clin. Microbiol.* **2015**, *53*, 1908–1914. [[CrossRef](#)]
- Manson, A.L.; Cohen, K.A.; Abeel, T.; Desjardins, C.A.; Armstrong, D.T.; Barry, C.E.; Brand, J.; Chapman, S.B.; Cho, S.-N.; et al.; TBResist Global Genome Consortium. Genomic Analysis of Globally Diverse Mycobacterium Tuberculosis Strains Provides Insights into the Emergence and Spread of Multidrug Resistance. *Nat. Genet.* **2017**, *49*, 395–402. [[CrossRef](#)]
- Vilchèze, C.; Jacobs, W.R. Resistance to Isoniazid and Ethionamide in Mycobacterium Tuberculosis: Genes, Mutations, and Causalities. *Microbiol. Spectr.* **2014**, *2*, 2–4. [[CrossRef](#)]
- Leung, K.L.; Yip, C.W.; Yeung, Y.L.; Wong, K.L.; Chan, W.Y.; Chan, M.Y.; Kam, K.M. Usefulness of Resistant Gene Markers for Predicting Treatment Outcome on Second-Line Anti-Tuberculosis Drugs. *J. Appl. Microbiol.* **2010**, *109*, 2087–2094. [[CrossRef](#)]
- Coll, F.; Phelan, J.; Hill-Cawthorne, G.A.; Nair, M.B.; Mallard, K.; Ali, S.; Abdallah, A.M.; Alghamdi, S.; Alsomali, M.; Ahmed, A.O.; et al. Genome-Wide Analysis of Multi- and Extensively Drug-Resistant Mycobacterium Tuberculosis. *Nat. Genet.* **2018**, *50*, 307–316. [[CrossRef](#)]
- Islam, M.M.; Tan, Y.; Hameed, H.M.A.; Liu, Z.; Chhotaray, C.; Liu, Y.; Lu, Z.; Cai, X.; Tang, Y.; Gao, Y.; et al. Detection of Novel Mutations Associated with Independent Resistance and Cross-Resistance to Isoniazid and Prothionamide in Mycobacterium Tuberculosis Clinical Isolates. *Clin. Microbiol. Infect.* **2019**, *25*, 1041.e1–1041.e7. [[CrossRef](#)]
- WHO. *Catalogue of Mutations in Mycobacterium Tuberculosis Complex and Their Association with Drug Resistance*; WHO: Geneva, Switzerland, 2021.
- Coll, F.; McNerney, R.; Guerra-Assunção, J.A.; Glynn, J.R.; Perdigão, J.; Viveiros, M.; Portugal, I.; Pain, A.; Martin, N.; Clark, T.G. A Robust SNP Barcode for Typing Mycobacterium Tuberculosis Complex Strains. *Nat. Commun.* **2014**, *5*, 4812. [[CrossRef](#)]
- Engohang-Ndong, J.; Baillat, D.; Aumercier, M.; Bellefontaine, F.; Besra, G.S.; Locht, C.; Baulard, A.R. EthR, a Repressor of the TetR/CamR Family Implicated in Ethionamide Resistance in Mycobacteria, Octamerizes Cooperatively on Its Operator. *Mol. Microbiol.* **2004**, *51*, 175–188. [[CrossRef](#)]
- Dover, L.G.; Corsino, P.E.; Daniels, I.R.; Cocklin, S.L.; Tatituri, V.; Besra, G.S.; Fütterer, K. Crystal Structure of the TetR/CamR Family Repressor Mycobacterium Tuberculosis EthR Implicated in Ethionamide Resistance. *J. Mol. Biol.* **2004**, *340*, 1095–1105. [[CrossRef](#)]

24. Blondiaux, N.; Moune, M.; Desroses, M.; Frita, R.; Flipo, M.; Mathys, V.; Soetaert, K.; Kiass, M.; Delorme, V.; Djaout, K.; et al. Reversion of Antibiotic Resistance in *Mycobacterium Tuberculosis* by Spiroloxazoline SMARt-420. *Science* **2017**, *355*, 1206–1211. [[CrossRef](#)]
25. Flipo, M.; Frita, R.; Bourotte, M.; Martínez-Martínez, M.S.; Boesche, M.; Boyle, G.W.; Derimanov, G.; Drewes, G.; Gamallo, P.; Ghidelli-Disse, S.; et al. The Small-Molecule SMARt751 Reverses *Mycobacterium Tuberculosis* Resistance to Ethionamide in Acute and Chronic Mouse Models of Tuberculosis. *Sci. Transl. Med.* **2022**, *14*, eaaz6280. [[CrossRef](#)]
26. Centre National de Référence des Mycobactéries et de la Résistance des Mycobactéries aux Antituberculeux Rapport Annuel D'activité. Available online: http://cnrmmyctb.free.fr/IMG/pdf/rapport-CNR-MyRMA-2019b_web.pdf (accessed on 16 July 2021).
27. Coll, F.; Preston, M.; Guerra-Assunção, J.A.; Hill-Cawthorn, G.; Harris, D.; Perdigão, J.; Viveiros, M.; Portugal, I.; Drobniewski, F.; Gagneux, S.; et al. PolyTB: A Genomic Variation Map for *Mycobacterium Tuberculosis*. *Tuberculosis* **2014**, *94*, 346–354. [[CrossRef](#)]
28. Boonaiam, S.; Chairprasert, A.; Prammananan, T.; Leechawengwongs, M. Genotypic Analysis of Genes Associated with Isoniazid and Ethionamide Resistance in MDR-TB Isolates from Thailand. *Clin. Microbiol. Infect.* **2010**, *16*, 396–399. [[CrossRef](#)]
29. Lee, H.; Cho, S.N.; Bang, H.E.; Lee, J.H.; Bai, G.H.; Kim, S.J.; Kim, J.D. Exclusive Mutations Related to Isoniazid and Ethionamide Resistance among *Mycobacterium Tuberculosis* Isolates from Korea. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* **2000**, *4*, 441–447.
30. Malinga, L.; Brand, J.; Jansen van Rensburg, C.; Cassell, G.; van der Walt, M. Investigation of Isoniazid and Ethionamide Cross-Resistance by Whole Genome Sequencing and Association with Poor Treatment Outcomes of Multidrug-Resistant Tuberculosis Patients in South Africa. *Int. J. Mycobacteriol.* **2016**, *5* (Suppl. S1), S36–S37. [[CrossRef](#)]
31. Morlock, G.P.; Metchock, B.; Sikes, D.; Crawford, J.T.; Cooksey, R.C. EthA, InhA, and KatG Loci of Ethionamide-Resistant Clinical *Mycobacterium Tuberculosis* Isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2003**, *47*, 3799–3805. [[CrossRef](#)]
32. Rueda, J.; Realpe, T.; Mejia, G.I.; Zapata, E.; Rozo, J.C.; Ferro, B.E.; Robledo, J. Genotypic Analysis of Genes Associated with Independent Resistance and Cross-Resistance to Isoniazid and Ethionamide in *Mycobacterium Tuberculosis* Clinical Isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2015**, *59*, 7805–7810. [[CrossRef](#)]
33. Lefford, M.J.; Mitchison, D.A. Comparison of Methods for Testing the Sensitivity of *Mycobacterium Tuberculosis* to Ethionamide. *Tubercle* **1966**, *47*, 250–261. [[CrossRef](#)]
34. Schön, T.; Juréen, P.; Chryssanthou, E.; Giske, C.G.; Sturegård, E.; Kahlmeter, G.; Hoffner, S.; Angeby, K.A. Wild-Type Distributions of Seven Oral Second-Line Drugs against *Mycobacterium Tuberculosis*. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* **2011**, *15*, 502–509. [[CrossRef](#)]
35. Lakshmi, R.; Ramachandran, R.; Syam Sundar, A.; Rehman, F.; Radhika, G.; Kumar, V. Optimization of the Conventional Minimum Inhibitory Concentration Method for Drug Susceptibility Testing of Ethionamide. *Int. J. Mycobacteriol.* **2013**, *2*, 29–33. [[CrossRef](#)]
36. Kaniga, K.; Cirillo, D.M.; Hoffner, S.; Ismail, N.A.; Kaur, D.; Lounis, N.; Metchock, B.; Pfyffer, G.E.; Venter, A. A Multilaboratory, Multicountry Study To Determine MIC Quality Control Ranges for Phenotypic Drug Susceptibility Testing of Selected First-Line Antituberculosis Drugs, Second-Line Injectables, Fluoroquinolones, Clofazimine, and Linezolid. *J. Clin. Microbiol.* **2016**, *54*, 2963–2968. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Grant, S.S.; Wellington, S.; Kawate, T.; Desjardins, C.A.; Silvis, M.R.; Wivagg, C.; Thompson, M.; Gordon, K.; Kaznyanskaya, E.; Nietupski, R.; et al. Baeyer-Villiger Monooxygenases EthA and MymA Are Required for Activation of Replicating and Non-Replicating *Mycobacterium Tuberculosis* Inhibitors. *Cell Chem. Biol.* **2016**, *23*, 666–677. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Hicks, N.D.; Carey, A.F.; Yang, J.; Zhao, Y.; Fortune, S.M. Bacterial Genome-Wide Association Identifies Novel Factors That Contribute to Ethionamide and Prothionamide Susceptibility in *Mycobacterium Tuberculosis*. *MBio* **2019**, *10*, e00616-19. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Grau, T.; Selchow, P.; Tigges, M.; Burri, R.; Gitzinger, M.; Böttger, E.C.; Fussenegger, M.; Sander, P. Phenylethyl Butyrate Enhances the Potency of Second-Line Drugs against Clinical Isolates of *Mycobacterium Tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2012**, *56*, 1142–1145. [[CrossRef](#)]

Publication 7: 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;11:707244. doi: 10.3389/fcimb.2021.707244. PMID: 34778100; PMCID: PMC8586210.



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:

Guillaume 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 (CIM-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 (anti-TB) 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 anti-TB 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, spoligotyping

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 MTR/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 MTBDRol 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
Total	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
Total	112
Strains	
Liquid	39
Solid	55
Total	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-DiaMTBCComplex™ 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*, *thiA*, *gyrA*, *gyrB*, *ethA*, *rrl*, *rplC*, and *rr0678*. 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 successful 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		
	≥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,b,c,d}	49 ^d	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.

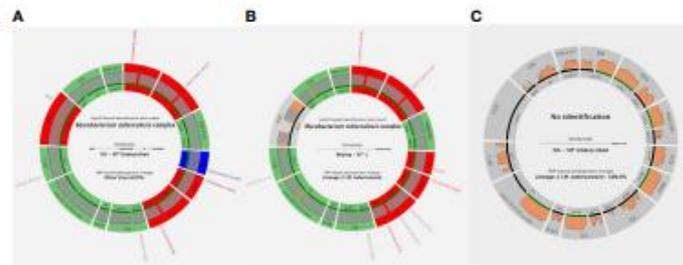


FIGURE 1 | Three examples of Deeplex Myc-TB results. **(A)** Successful Deeplex Myc-TB result. **(B)** Successful Deeplex Myc-TB result with deletion in *ethA*. **(C)** Failed Deeplex Myc-TB result. *hsp65*-based identification best match, spoligotype, and SNP-based lineage identification are shown in 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-gioB* for streptomycin (SM); *gyrA-gyrB* for fluoroquinolones (FQ); *els* for kanamycin (KAN); *ms* for amikacin, capreomycin, and kanamycin (AMI-CAP-KAN); *tyaA* for CAP, *ethA* for ETH, *rplC-rrf* for linezolid (LNZ); and *rv0678* for bedaquiline-clofazimine (BDO-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 >100x on average, and in orange if the read depth is <100x 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 SNUVs 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 (83/81)	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 LN2-R strains with no detectable mutations in *rrl* nor in *rplC*.

^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 ^h 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, MTBC 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 Mtb15-9 codes, while nine isolates of SIT 53 were linked to eight different MIRU Mtb15-9 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 Mtb15-9 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 antiTB 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 (Vilchèze 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 antiTB drugs. Most importantly, *fgd1*, *fbtC*, *fbtA*, *fbtB*, and *ddn* are very interesting targets for predicting resistance to pretomanid, a very promising antiTB 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/Deeplex 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 Deeplex 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/Deeplex Myc-TB approach for MTBC strain diagnosis makes this combined technology very promising for routine use in TB laboratory diagnosis, surveillance, and epidemiological investigations. Deeplex 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 Deeplex Myc-TB tool. The automated web application provided with the Deeplex 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 Deeplex 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/Deeplex 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 Deeplex 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., Ngunjiri, 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 DeepSeq[®]-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/femsrev/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 AnyplexTM 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
- Kamblí, 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., Agterveld, 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., Crighton, 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 Alfenaar, 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., Rüsche-Gerdes, S., Locht, 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
- Pfiffer, 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
- Rasoahaniharisoa, 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., Rüsche-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
- Vanhongenweg, J., Kwara, 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
- Zaunbrecher, 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 8: Le Ray LF, Aubry A, Sougakoff W, Revest M, Robert J, Bonnet I, Veziris N, Morel F. *atpE* Mutation in *Mycobacterium tuberculosis* Not Always Predictive of Bedaquiline Treatment Failure. *Emerg Infect Dis.* 2022 May;28(5):1062-1064. doi: 10.3201/eid2805.212517. PMID: 35447056; PMCID: PMC9045433.

***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

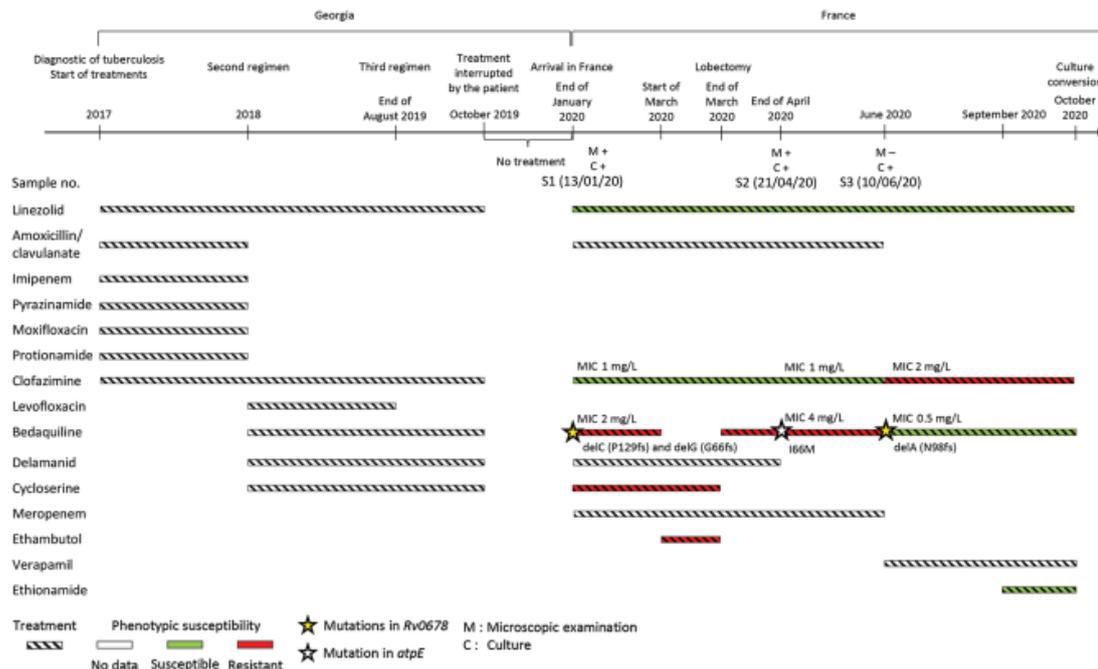


Figure. Timeline of treatment regimen and microbiologic data for patient with multidrug-resistant tuberculosis before and after his arrival in France from Georgia. Timeline for each antibiotic indicates treatment (striped), phenotypic resistance (red), and susceptibility (green), as indicated in patient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

II. Travaux portant sur la recherche de mécanismes de résistance aux fluoroquinolones chez *M. tuberculosis* non liés à l'ADN gyrase

Les travaux relatifs à cet objectif sont présentés dans la publication en préparation présentée ci-après (Publication 9). Ces travaux ont consisté en la recherche de mécanismes moléculaires de résistance aux FQ non liés à l'ADN gyrase, en utilisant deux approches :

- une approche de **sélection *in vivo* de souches résistantes aux FQ (FQ-R) dans un modèle murin d'infection tuberculeuse (H37Rv)**,
- une approche visant à **étudier des souches cliniques de *Mtb* FQ-R sans mutation dans l'ADN gyrase**, pour lesquelles nous disposons de données complètes génomiques et phénotypiques :
 - **souches cliniques collectées au CNR MyRMA**,
 - **souches cliniques collectées dans le cadre du Consortium International CRyPTIC** (collaboration avec P. Supply et C. Gaudin de l'Institut Pasteur de Lille).

Le résultat principal de ces travaux *in silico* est la mise en évidence du rôle potentiel de l'opéron *mfpAE* dans la résistance aux FQ chez *Mtb*, avec (i) **la mise en exergue d'un mécanisme non encore décrit comme impliqué dans la résistance chez *Mtb*, à savoir la présence de duplications génomiques massives** (environ 4% du génome) contenant entre autres cet opéron d'intérêt et (ii), **la mise en évidence de mutations dans les gènes de cet opéron, dont l'impact fonctionnel est en cours d'étude grâce à la modélisation de la structure des protéines Mfp et de leur interaction**, et à l'obtention de la structure à haute résolution de MfpD chez *Mtb* (collaboration avec S. Petrella, Département de Biologie Structurale et de Chimie, Institut Pasteur).

La démonstration expérimentale du rôle de l'opéron *mfpAE* et de l'impact des duplications génomiques massives dans la résistance aux FQ est en cours, via différentes approches :

- transformation de la souche parentale H37Rv (inoculée aux souris dans le modèle murin) par électroporation d'un cosmide contenant un insert de 38 kb comprenant l'opéron *mfpAE* en entier (environ 5 kb) (fourni par Roland Brosch, Institut Pasteur de Paris), et permettant ainsi de mimer la duplication,

- étude du niveau de transcription des gènes de l'opéron *mfpAE* par approche de RT-qPCR, dans les souches FQ-R isolées chez la souris présentant une duplication, en comparaison avec le niveau de transcription de la souche sauvage.

L'article 9 concernant ces travaux et qui est en préparation est présenté ci-dessous. Le journal pressenti pour la soumission est la revue *Molecular Biology and Evolution*.

Dans l'attente des résultats des expériences en cours visant à apporter la preuve expérimentale du rôle de l'opéron *mfpAE* dans la résistance de *Mtb* aux FQ, nous avons préparé deux titres. La description de ces expériences est incluse dans la section « *Material and methods* » et le texte a été rédigé en supposant que les expériences en cours confirmeront les résultats concordants obtenus en faveur du rôle de l'opéron *mfpAE* dans la résistance de *Mtb* aux FQ.

Publication 9 (en préparation)

1 **New insights supporting the role of the *mfpAE* operon in *Mycobacterium tuberculosis***
2 **fluoroquinolone resistance *in vivo***
3 *or*
4 **Genomic analysis of *in vivo* selected fluoroquinolone-resistant *Mycobacterium tuberculosis***
5 **mutants provides insights into undepicted mechanisms of resistance**

6

7 Florence Morel^{1,2}, Christine Bernard^{1,2}, Cyril Gaudin^{3,4}, Thomas Ioerger⁵, Estelle Capton¹,
8 Elisa Quiot⁶, Aurélie Chauffour¹, Noémie Lequerré^{1,2}, Stéphanie Petrella⁶, Nicolas Veziris^{1,2,7},
9 Jérôme Robert^{1,2}, Wladimir Sougakoff^{1,2}, Philip Supply^{3,4}, Alexandra Aubry^{1,2*}

10

11 ¹ Sorbonne Université, INSERM, U1135, Centre d'Immunologie et des Maladies Infectieuses,
12 Cimi-Paris, F-75013, Paris, France.

13 ² AP-HP, APHP. Sorbonne-Université, Hôpital Pitié-Salpêtrière, Centre National de Référence
14 des Mycobactéries et de la Résistance des Mycobactéries aux Antituberculeux, F-75013 Paris,
15 France.

16 ³ Université de Lille, CNRS, Inserm, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, Lille, France.

17 ⁴ U1019 - UMR 8204, Center for Infection and Immunity of Lille, Lille, France.

18 ⁵ Department of Computer Science and Engineering, Texas A&M University, College Station,
19 Texas, United States of America.

20 ⁶ Unité de Microbiologie Structurale, Institut Pasteur, CNRS UMR 3528, 25 rue du Docteur
21 Roux, 75724 Paris Cedex 15, France; Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, 75724
22 Paris Cedex 15, France.

23 ⁷ APHP, Département de Bactériologie, Hôpitaux Universitaires de l'Est Parisien, Paris, France.

24

25 **Corresponding author:**

26 Alexandra Aubry
27 Faculté de Médecine Sorbonne Université
28 91, boulevard de l'hôpital
29 75013 PARIS, FRANCE
30 Email: alexandra.aubry@sorbonne-universite.fr

31 **ABSTRACT**

32 Fluoroquinolones (FQ) are key components of multidrug-resistant tuberculosis treatment, but
33 resistance mechanisms other than DNA gyrase (encoded by the *gyrA* and *gyrB* genes) mutations
34 remain unclear. To identify new FQ resistance targets, we used two different approaches: (i) an
35 *in vivo* infection model to mimic the course of FQ resistance selection in patients under
36 treatment, where mice infected by *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv were sacrificed at
37 various times between 1 and 6 months of levofloxacin (LVX) treatment and (ii) an analysis of
38 the genomes of clinical FQ-resistant (FQ-R) strains without mutations in the DNA gyrase.
39 Whole genome sequencing (WGS) was performed on three sets of strains: (i) isogenic FQ-
40 resistant (FQ-R) strains isolated from mice infected by *M. tuberculosis* H37Rv and treated by
41 LVX, (ii) clinical strains isolated at the French National Reference Centre for Mycobacteria
42 and in the frame of the CRYPTIC Consortium.

43 Among the 59 mice treated, 16 presented at least one FQ-R strain without DNA gyrase
44 mutation. Among those, WGS evidenced massive genomic duplications containing the *mfpAE*
45 operon, 18 SNVs and two InDels. Excitingly, 4 of these FQ-R strains harboured only massive
46 duplications. WGS analysis on clinical strains revealed (i) the presence of large-scale
47 duplications in the same genomic region in 11.2% of the Cryptic isolates, significantly
48 associated to FQ-R isolates ($p = 0.01$), (ii) mutations in two components of the *mfpAE* operon
49 (Rv3362 and Rv3363c) that might be linked to FQ-R.

50 Our study brings new data supporting the role of the *mfpAE* operon in FQ-R and the implication
51 of genetic duplication as an independent driver of antibiotic resistance in tubercle bacilli.

52

53

54

55

56 **INTRODUCTION**

57 Despite the context of underreporting due to the Covid 19 epidemic, tuberculosis (TB) remains
58 one of the leading causes of death from infectious disease in the world, with 10,6 million new
59 cases per year ¹. The mortality rate varies according to the drug susceptibility of the strain; it is
60 less than 5% for TB due to strain fully susceptible to first line antitubercular drugs, but as high
61 as 10-30% in case of multidrug-resistance (MDR-TB, defined by resistance to both isoniazid
62 and rifampicin) and up to 50% in case of extensively drug resistant TB (XDR-TB, defined as
63 MDR-TB with additional resistance to fluoroquinolones (FQ) and at least one additional group
64 A drug (i.e. linezolid or bedaquiline) ², i.e. close to the natural rate of mortality of untreated TB.

65 The FQ have a strong bactericidal activity against *Mycobacterium tuberculosis*
66 (*M. tuberculosis*) and are positioned as the key component for the treatment of MDR-TB since
67 2016 ². As a reflection of this key role, worsening prognosis of XDR-TB compared to MDR-
68 TB is strongly associated with FQ-resistance (FQ-R) ^{3,4}. FQ-R under such treatments is
69 associated with clinical deterioration, death and further transmission of drug resistance ⁵. It is
70 thus essential to comprehensively diagnose FQ-R in *M. tuberculosis*.

71 Mutations occurring in *gyrA* and less frequently in *gyrB*, are the prominent mechanisms of
72 acquired resistance to FQ ^{6,7}. However, from 5 to as much 45% of FQ-R clinical strains have
73 no mutation detected in the DNA gyrase encoding genes ⁷. While this could be due to
74 undetected minority (i.e., heteroresistant) populations bearing resistance-associated mutations
75 in *gyrA* or *gyrB* in a number of cases, other mutational mechanisms have been proposed with
76 diverse supportive evidence. These mechanisms involve cell wall permeability, efflux pumps
77 (Rv2686c-Rv2687c-Rv2688c operon encoding an ABC transporter, and upregulation of the
78 PstB efflux pump) ^{8,9}, the pentapeptide repeat protein (PRP) MfpA ¹⁰⁻¹², and mutations in *eccC5*
79 ¹³⁻¹⁵.

80 The present study aimed to decipher other molecular mechanisms of FQ-R than DNA gyrase
81 mutations by using two complementary approaches based on (i) *in vivo* selection of
82 *M. tuberculosis* FQ-R isogenic strains in a murine infection model followed by whole genome
83 sequencing (WGS), and (ii) retrospective analysis of WGS data from clinical FQ-R strains
84 recovered at the French National Reference Centre for Mycobacteria (NRC-MyRMA) and in
85 the frame of the CRyPTIC consortium ¹⁶. These approaches bring new data supporting the role
86 of the *mfpAE* operon in FQ-resistance and the implication of genetic duplication as a driver of
87 antibiotic resistance in tubercle bacilli. Genome amplification has been shown as being one of
88 the strategies developed by *M. tuberculosis* for the generation of diversity, but it has never been
89 related to antibiotic resistance in that important pathogen. Therefore, our data open a new path
90 into the field of evolution toward antibiotic resistance in TB.

91

92 **RESULTS**

93 **Genomic analysis of strains selected *in vivo* in a mouse infection model**

94 *Analysis at the mouse level (Figures 1 and 2)*

95 During the six months of levofloxacin (LVX) treatment, CFU were recovered monthly from
96 the lungs of the mice on media with and without FQ enabling to measure the proportion of
97 resistant mutants ¹⁷. FQ MICs of up to five isogenic strains recovered per mouse from FQ-
98 containing medium were also measured (Figure 1). Among the 59 mice treated by LVX, 57
99 harboured a proportion of FQ-R mutants higher than in untreated mice ¹⁷, whereas 39 (66.1%)
100 harboured strains with mutation(s) in *gyrA/gyrB* and 20 mice harboured strains without
101 mutation in *gyrA/gyrB* (Figure 2). Among these latter 20 mice, 16 mice harboured a higher
102 proportion of FQ-R mutants than the control mice and FQ-R strains displaying a 2-fold increase
103 in FQ-MICs.

5

104 ***Analysis at the strain level***

105 WGS was performed on (i) one isogenic FQ-R strain of each of the 16 mice harboring a higher
106 proportion of FQ-R mutants than the control mice whose also displayed a 2-fold increase in
107 FQ-MICs and (ii) on seven FQ-S “control” strains isolated from non-treated mice in order to
108 identify mutations likely linked to drift or selection *in vivo* (Figure 1).

109 Control FQ-S strains recovered from untreated mice

110 Among the seven “control” FQ-S strains isolated from the untreated mice, two mutations were
111 found in common with the FQ-R strains comparatively to the H37Rv parental strain: AroF:
112 R387C and Rv0247c: A55A, in one FQ-S strain and one FQ-R strain M3m6 (Tables 1, 2 and
113 S1). These two SNVs were excluded from further analysis. No InDels and no large-scale
114 duplication/deletion were observed in these strains recovered from untreated mice.

115 FQ-R strains recovered from treated mice

116 The main result observed from WGS analysis is the detection of two different large-scale
117 duplications, which were not present in the H37Rv parental strain. These massive duplications
118 were identified *via* the detection of a coverage twice the mean genome coverage in seven out
119 of the 16 genomes recovered from isogenic FQ-R strains: (i) a 180-kb duplication of the region
120 comprised between *Rv3327* and *Rv3475* (designated as *Rv3327–Rv3475*) was found in six
121 genomes; (ii) a 89-kb duplication in the region located between *Rv3356* and *Rv3439c* (*Rv3356-*
122 *Rv3439c*) in only one genome (Tables 1 and 2; Figures 3 et 4). The *Rv3327* gene corresponding
123 to the upstream boundary of the 180-kb duplication is predicted to encode a transposase fusion
124 protein; while the *Rv3475* gene corresponding to the downstream boundary encodes part of a
125 transposase for the insertion element *IS6110*, the other being encoded by *Rv3474* (Figures 4 et
126 5). The upstream and downstream boundaries of the 89-kb duplication observed in the
127 remaining genome encompass *Rv3356c*, encoding the bifunctional protein FOLD

128 (methylenetetrahydrofolate dehydrogenase + methenyltetrahydrofolate cyclohydrolase) and
129 *Rv3439c*, coding for a hypothetical protein with unknown function, respectively (Figures 4 et
130 5). The 89-kb duplication is thus comprised within the 180-kb duplication, and both
131 duplications remarkably contain the *mfpAE* operon, including the genes *Rv3360-Rv3365c*
132 (Figures 4 et 5; Table S2).

133 Strikingly, the 180-kb duplication was the sole difference between the reference genome and
134 the genomes of four of the isogenic FQ-R strains of. These strains harbored a 1- to 4- fold
135 increase in LVX or MXF MICs comparatively to the parental strain (Table 1; Figure 3).

136 The three other strains in which a large-scale duplication was observed harbored one to two
137 additional fixed SNVs and displayed a 2- to 4- fold increase in LVX or MXF MICs (Table 1;
138 Figure 3). The M4m2 strain, which was the only one possessing the 89-kb duplication, harbored
139 a E102A substitution in *AlaS*, a probable alanyl-tRNA. A non-synonymous mutation in *gyrA*
140 (*GyrA*: E303Q) was detected in the M5m6 strain in combination to a synonymous mutation in
141 a gene encoding a protein of unknown function (*Rv3413c*:V114V substitution). This novel
142 SNV in *gyrA* located outside the QRDR region is not involved in FQ-R since the 50% inhibitory
143 concentrations (IC_{50}) of a range of FQ required to inhibit DNA supercoiling are similar to those
144 of the wild-type (WT) DNA gyrase (Table S3; Figure S1). In the latter strain, M3m4, the
145 duplication was associated with two additional substitutions in proteins of unknown functions.

146 Among the 16 genomes sequenced, no large-scale duplication was observed in seven strains,
147 whereas SNVs/InDels were evidenced comparatively to the H37RV parental strain (Tables 1
148 and 2, Figure 3). Among the SNVs identified, three were found in genes encoding proteins
149 implicated in the replication process: (i) substitution S197G in the helicase *PriA* (*Rv1402*),
150 which is implicated in the recruitment of other proteins to form the primosome complex
151 permitting the replication restart, (ii) synonymous V88V substitution in *MfpC* (*Rv3363c*) which

152 is part of the *mfpAE* operon, and (iii) E303Q substitution in *GyrA*, already observed in an
153 another strain (M5m9) and without impact on FQ susceptibility (Table S3, Figure S1). Two
154 small InDels were found: (i) one nucleotide insertion in the gene *Rv1819c* encoding the
155 transport protein *BacA* in M5m1, (ii) and one nucleotide insertion in *Rv2081c* in M5m9 (Tables
156 1 and 2, Figure 3). All except one (M4m1) of these seven strains displayed a 2- to 8- fold
157 increase of FQ MICs (Table 1, Figure 3).

158 Among the 16 genomes sequenced, no large-scale duplication, and no SNVs/InDels were
159 evidenced comparatively to the H37RV parental strain in one strain (M4m5) despite an increase
160 2-to 4- fold increase in FQ MICs (Tables 1 and 2, Figure 3).

161 It is to notice that the adjunction of reserpine, an inhibitor of efflux pump, did not modify the
162 MICs' results (Table 1).

163

164 ***In silico* prediction of impact of the SNVs identified on protein function**

165 The analysis conducted on the PROVEAN server evidenced that more than half (n = 9) of the
166 15 nonsynonymous SNVs recovered from WGS analysis were potentially deleterious on protein
167 function, defined by a score < -2.5 (Table 3, Figure 6). By classifying them by score, the most
168 deleterious mutation observed in FQ-R isogenic strains was the P387L mutation in the probable
169 Rieske iron-sulfur protein *QcrA* (Table 3, Figure 6) whereas the less deleterious was the *GyrA*
170 E303Q substitution, supporting the experimental data (Table S3; Figure S1).

171 **Genomic analysis of clinical strains**

172 ***Data from French National Reference Centre for Mycobacteria***

173 After a review of the WGS data obtained from clinical strains collected at the NRC (n= 411
174 genomes, 66 OFX-R strains and 345 OFX-S strains) by using the same pipelines as those used
175 for the WGS analysis of the strains isolated toward the TB mouse model, we identified six FQ-
176 R clinical strains without known FQ-R associated mutations in *gyrA* or *gyrB*. All six belonged
177 to the Indo-Oceanic lineage (L1) of the *M. tuberculosis complex* also showing typical East
178 African-Indian (EAI) spoligotype patterns. However, they all showed distinct 24-locus MIRU-
179 VNTR types, and they were not part of a same genomic cluster suggestive of a transmission
180 chain, as they differed by > 200 SNVs by pairwise comparison (Figure S2). One strain
181 (C2105082467) was MDR, two were mono-resistant to isoniazid (C1510097996 and
182 C1711111720) and the three other ones were fully susceptible for first-line antitubercular drugs.
183 All the SNVs/InDels recovered for the six clinical strains, including those implicated in
184 antibiotic resistance to other antitubercular drugs than FQ, are presented in Tables S4 to S9.

185 The lineage-specific SNPs were removed from analysis (Coll et al. 2014) as well as those
186 recovered in all of the 47 EAI strains of the WGS database of the NRC and therefore likely
187 being lineage's polymorphisms (Table S10). Notably, the EccC5 V1319F substitution was
188 removed from further analysis as this substitution was found in all of the EAI strains of the
189 NRC database (Table S10). Mutations in the candidate genes or in genes of the same family
190 than those identified through the *in vivo* infection model mimicking the course of FQ
191 resistance in patients under treatment (see above result) were screened in the genomes of these
192 six FQ-R clinical stains. Seven different non-synonymous SNVs, all fixed, were detected by
193 the three pipelines inside those genes whereas **no InDels and no large-scale genomic**
194 **duplications were observed** (Tables 2 and 3, Table S4 to S9). Remarkably, two distinct
195 substitutions were identified in *mfpAE* genes in four of these six FQ-R clinical strains. One
196 strain harbored a V154M substitution in MfpE (neutral PROVEAN score of -1.341) without
197 any additional mutation in the target genes identified in isogenic FQ-R strains, whereas three

198 strains harbored the same T27S substitution in MfpB: (deleterious PROVEAN score of -3.883).
199 The three strains with the MfpB substitution did not share a common ancestor, so this mutation
200 seems to be a homoplasy, but they also share a synonymous L541L substitution in BacA with
201 or without additional mutation in target genes (Tables 1 and 2).

202 ***Data from the CRyPTIC Consortium***

203 Following the results obtained previously on FQ-R strains isolated from mice and from the
204 NRC-MyRMA, it appeared that the strongest data were evidenced for variants linked to the
205 *mfpAE* operon, *i.e.*, mutations in the genes but also large-scale duplications containing this
206 operon. In order to consolidate these results, a large-scale genomic analysis was conducted on
207 the dataset of clinical strains of the CRyPTIC Consortium; this dataset was chosen because its
208 huge size, and because phenotypic data are available on the isolates sequenced, notably for FQ
209 (LVX and MXF) ¹⁸.

210 The WGS analysis was performed: (i) on a set of 306 genomes of phenotypically FQ-R strains
211 without known mutations in *gyrA* and *gyrB* identified (test set, “FQ-R set”) and (ii) on a set of
212 700 genomes of phenotypically FQ-S strains (control set, “FQ-S set”).

213 For the FQ-R set, 43 (14%) genomes were excluded, because the raw data were finally not
214 available for downloading or because of low quality. For the FQ-S set, 12 (1,7%) genomes were
215 excluded for the same reasons.

216 The Coll SNP-based lineage and sublineage and the phenotypic data were recovered from the
217 data previously published by the CRyPTIC Consortium ^{18, 19} (Table S11). Not surprisingly, the
218 lineages 2 and 4 were the most represented in the two datasets, representing 92% and 81% of
219 FQ-S set and FQ-R set respectively. No isolate belonging to lineages 5, 6, 7 or 9 was present in

220 the datasets. The number of isolates belonging to lineage 4 was significantly higher in the set
221 of FQ-S strains (Table S11).

222 We conducted a preliminary analysis among the genomes of discrepant isolates (FQ-R dataset)
223 in order to look for potential heterogeneous mutations in *gyrA/gyrB* which may have been
224 missed by the first analysis conducted for the CRyPTIC study. Among the 688 genomes of the
225 FQ-S dataset, fixed DNA gyrase substitutions were identified in five genomes (0.7%). Among
226 the 286 genomes of the FQ-R dataset, at least one substitution in the DNA gyrase, was
227 evidenced in 51 genomes (17.8%). All of these mutations had an allele frequency <95% (Table
228 S12). The mutations evidenced are detailed in table S12.

229 The main finding of the genomic analysis of the two datasets was the presence of large-scale
230 duplications containing the *mfpAE* operon in FQ-R isolates (n=7), significantly at a higher rate
231 among the FQ-R strains than among the FQ-S strains (p = 0.01) (Table 5). The large-scale
232 duplications were evidenced exclusively in MDR isolates belonging to lineages 2 and 4 (Tables
233 5 and 6). In most of the cases, substitution in Rv3365 (encoding MfpE) were also evidenced in
234 these isolates. Only one presented also heterogeneous mutations in *gyrA* known to confer
235 resistance to FQ (Table 6). All of the large-scale duplications evidenced here occurred in the
236 same genomic region than those identified in FQ-R strains collected from mice (i.e., between
237 3 000 and 4 000 kb).

238 The presence of mutations in the genes of the *mfpAE* operon was also investigated. A total of
239 87 mutations/combinations of mutations were evidenced among the two datasets (Table 5). Half
240 of them were identified in Rv3365 (n= 44); six were found in Rv3360 (among which one InDel),
241 eight in Rv3361, 12 in Rv3362, 10 in Rv3363, and seven in Rv3364 (among which one InDel)
242 (Table 5). Most of the mutations (n=72/87, 82.8%) were rarely identified, occurring only in one
243 or two isolates. By contrast, some of them were frequent in the two datasets, and appeared to

244 be restricted to only one lineage: (i) the deletion 3772833_del_a in Rv3360 (lineage 3), (ii)
245 MfpE A266T (lineage 4), and (iii), the combination of the substitutions S687R and Q698R
246 (lineage 2). Two mutations were found in more than two isolates and exclusively in FQ-R
247 isolates; they are both located in Rv3363 leading to the V82M (n=7, L2 and L4 isolates) and
248 V88V (n=4, L4 isolates) substitutions (Table 5).

249 **Experimental demonstration of the implication of large-scale duplication containing**
250 **mfpAE operon in FQ-R**

251 To consolidate the data obtained *in silico*, an experimental model of large-scale duplication in
252 H37Rv was constructed by electroporating the cosmid I358 containing a 38-kb insert including
253 the entire *mfpAE* operon. The integration of the cosmid DNA into the chromosome was
254 confirmed for three transformants by the analysis of the genome coverage after mapping on the
255 reference genome showing an increase of the depth of coverage in the expected region (3768-
256 3806 kb) (Figure S3).

257 *Determination of FQ MICs is ongoing.*

258 *The RT-qPCR experiments of mfpAE genes are still in progress, but we already get first*
259 *results regarding the level of transcription of mfpA in FQ-R strains isolated from mice*
260 *exhibiting a large-scale duplication and for the H37Rv parental strain. These results are shown*
261 *on figure 8. The level of transcription of mfpA appeared to be increased in the FQ-R strains*
262 *with the duplication comparatively to the H37Rv, with a relative expression ratio (RR) of 2.3*
263 *for M3m4, 3.0 for M5m6 and 33 for M3m9 . However, the RR was also increased in the strain*
264 *M5m8 (RR=23), whereas it doesn't possess a large-scale duplication. These results have to be*
265 *confirmed on more isolates, and in triplicates. We have also planned to assess the level of*
266 *transcription of the other genes of the operon mfpAE.*

267

268 **DISCUSSION**

269 Our study aiming at deciphering molecular mechanisms other than DNA gyrase mutations in
270 FQ-R in *M. tuberculosis* led us to bring out the role of large-scale genomic duplications and the
271 *mfpAE* operon. It should be noticed that WGS analysis was performed with three different
272 pipelines to assess robustness of our data and that the identification of mutations occurring in
273 the untreated mice avoid the misinterpretation of variants evidenced to be related to *in vivo*
274 adaptation rather than FQ-R.

275 The main finding of this study is the presence of large-scale duplications, representing at least
276 4% of the total genome, in strains recovered from mice sacrificed at different months of
277 treatment (M2 to M5) (Tables 1 and 2; Figure 3). Remarkably, four strains among the seven
278 harboring these duplications and presenting an increase of FQ MICs compared to the H37Rv
279 parental strain had no additional SNV/InDel. Together with the fact that (i) different mice
280 displayed strains with large-scale duplications, and (ii) we did not identify large-scale
281 duplications in isogenic strains recovered from mice infected with *M. tuberculosis* H37Rv
282 treated with an antibiotic other than FQ as a monotherapy (data from ongoing non published
283 studies concerning bedaquiline and ethionamide), our data strongly support the role of these
284 genomic amplifications in FQ-R *in vivo*. Strikingly, large-scale genomic analysis of more than
285 900 clinical isolates from the CRyPTIC Consortium led to the identification of the same kind
286 of duplications occurring in the same region of the *M. tuberculosis* genome, between 3 000 and
287 4 000 kb (Tables 5 and 6). This phenomenon seems to be rare among clinical strains, as it was
288 detected only in 11 (1.1%) genomes among the 984 analyzed. Duplications were evidenced in
289 both FQ-S and FQ-R isolates; however, they were significantly more frequent in FQ-R isolates
290 rather than in FQ-S isolates ($p = 0.01$) (Table 5). These data in clinical strains strengthen those

13

291 obtained from the murine model. They were only identified among MDR isolates, and only in
292 lineages 2 and 4. However, these two lineages were the most represented in the two datasets,
293 that is not surprising because they are the most evidenced in clinical strains around the world
294 ²⁰, so the presence of this large-scale duplication in other lineages of *M. tuberculosis* cannot be
295 ruled out.

296 Large-scale genomic duplications were scarcely described in mycobacteria, likely WGS
297 pipelines analysis mainly used are not designed to enable detection of duplications, which
298 requires to look carefully at the genome coverage. However, genomic duplications were already
299 described as a driver of evolution or adaptation to *in vitro* growth, and the study of their impact
300 was focused on virulence ^{21, 22}. So, the well characterized 29-kb duplication DU1 restricted to
301 BCG Pasteur and the duplication DU2 with four variants (DU2-I to DU2-IV) have been
302 described in the *Mycobacterium bovis* BCG vaccine strain (Brosch et al. 2007). Moreover,
303 large-scale duplications have been described after continuous *in vitro* passage and their negative
304 impact on virulence have been shown ^{21,23 22}. For example, a 56-kb duplication has been
305 observed in *M. smegmatis* mc²155 (Galamba et al., 2001), and massive genomic duplications
306 have been described in *M. tuberculosis* strains belonging to the modern lineages 2 and 4 with
307 sizes ranging from 281 to 532 kb (Domenech et al. 2010), (Domenech et al. 2014), (Weiner et
308 al. 2012). Recently, another kind of genomic amplification has been described, resulting in a
309 38- to 60-fold amplification of a 2.5-kb region of the ESX-3 system (“accordion-type”
310 amplification); this massive amplification has been reported as associated with a decrease in
311 virulence ²⁵. Interestingly, some of these duplications reported previously share a common
312 region with the two duplications observed in the isogenic FQ-R strains selected *in vivo* in our
313 study (between Rv3188 (genomic position 3,549,789) and Rv3644 (genomic position
314 4,082,013)), and all except one (strain T67 (Weiner et al. 2012)) contain the entire *mfpAE*
315 operon (Figure 7). Interestingly, the duplications observed in our study could be seen as a

316 “reduction” of the massive ones previously described possibly due to the adaptive advantage of
317 the *mfpAE* operon contained in the duplications observed in the context of FQ selective pressure
318 (Figure 7). A notable difference between the duplications reported previously and those
319 observed in strains isolated from mice is the presence of the *dosR* regulatory system in the
320 duplications evidenced in Beijing strains^{22,23}. So, our study is the first one reporting such large-
321 scale duplications as a likely driver of antibiotic resistance in *M. tuberculosis*.

322 Interestingly, all the large-scale genomic duplications evidenced in this study (both in strains
323 isolated from mice and clinical ones) contain the entire *mfpAE* operon which is likely involved
324 in FQ-R. Indeed, both clinical and FQ-R strains selected in mice harbored variants affecting the
325 Mfp (*Mycobacterium* fluoroquinolone resistance protein) proteins. They are either (i) large-
326 scale genomic duplications containing the entire *mfpAE* operon, or (ii) mutations in genes of
327 the operon (Tables 1, 2, 5 and 6; Figure 3). The Mfp proteins have been described as likely
328 associated to FQ-R in previous *in vitro* studies^{11, 13 26}. The *mfpAE* operon encodes notably
329 MfpA, which belongs to the PRP family^{12,26}. The PRP are known to confer FQ-R in Gram
330 negative bacteria (Qnr proteins)²⁷, which supports the implication of MfpA in FQ-R. The direct
331 interaction of MfpA and *M. smegmatis* DNA gyrase was clearly demonstrated¹², but to lead to
332 FQ-R, MfpA needs to be co-expressed with the small GTPase MfpB (Tao et al. 2013). Thus, in
333 *M. smegmatis* and in *M. bovis* BCG, the expression of a plasmid harboring genes encoding
334 MfpA and MfpB is responsible for an increase of FQs MICs (Montero et al. 2001). Remarkably,
335 this plasmid harbored a third gene adjacent to the 2 others: Rv3363c, encoding the helix turn
336 helix protein MfpC whose implication in FQ-R has not yet been explored. In our study, two
337 mutations in Rv3363c were of particular interest. The first one is the V82M substitution, which
338 was evidenced in seven clinical strains and in two different lineages (L2 and L4) (Table 5);
339 interestingly, the MfpC V82M was reported as an homoplasy in a collection of 1000 clinical
340 isolates from Russia²⁸. The second mutation of particular interest in Rv3363c is a silent

341 mutation (V88V), which was recovered in one FQ-R strain isolated from mice and in four FQ-
342 R clinical isolates from CRyPTIC dataset (Table 1, 2 and 5; Figure 3). Even if this mutation is
343 silent, we can wonder if Rv3363c, whose role remained to be deciphered, could be implicated
344 in the regulatory expression of *mfpA* and/or *mfpB*. Interestingly, a substitution (T27S) in MfpB
345 was evidenced in three FQ-R clinical strains of the NRC-MyRMA, with a deleterious score by
346 PROVEAN analysis (Tables 2 and 3). It is unlikely that the additional mutations encountered
347 in these three strains are implicated in FQ-R since most of these mutations were synonymous
348 or had no impact on the protein function (Tables 1 and 3). However, among the CRyPTIC
349 datasets, the T27S MfpB substitution was only recovered in two FQ-R isolates, whereas it was
350 found in 17 FQ-S isolates; additionally, this mutation seemed to be restricted to the lineage 1,
351 both in NRC-MyRMA and CRyPTIC isolates. These observations modulate the putative impact
352 of the MfpB T27S substitution. Altogether, substitutions observed in the *mfpAE* operon, both
353 in strains isolated from mice and in clinical strains share new light regarding the role of this
354 operon in FQ-R in *M. tuberculosis*.

355 Besides variants linked to the *mfpAE* operon, other mutations were found both in murine and
356 clinical FQ-R strains (Tables 1 and 2, Figure 3), but the data obtained here do not allow a robust
357 conclusion on their potential impact on FQ-R. In addition, unlike the *mfpAE* operon, little data
358 are currently available to provide strong support for hypotheses about the mechanism of FQ-R
359 that would be linked to mutations in these genes. Among those, mutation were found in the
360 genes encoding the ABC transporter BacA, the DNA helicase PriA, which plays a major role
361 in replication in case of replication fork collapse²⁹ and in QcrA and QcrB, belonging to the
362 cytochrome bc1 complex. Besides, WGS analysis evidenced substitutions in EccC5 in one
363 isogenic FQ-R strain (Tables 1 and 2; Figure 3) and in FQ-R clinical strain (Table 2). However,
364 the substitution V1319F recently described in clinical FQ-R¹⁵ and also identified in FQ-R
365 clinical in our setting is unlikely linked to FQ-R. Indeed, (i) it was always associated with

366 mutations in the DNA gyrase known as implicated in FQ-R, making any conclusion regarding
367 the role of this EccC5 substitution in FQ-R hazardous ¹⁵ and (ii) we found out that this
368 substitution was present in all of the 47 genomes of the EAI strains available in the WGS
369 database of the French NRC suggesting that it is likely a lineage associated polymorphism
370 (Table S10).

371 No mutations were found in efflux pumps for the isogenic FQ-R strains isolated from mice,
372 excepting in *BacA*, but as explained above, the mechanism of resistance suspected for *BacA* is
373 not related to efflux. The absence of modification of the FQ MICs after adjunction of reserpine
374 supported our hypothesis.

375 No variant was evidenced by WGS in the strain M4m5 which presented a 2- to 4- fold increase
376 of FQ's MICs (Table 1). We can hypothesize that the molecular support of this FQ-R may be
377 located in repetitive regions such as PPE/PGRS not explored by short-read sequencing
378 techniques or due to the epistasis ³⁰. Variants at a low frequency may have also been missed
379 because of an insufficient depth of coverage of WGS (Maruri et al. 2020).

380 To conclude, our study brings new data supporting the role of the *mfpAE* operon in FQ-R and
381 has shown for the first time the implication of genetic duplication as a driver of antibiotic
382 resistance in tubercle bacilli. Further studies should investigate the molecular mechanisms
383 supporting these observations.

384

385 **MATERIAL AND METHODS**

386 **Ethics**

387 We followed the animal experiment guidelines of the Faculté de Médecine Sorbonne
388 Université. Animal experiments were performed in accordance with prevailing European
389 Commission regulations regarding the care and use of laboratory animals. The experiment was
390 conducted in 2011 before an authorization was required for each animal experiment in France.
391 The animal ward was approved on 24 April 2012 to carry out animal experiments (license
392 number: B75-13-01). N. V. and A. C., who carried out the animal experiments, have the
393 following license numbers: 75-1531 and B-75-1214.

394 ***M. tuberculosis* strains and cosmid**

395 The *M. tuberculosis* strains studied were from three origins: (i) the *in vivo* mouse model
396 provided isogenic FQ-R mutants and “control” strains isolated from non-treated mice, (ii) six
397 clinical FQ-R strains, which were selected after a screening of the WGS database of the NRC
398 to identify FQ-R strains without known mutation in *gyrA* and/or *gyrB* and (iii) a dataset from
399 the CRyPTIC consortium¹⁸. For this latter, we selected (i) 342 strains FQ-R without mutation
400 in DNA gyrase (called FQ-R dataset), and (ii) 700 FQ-S strains including all other isolates for
401 which a phenotype for a FQ was available as a “control” dataset (called FQ-S dataset).

402 The recombinant *Escherichia coli* strain containing the integrative cosmid I358 used to
403 experimentally assess the impact of large-scale duplication in FQ-R was kindly given by Roland
404 Brosch⁽³¹⁾, Institut Pasteur, Paris). The I358 cosmid contains an insert of 38 kb (3768-3806 kb)
405 covering the entire *mfpAE* operon.

406 **Phenotypic and genotypic characterization of the clinical strains**

407 Regarding strains collected at the NRC, all the MDR strains are sent to the NRC for genotypic
408 and phenotypic expertise. The phenotypic DST is made by the proportion method with
409 resistance defined by a proportion of resistant mutants $\geq 1\%$ ³². For the FQs, OFX and MOX

410 are tested at the concentration of 2 mg/L. WGS is performed by paired-end Illumina sequencing
411 at the P2M platform of Institut Pasteur for all of the MDR strains and for the other strains if a
412 discordance is observed between the phenotypic and the “first-line” genotypic results.

413 Regarding strains from the CRyPTIC consortium, phenotypic data and SNP-based lineage
414 predictions were recovered from data published by the CRyPTIC consortium ¹⁸.

415 **Infection of mice and treatment**

416 The material and methods of this experiment have been already published ¹⁷. Seventy female
417 outbred Swiss mice (Janvier Breeding Center, Le Genest Saint-Isle, France) were allocated by
418 randomization into seven groups of 10 mice. The mice were inoculated in the tail vein with a
419 0.5 mL bacterial suspension that contained 6.3 log₁₀ CFU of MTB H37Rv strain. Sixty mice
420 received LVX therapy by gavage 5 days per week at a concentration of 200 mg/kg. Treatment
421 was initiated 3 weeks after infection in order to achieve a large bacterial population. Among
422 treated mice, one died because of a gavage accident and was excluded from the analysis. Three
423 others died from TB before sacrifice, but data were available for analysis. The 56 remaining
424 treated mice were sacrificed at various times between 1 and 6 months of LVX treatment to
425 mimic patients at different stages during the course of FQ-R selection. The ten remaining
426 infected, but untreated, mice (control group) died between 1 and 3 months after infection.

427 FQ-R isogenic mutant strains were recovered on FQ-containing media as previously published
428 ¹⁷. Phenotypic drug susceptibility testing (DST) for OFX at 2 mg/L (OFX2) and MXF at 0.5, 1
429 and 2 mg/L (MXF0.5, MXF1 and MXF2) was performed on LJ medium by adapting the
430 proportion method used for TB DST (Figure 1): the totality of CFU recovered on the LJ medium
431 used for primary culture of the lung were scraped together. This material was suspended in
432 water and diluted to obtain an approximate density of 10⁷ CFU/mL. Dilutions were prepared
433 by 10-fold dilution. Two slopes of medium without drug and four slopes of medium containing

434 OFX2, MXF0.5, MXF1 or MXF2 were inoculated with 0.1 mL of the 10^{-1} , 10^{-3} and 10^{-5}
435 dilutions. The colonies were counted only on the slopes seeded with the lowest inoculum that
436 produced growth. The average number of colonies obtained for the two control slopes indicated
437 the number of culturable particles contained in the inoculum. The method was considered
438 satisfactory if the number of culturable particles contained in the inoculum was $\geq 10^6$ CFU/mL;
439 otherwise, the method was repeated until this criterion was reached. Any strain showing a
440 proportion of resistant bacilli $\geq 1\%$ was classified as resistant to the corresponding drug and
441 designated as the 'resistant population'.

442 In this study strains are called "MXmX" with "M" corresponding to the month of sacrifice and
443 "m" corresponding to the number of the mouse.

444 The whole study design is shown in the Figure 1.

445 **MICs determination and efflux pump inhibition assays.**

446 Regarding isogenic mutants recovered from the murine in vivo experiment, the MICs of LVX
447 and MXF (Sigma-Aldrich, France) were determined using the agar proportion method (91) with
448 and without 12 mg/L of the efflux pump inhibitor reserpine. Briefly, 10^3 and 10^5 CFU were
449 inoculated onto 7H11 agar supplemented with 10% oleic acid-albumin-dextrose-catalase
450 enrichment (Becton-Dickinson, France) and containing serial two-fold dilutions of the
451 quinolone. CFU were enumerated after 35 days of incubation at 37°C. The MIC was defined as
452 the minimum concentration of drug that inhibited growth of > 99% of the bacterial population
453 compared to the drug-free control quadrant. An internal quality control consisting in
454 measurement of H37Rv MICs was performed for each series of MICs. For each of isolates, the
455 MIC was determined twice for both antibiotics.

456 Regarding transformants obtained by electroporating the cosmid I358, LVX and MXF MICs
457 were performed in triplicate for the parental H37Rv strain and the transformants by using TB
458 ExiST BD BACTEC MGIT 960 System as described previously³⁴.

459 **Plasmids and reagents used for the DNA gyrase purifications and DNA supercoiling**
460 **assays**

461 Expression plasmids pATB, pBTB containing the respective WT *M. tuberculosis* genes *gyrA*
462 and *gyrB* have been described previously. The plasmid pATB303 containing the *gyrA* allele
463 encoding GyrA E303Q substitution has been generated from pATB as previously described by
464 vitro mutagenesis³⁵. Briefly, plasmid expressing GyrA E303Q substitution was generated from
465 pATB using the QuikChange site-directed mutagenesis kit (Stratagene) and the following
466 primers: 5' GCTGGCCGGCATTTC AACATTCAGGACCAGTCTAGCG 3' sens and 5'
467 CGCTAGACTGGTCCTGAATGTTGGAAATGCCGGCCAGC 3' antisens. After
468 mutagenesis, plasmids were purified using the Roche High Pure Plasmid Isolation kit and
469 entirely sequenced to ensure the absence of unwanted mutations (MilleGen). Plasmids were
470 introduced by transformation into *Escherichia coli* BL21-CodonPlus (IDE3)-RP cells
471 (Stratagene) for protein expression. OFX and LVX (Sigma), and MXF (Bayer Pharma) were
472 provided by the manufacturers. Relaxed plasmid pBR322 DNA was purchased from John Innes
473 Enterprises, Ltd.

474 **Overexpression and purification of WT and mutant gyrase proteins and DNA**
475 **supercoiling assays**

476 Gyrase subunits were purified as previously described³⁵. Protein concentrations were measured
477 with a Nanodrop ND-1000 instrument and the protein fractions were analyzed using SDS-

478 PAGE. DNA supercoiling assays and determination of FQ IC₅₀s were carried out as described
479 previously³⁶.

480 **Whole genome sequencing**

481 *WGS of isogenic and clinical strains recovered at the NRC.*

482 WGS was performed on (i) the parental H37Rv strain and the 16 FQ-R isogenic mutants without
483 mutations detected in the QRDR of *gyrA* and *gyrB* as previously described³⁷, (ii) seven strains
484 isolated after several passages of the parental strain H37Rv in untreated mice as “controls”, in
485 order to identify mutations occurring spontaneously *in vivo*, (iii) 4 clinical FQ-R strains without
486 mutations detected in the *gyrA* and *gyrB*.

487 Genomic DNA was extracted by using cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) protocol³⁸.
488 The DNA library was constructed by using a genomic DNA sample preparation kit (Illumina),
489 following manufacturer’s instructions. The whole genomes were sequenced in paired-end on
490 Illumina HiSeq 2500 sequencer. The totality of the raw data generated have been deposited in
491 the National Center for Biotechnology Information (NCBI) Sequence Read Archive (SRA)
492 database (SRA accession PRJNA702643).

493 Mapping and variant calling

494 First of all, the quality of the reads was checked using FastQC (version 0.11.7). Then, a
495 trimming was performed notably to remove all the low-quality base pairs with a Phred score <
496 30. The trimmed reads were mapped against the H37Rv reference genome (GenBank accession
497 number AL123456.3) with the Burrows-Wheeler Aligner (BWA) MEM algorithm⁴⁰. The mean
498 genome coverage obtained after mapping against the reference genome of H37Rv (GenBank
499 accession number AL123456.3) was 99.3 % (range 97.7-99.9) with a global mean mapping

500 quality of 58.9. The average read depth was 131x, with a minimum of 34x and a maximum of
501 263x.

502 The variant analysis (SNVs and InDels) was performed by using three different pipelines:
503 BIONUMERICS-7.6®, PhyResSe (<http://phyresse.org>)⁴¹, and with a home-made script on
504 linux by using the tool GATK (Genome Analysis ToolKit) Haplotype Caller (McKenna et al.
505 2010). Filters were applied to retain only the high-quality SNVs and InDels; only those with a
506 minimum coverage depth of 10X were kept for further analysis. Filtering of SNVs with the
507 linux home-made script using GATK followed the GATK Bests Practices, excluding SNVs
508 with the parameters: QD < 2.0 (Quality score by Depth), FS > 60.0 (FisherStrand), and MQ <
509 30.0 (Mapping Quality). With BIONUMERICS-7.6®, the filters applied were: minimum
510 absolute coverage of 5, and minimum 12 bp between SNVs. For the three tools used, the
511 variants located inside Pro-Glu/Pro-Pro-Glu gene families (PE_PGRS/PPE), *esxP* and *esxO*
512 were filtered out due to their repetitive sequences which leads to SNVs/InDels
513 misidentifications. All the SNVs and InDels found were compared across the three pipelines
514 used and against the variants identified in the H37Rv parental strain used to generate the
515 mutants for the *in vivo* selected FQ-R strains whereas the SNVs corresponding to lineage
516 polymorphisms¹⁹ were excluded from further analysis for the clinical FQ-R strains. The allele
517 frequency was determined by checking the allele depth in the VCF files generated by the variant
518 calling analysis. It is to notice that among the 20 SNVs recovered from WGS data analysis,
519 about half (n=11) were evidenced by all of the three tools (Table S2). The PhyResSe pipeline
520 identifying the highest number of SNVs (n=20 vs 15 with the home-made script using GATK
521 and 11 with BIONUMERICS-7.6®). The orientation of the genomic duplications was checked
522 by the analysis of read pair orientations in IGV.

523 We systematically searched for evidence of large-scale deletions (regions >100 bp with <5X
524 coverage), supported by paired-end information (where pairs of reads map to locations >300 bp
525 apart that span across the gap region). If detected, deletions were confirmed by contig-building
526 across the gap. We also looked at duplications by checking the global coverage all along the
527 genomes by using BIONUMERICS-7.6® and Integrative Genomics Viewer (IGV)
528 (<http://www.broadinstitute.org/igv>).

529 Annotation information and retrieval of sequences

530 The Mycobrowser portal (<https://mycobrowser.epfl.ch>) was used to study the annotation and to
531 get nucleotide and amino-acid sequences. Mycobrowser is a genome browser which is regularly
532 updated and provides very useful data as function, structure, and sequences of *M. tuberculosis*
533 proteins.

534 ***WGS of clinical strains recovered from the CRyPTIC consortium***¹⁸

535 The fastQ files for the two datasets we downloaded from the European Nucleotide Archive
536 (ENA) <https://www.ebi.ac.uk/ena/browser/>. The quality of the raw data was checked by using
537 FastQC. Genomes with insufficient coverage and/or depth were excluded from further analysis.
538 The variant calling was performed with two pipelines : PhyResSe (<http://phyresse.org>)⁴¹ and
539 by home-made scripts with the methodology described above for the isogenic and clinician
540 strains recovered at the NRC. The “Basic Variant Detection” tool was used for variant calling
541 with default parameters ignoring broken pairs. IS6110 insertions were detected as previously
542 described [Antoine et al., 2021] with minor modifications. Briefly, sequencing reads were
543 mapped to the IS6110 consensus sequence as described above and mapped reads extracted and
544 remapped on the H37Rv reference genome in order to identify insertion sites. Large duplication
545 events of the gyrase genes and in the *mfpAE* operon were detected by comparing the average
546 depth of coverage of these specific regions compared to the whole genome average depth of

547 coverage using a custom script. Large duplications were confirmed by direct visualization of
548 the coverage depth on CLC Genomics Workbench (version 22.0.0; Qiagen), after read mapping
549 against H37Rv reference genome NC_000962.3 using the “Map Reads to Reference” default
550 parameters with local alignment and ignoring non-specific matching.

551 ***In silico* prediction of the functional impact of mutations**

552 To explore the impact of the non-synonymous SNVs found by WGS analysis on the protein
553 function, we used the Protein Variation Effect Analyzer (PROVEAN) (<http://provean.jcvi.org/>)
554 server for prediction of mutation based on protein sequence. The PROVEAN server provides a
555 score predicting the potential deleterious or non-deleterious effect of mutation on protein
556 biological function, with a threshold value of -2.5⁴².

557 **Cosmid DNA electroporation and transformants characterization**

558 Cosmid DNA was extracted with the QIAamp Mini Prep kit (Qiagen) starting from an overnight
559 culture of the recombinant *E. coli* strain (containing the cosmid I358) on LB medium + 50
560 µg/mL hygromycin. The yield and the quality of cosmid DNA was checked by using the
561 NanoDrop™ 2000.

562 The preparation of electrocompetent cells was made by starting from a 100 mL culture in 7H9
563 supplemented by OADC of the parental H37Rv strain used in the murine model (OD around
564 0.5). After iterative lavage of the cell pellet with glycerol 10%, 100 µL of electrocompetent
565 cells were used for electroporation of 500 ng and 1 µg of cosmid DNA (1000 ohms, 2.5 kV, 25
566 µF). Electrocompetent cells were immediately resuspended in 1 mL of 7H9 supplemented by
567 OADC. After 24h of incubation at 37°C, the subculture was done on 7H11 medium + 50 µg/mL
568 hygromycin.

569 After three weeks of incubation, colonies were obtained on 7H11 supplemented with OADC +
570 50 µg/mL hygromycin.

571 The integration of the cosmid in *M. tuberculosis* H37Rv grown on 7H11 medium + 50 µg/mL
572 hygromycin was checked by performing Illumina WGS. Integration of the cosmid was assessed
573 by an increase of the depth of coverage in the region of interest (3768-3806 kb), with
574 visualization made on Integrative Genomics Viewer (IGV) (<http://www.broadinstitute.org/igv>).

575 **RNA extraction and reverse-transcription real-time qPCR of *mfpAE* genes**

576 Total RNA extraction was done with trizol and chloroform as previously described from
577 logarithmic phase cultures (DO600nm ~ 0,6) in 7H9 media supplemented with OADC under
578 the same conditions. Quantification of the total RNA was assessed using the NanoDrop™ 2000
579 (Thermo Scientific™). A quantity of 2 µg of total RNA was used for reverse transcription for
580 each triplicate to obtain 2 µg of cDNA using the Transcriptase inverse SuperScript™ III kit
581 (Thermo Scientific™).

582 Real-time PCR analysis was carried out on the ABI PRISM® 7000 (Applied Biosystems) using
583 the PCR master mix containing SYBR green dye (Applied Biosystems™). The 20 µl PCRs
584 consisted of PCR master mix, 4 µM concentrations of each primer, and 5 µl of each cDNA
585 template. In each case, the gene tested (*mfp* genes) and the reporter gene (*ftsZ*) were assayed
586 along with a set of standard samples (dilutions of the same cDNA), and the Ct obtained for
587 gene-specific mRNA were normalised to the Ct of *ftsZ* mRNA. The relative expression ratio for
588 each target was calculated using the Pfaffl equation, based on the efficiency of the qPCR and
589 the Ct deviation of a test sample versus a control, and expressed in comparison to the reporter
590 gene (*ftsZ*). The H37Rv parental was used as the control strain to calculate the ratios.

591 This assay was performed for FQ-R strains isolated from mice with a large-scale duplication or
592 not, and for the H37Rv parental strain used for the inoculation of the mice.

593 **Acknowledgments**

594 The Centre National de Référence des Mycobactéries is supported by an annual grant from
595 Santé Publique France (Paris, France). The funders had no role in study design, data collection
596 and analysis, decision to publish or preparation of the manuscript. The authors thank the animal
597 facility “NAC” for mice breeding.

598 We would like to thank Roland Brosch (Institut Pasteur, France) for providing us the cosmid,
599 and Timothy Walker from the CRYPTIC Consortium for providing us the list of discrepant
600 isolates regarding FQ genotypic and phenotypic susceptibility.

601

602 REFERENCES

- 603 1. Global tuberculosis report 2022. <https://www.who.int/publications-detail-redirect/9789240061729>.
- 604 2. WHO consolidated guidelines on tuberculosis: Module 4: Treatment - Drug-resistant tuberculosis treatment. (World Health Organization, 2020).
- 605 3. Kim, D. H. *et al.* Treatment Outcomes and Survival Based on Drug Resistance Patterns in Multidrug-resistant
- 606 Tuberculosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **182**, 113–119 (2010).
- 607 4. Shah, N. S. *et al.* Extensively Drug-Resistant Tuberculosis in the United States, 1993–2007. *JAMA* **300**, 2153–
- 608 2160 (2008).
- 609 5. Singh, P. K. & Jain, A. Limited Scope of Shorter Drug Regimen for MDR TB Caused by High Resistance to
- 610 Fluoroquinolone. *Emerg. Infect. Dis.* **25**, 1760–1762 (2019).
- 611 6. Pantel, A. *et al.* Extending the definition of the GyrB quinolone resistance-determining region in
- 612 Mycobacterium tuberculosis DNA gyrase for assessing fluoroquinolone resistance in M. tuberculosis.
- 613 *Antimicrob. Agents Chemother.* **56**, 1990–1996 (2012).
- 614 7. Maruri, F. *et al.* A systematic review of gyrase mutations associated with fluoroquinolone-resistant
- 615 Mycobacterium tuberculosis and a proposed gyrase numbering system. *J. Antimicrob. Chemother.* **67**, 819–
- 616 831 (2012).
- 617 8. Pasca, M. R. *et al.* Rv2686c-Rv2687c-Rv2688c, an ABC fluoroquinolone efflux pump in Mycobacterium
- 618 tuberculosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**, 3175–3178 (2004).
- 619 9. Banerjee, S. K., Bhatt, K., Misra, P. & Chakraborti, P. K. Involvement of a natural transport system in the
- 620 process of efflux-mediated drug resistance in Mycobacterium smegmatis. *Mol. Gen. Genet. MGG* **262**, 949–
- 621 956 (2000).
- 622 10. Mérens, A. *et al.* The pentapeptide repeat proteins MfpAMt and QnrB4 exhibit opposite effects on DNA
- 623 gyrase catalytic reactions and on the ternary gyrase-DNA-quinolone complex. *J. Bacteriol.* **191**, 1587–1594
- 624 (2009).
- 625 11. Tao, J. *et al.* Mycobacterium fluoroquinolone resistance protein B, a novel small GTPase, is involved in the
- 626 regulation of DNA gyrase and drug resistance. *Nucleic Acids Res.* **41**, 2370–2381 (2013).
- 627 12. Feng, L. *et al.* The pentapeptide-repeat protein, MfpA, interacts with mycobacterial DNA gyrase as a DNA
- 628 T-segment mimic. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **118**, e2016705118 (2021).
- 629 13. Eilertson, B. *et al.* A novel resistance mutation in *eccC5* of the ESX-5 secretion system confers ofloxacin
- 630 resistance in Mycobacterium tuberculosis. *J. Antimicrob. Chemother.* **71**, 2419–2427 (2016).
- 631 14. Blackman, A. *et al.* Re-evaluation of a novel resistance mutation in *eccC5* of the ESX-5 secretion system in
- 632 ofloxacin-resistant Mycobacterium tuberculosis. *J. Antimicrob. Chemother.* (2020) doi:10.1093/jac/dkaa507.
- 633 15. Chaiyachat, P. *et al.* Whole-genome analysis of drug-resistant Mycobacterium tuberculosis reveals novel
- 634 mutations associated with fluoroquinolone resistance. *Int. J. Antimicrob. Agents* 106385 (2021)
- 635 doi:10.1016/j.ijantimicag.2021.106385.
- 636 16. The CRyPTIC Consortium and the 100,000 Genomes Project. Prediction of Susceptibility to First-Line
- 637 Tuberculosis Drugs by DNA Sequencing. *N. Engl. J. Med.* **379**, 1403–1415 (2018).
- 638 17. Bernard, C. *et al.* *In vivo* Mycobacterium tuberculosis fluoroquinolone resistance emergence: a complex
- 639 phenomenon poorly detected by current diagnostic tests. *J. Antimicrob. Chemother.* **71**, 3465–3472 (2016).
- 640 18. CRyPTIC Consortium. Epidemiological cut-off values for a 96-well broth microdilution plate for high-
- 641 throughput research antibiotic susceptibility testing of M. tuberculosis. *Eur. Respir. J.* **60**, 2200239 (2022).
- 642 19. Coll, F. *et al.* A robust SNP barcode for typing Mycobacterium tuberculosis complex strains. *Nat. Commun.*
- 643 **5**, 4812 (2014).
- 644 20. Napier, G. *et al.* Robust barcoding and identification of Mycobacterium tuberculosis lineages for
- 645 epidemiological and clinical studies. *Genome Med.* **12**, 114 (2020).
- 646 21. Domenech, P., Kolly, G. S., Leon-Solis, L., Fallow, A. & Reed, M. B. Massive gene duplication event among
- 647 clinical isolates of the Mycobacterium tuberculosis W/Beijing family. *J. Bacteriol.* **192**, 4562–4570 (2010).
- 648 22. Weiner, B. *et al.* Independent large scale duplications in multiple M. tuberculosis lineages overlapping the
- 649 same genomic region. *PLoS One* **7**, e26038 (2012).
- 650 23. Domenech, P. *et al.* Origins of a 350-Kilobase Genomic Duplication in Mycobacterium tuberculosis and Its
- 651 Impact on Virulence. *Infect. Immun.* **82**, 2902–2912 (2014).
- 652 24. Multiple genetic paths including massive gene amplification allow Mycobacterium tuberculosis to overcome
- 653 loss of ESX-3 secretion system substrates | PNAS. <https://www.pnas.org/doi/10.1073/pnas.2112608119>.
- 654 25. Wang, L. *et al.* Multiple genetic paths including massive gene amplification allow Mycobacterium
- 655 tuberculosis to overcome loss of ESX-3 secretion system substrates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **119**,
- 656 e2112608119 (2022).
- 657 26. Falco, A., Aranaga, C., Ocampo, I. & Takiff, H. Overexpression of *mfpA* Gene Increases Ciprofloxacin
- 658 Resistance in Mycobacterium smegmatis. *Int. J. Microbiol.* **2021**, 6689186 (2021).

- 660 27. Vetting, M. W. *et al.* Structure of QnrB1, a plasmid-mediated fluoroquinolone resistance factor. *J. Biol. Chem.*
661 **286**, 25265–25273 (2011).
- 662 28. Casali, N. *et al.* Evolution and transmission of drug-resistant tuberculosis in a Russian population. *Nat. Genet.*
663 **46**, 279–286 (2014).
- 664 29. Windgassen, T. A., Leroux, M., Sandler, S. J. & Keck, J. L. Function of a strand-separation pin element in
665 the PriA DNA replication restart helicase. *J. Biol. Chem.* **294**, 2801–2814 (2019).
- 666 30. Castro, R. A. D. *et al.* The Genetic Background modulates the Evolution of Fluoroquinolone-Resistance in
667 Mycobacterium tuberculosis. *Mol. Biol. Evol.* (2019) doi:10.1093/molbev/msz214.
- 668 31. Cole, S. T. *et al.* Deciphering the biology of Mycobacterium tuberculosis from the complete genome
669 sequence. *Nature* **393**, 537–544 (1998).
- 670 32. Barrera, L. *et al.* *Policy Guidance on Drug-Susceptibility Testing (DST) of Second-Line Antituberculosis*
671 *Drugs.* (World Health Organization, 2008).
- 672 33. Wayne, P. Susceptibility testing of Mycobacteria, Nocardiae, and Other Aerobic Actinomycetes; Approved
673 Standard – Second Edition. CLSI document M24-A2. *Clinical and Laboratory Standards Institute* (2011).
- 674 34. Cambau, E. *et al.* Revisiting susceptibility testing in MDR-TB by a standardized quantitative phenotypic
675 assessment in a European multicentre study. *J. Antimicrob. Chemother.* **70**, 686–696 (2015).
- 676 35. Aubry, A. *et al.* Novel gyrase mutations in quinolone-resistant and -hypersusceptible clinical isolates of
677 Mycobacterium tuberculosis: functional analysis of mutant enzymes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**,
678 104–112 (2006).
- 679 36. Aubry, A., Pan, X.-S., Fisher, L. M., Jarlier, V. & Cambau, E. Mycobacterium tuberculosis DNA gyrase:
680 interaction with quinolones and correlation with antimycobacterial drug activity. *Antimicrob. Agents*
681 *Chemother.* **48**, 1281–1288 (2004).
- 682 37. Ioerger, T. R. *et al.* Identification of new drug targets and resistance mechanisms in Mycobacterium
683 tuberculosis. *PLoS One* **8**, e75245 (2013).
- 684 38. Wilson, K. Preparation of Genomic DNA from Bacteria. *Curr. Protoc. Mol. Biol.* **56**, 2.4.1–2.4.5 (2001).
- 685 39. Babraham Bioinformatics - FastQC A Quality Control tool for High Throughput Sequence Data.
686 <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>.
- 687 40. Li, H. & Durbin, R. Fast and accurate long-read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinforma.*
688 *Oxf. Engl.* **26**, 589–595 (2010).
- 689 41. Feuerriegel, S. *et al.* PhyResSE: a Web Tool Delineating Mycobacterium tuberculosis Antibiotic Resistance
690 and Lineage from Whole-Genome Sequencing Data. *J. Clin. Microbiol.* **53**, 1908–1914 (2015).
- 691 42. Choi, Y. & Chan, A. P. PROVEAN web server: a tool to predict the functional effect of amino acid
692 substitutions and indels. *Bioinformatics* **31**, 2745–2747 (2015).
- 693 43. Wang, W.-F. *et al.* Genomic analysis of Mycobacterium tuberculosis isolates and construction of a Beijing
694 lineage reference genome. *Genome Biol. Evol.* evaa009 (2020) doi:10.1093/gbe/evaa009.
- 695

TABLES

Table 1: LVX and MXF MICs and non-synonymous mutations detected by WGS in FQ-R strains selected *in vivo*.

Strain	LVX	LVX +res	MXF	MXF +res	Nb of mutations	Presence of duplication	SNVs, InDels				
M2m2	2x	2x	8x	8x	2	no	PriA: S197G	QcrA: P387L			
M2m3	2x	2x	4x	4x	0	yes					
M2m6	2x	2x	4x	4x	0	yes					
M3m2	2x	2x	2x	2x	2	no	CcsA: G80E	FtsH: T630A			
M3m4	2x	2x	2x	2x	2	yes	Rv3253c: M400T	Rv3668c: A225S			
M3m6	2x	2x	2-4x	2-4x	2	no	<i>Rv0247c: A55A</i>	<i>AroF: R387C</i>			
M3m8	1x	1x	2x	2x	0	yes					
M3m9	2x	2x	4x	4x	0	yes					
M4m1	1x	1x	1x	1x	2	no	Rv0281: F70V	Rv2818: Y365H			
M4m2	2x	2x	4x	4x	2	yes	AlaS: E102A				
M4m4	2x	2x	4x	4x	2	no	SigC: D134G	MhuD: E58K			
M4m5	2x	2x	4x	4x	0	no					
M5m1	2x	2x	2x	2x	4	no	Rv0281: N294K	AtsA: G133A	BacA: c269ins	Rv3159c: G243V	
M5m6	2x	2x	4x	4x	2	yes	GyrA: E303Q	Rv3413c: V144V			
M5m8	2x	2x	2x	2x	3	no	EccD3 : T304P	MfpC: V88V	Rv3668c: A225S		
M5m9	2-4x	2-4x	4x	4x	4	no	GyrA: E303Q	EccC5: I1357T	Rv2081c: c129ins	Rv3413c: V144V	

Mutations also identified in one control strain isolated from a non-treated mice are in italics; res : reserpine.

MXmX: strains isolated from mice treated with levofloxacin; M = month, m = mouse

Table 2: SNVs, InDels and large-scale duplications evidenced by WGS analysis in FQ-R strains, both selected *in vivo* and in FQ-R clinical strains of NRC-MyRMA.

Strain	180 kb dup	89 kb dup	SNVs and InDels			
M2m2	no	no	PriA: S197G	QcrA: P387L		
M2m3	yes	no	none			
M2m6	yes	no	none			
M3m2	no	no	CcsA: G80E	FtsH: T630A		
M3m4	yes	no	Rv3253c: M400T	Rv3668c: A225S		
M3m6	no	no	<i>Rv0247c: A55A</i>	<i>AroF: R387C</i>		
M3m8	yes	no	none			
M3m9	yes	no	none			
M4m1	no	no	Rv0281: F70V	Rv2818: Y365H		
M4m2	no	yes	AlaS: E102A			
M4m4	no	no	SigC: D134G	MhuD: E58K		
M4m5	no	no	none			
M5m1	no	no	Rv0281: N294K	AtsA: G133A	Rv1819c (BacA): c269ins	Rv3159c: G243V
M5m6	yes	no	GyrA: E303Q	Rv3413c: V144V		
M5m8	no	no	EccD3 : T304P	MfpC: V88V	Rv3668c: A225S	
M5m9	no	no	GyrA: E303Q	EccC5: I1357T	Rv2081c: c129ins	Rv3413c: V144V
C1401047927	no	no	BacA: L541L	MfpB: T27S		
C1406063055	no	no	MfpE: V154M			
C1510097996	no	no	BacA: L541L	PriA: R167C	MfpB: T27S	FtsH: S718S CcsA: R130R
C1706098817	no	no	QcrB: P479L	FtsH: T38T, F132F, A565A		
C1711111720	no	no	AtsA: H701Y	BacA: L541L	MfpB: T27S	
C2105082467	no	no	PriA: L406R			

MXmX: strains isolated from mice treated with levofloxacin; M = month, m = mouse; CX = clinical strains;

Mutations also identified in one FQ-S control strain isolated from one untreated mice are in italics.

Table 3: SNVs and InDels (other than those in *gyrA/gyrB*) detected by WGS in both isogenic and clinical FQ-R strains and their impact of proteins functions (estimated by the PROVEAN scores where a mutation is considered deleterious if the score is < -2.5 and neutral if > -2.5).

Gene	Protein	Cellular process	Function	Essential gene	SNV/InDel	Substitution	PROVEAN score	Effect	Nb of genomes
Rv0281		Lipid metabolism	Possible S-adenosylmethionine-dependent methyltransferase	no	NS	N294K	-0,944	neutral	1
					NS	F70V	-2,271	neutral	1
Rv0290	EccD3	Cell wall and cell processes/transport	ESX-3 type VII secretion system protein. Probable transmembrane protein	yes	NS	T304P	-3,206	deleterious	1
Rv0529	CcsA	Energetic metabolism and respiration	Possible cytochrome C-type biogenesis protein	no data	NS	G80E	-4,814	deleterious	1
					S	R130R*			1
Rv0711	AtsA	Energetic metabolism and respiration	Possible arylsulfatase AtsA	no	NS	G133A	-5,994	deleterious	1
					NS	H701Y*	-1.452	neutral	1
Rv1201c	DapD	Energetic metabolism and respiration	Tetrahydronicotinate N-succinyltransferase DapD	yes	S	T158T			1
Rv1402	PriA	replication	Helicase within the primosome	yes	NS	S197G	-0,858	neutral	1
					NS	R167C*	-1,147	neutral	1
					NS	L406R*	-2.119	neutral	1
Rv1783	EccC5	Cell wall and cell processes/transport	ESX-5 type VII secretion system protein	yes	NS	I1357T	-3,507	deleterious	1
Rv1819c	BacA	Cell wall and cell processes/transport	Probable drug-transport transmembrane ATP-binding protein ABC transporter	no	Ins	c269ins			1
					S	L541L*			3
Rv2069	SigC	Transcription	RNA polymerase sigma factor	no	NS	D134G	-4,951	deleterious	1
Rv2081c		Cell wall and cell processes/transport	Conserved transmembrane protein	no	Ins	c129ins			1
Rv2195	QcrA	Energetic metabolism and respiration	Probable rieske iron-sulfur protein	yes	NS	P387L	-9,884	deleterious	1
Rv2196	QcrB	Energetic metabolism and respiration	Probable ubiquinol-cytochrome C reductase	yes	NS	P479L*	-5,575	deleterious	1
Rv2555c	AlaS	Translation	Probable alanyl-tRNA	yes	NS	E102A	-1,241	neutral	1
Rv2818c		Unknown	Hypothetical protein	no	NS	Y365H	-4,556	deleterious	1
Rv3253c		Cell wall and cell processes/transport	Possible cationic amino acid transport integral membrane protein	no	NS	M400T	-5,167	deleterious	1
Rv3362c	MfpB	Replication	Probable ATP/GTP-binding protein (operon <i>mfpAE</i>)	no	NS	T27S*	-3,883	deleterious	3
Rv3363c	MfpC	Replication	Helix turn helix, function unknown (operon <i>mfpAE</i>)	yes	S	V88V			1
Rv3365c	MfpE	Replication	Unknown (operon <i>mfpAE</i>)	no	NS	V154M*	-1.341	neutral	1
Rv3413c		unknown	Unknown alanine and proline rich protein	no	S	V144V			2
Rv3592	MhuD	Energetic metabolism and respiration	Possible heme degrading protein	no	NS	E58K	-1,969	neutral	1
Rv3610c	FtsH	Cell division	ATP-dependent zinc metalloproteinase	yes	NS	T630A	-4,925	deleterious	1
					S	T38T*			1
					S	F132F*			1
					S	A565A*			1
					S	S718S*			1
Rv3668c		Energetic metabolism and respiration	possible protease	no	NS	A225S	-1,227	neutral	2

*SNVs identified only in clinical strains; NS: non synonymous; S: synonymous

Table 4: Proteins or family of proteins found mutated in FQ-R clinical and isogenic strains.

Protein	Function	Strain	Substitution
Mfp proteins (<i>mfpAE</i> operon)			
MfpB	Probable ATP/GTP-binding protein	C1401047927	T27S
		C1510097996	T27S
		C1711111720	T27S
MfpC	Helix turn helix, function unknown	M5m8	V88V
MfpE	Unknown	C1406063055	V154M
Qcr proteins			
QcrA	Probable rieske iron-sulfur protein	M2m2	P387L
QcrB	Probable ubiquinol-cytochrome C reductase	C1706098817	P479L
BacA			
	ATP-binding protein ABC transporter	C1401047927	L541L
		C1510097996	L541L
		C1711111720	L541L
		M5m1	c269ins
PriA			
	Helicase within the primosome	C1510097996	R167C
		C2105082467	L406R
		M2m2	S197G
CcsA			
	Possible cytochrome C-type biogenesis protein	M3m2	G80E
		C1510097996	R130R
FtsH			
	ATP-dependent zinc metallopeptidase	M3m2	T630A
		C151009799	S718S
		C1706098817	T38T, F132F, A565A
AtsA			
	Possible arylsulfatase	M5m1	G133A
		C1711111720	H701Y

Table 5: Large-scale duplications containing the *mfpAE* operon and mutations in this operon recovered from genomic analysis of the two datasets from CRYPTIC Consortium.

Mutations observed	n	FQ-S (%) n=688	FQ-R (%) n=286	p-value ^a	Lineage			
					L1	L2	L3	L4
Large-scale duplication containing the <i>mfpAE</i> operon	11	3 (0.4)	7 (2.4)	0.01	0	6	0	5
Rv3360								
P41P	1	0	1		0	0	0	1
G55S	2	2	0		0	1	0	1
I58F	2	2	0		0	0	0	2
H103H	3	2	1		0	0	0	3
G119S	1	0	1		0	1	0	0
3772833 del a	51	24 (3.5)	27 (9.4)	<0.001	0	0	51	0
Rv3361								
MfpA								
L19F	1	0	1		0	1	0	0
G36D	1	0	1		0	0	0	1
R45R	1	0	1		0	0	0	1
R78W	1	0	1		0	0	0	1
T105S	1	1	0		0	0	1	0
G146A	1	1	0		0	0	1	0
P151P	1	1	0		0	0	0	1
T156A	1	0	1		0	0	0	1
Rv3362								
MfpB								
S6P	1	1	0		0	1	0	0
E7K	1	1	0		0	1	0	0
G20C	1	1	0		0	0	0	1
G25C + T27S	1	1	0		1	0	0	0
T27S	18	16	2		18	0	0	0
total T27S	19	17 (2.5)	2 (0.7)	0.08	19	0	0	0
F29L	1	1	0		1	0	0	0
T65P	1	1	0		0	1	0	0
V80A	4	4	0		0	0	0	4
A106V	1	1	0		0	1	0	0
Q116stop	1	0	1		1	0	0	0
V165I	1	1	0		0	0	0	1
A179G	1	1	0		0	1	0	0
Rv3363								
MfpC								
Q37stop	1	0	1		0	1	0	0
L57L	1	0	1		0	1	0	0
Q58L	1	0	1		0	0	0	1
R72R	2	1	1		0	1	0	1
V82M	7	0	7		0	4	0	3
D86N	1	0	1		1	0	0	0
V88V	4	0	4		0	0	0	4
A97V	1	1	0		0	0	0	1
L111L	1	0	1		1	0	0	0
L122P	1	1	0		0	1	0	0
Rv3364								
MfpD								
L43L	1	0	1		0	0	0	1
Q50K	2	1	1		0	2	0	0
A52T G123G	1	0	1		1	0	0	0
A53V	1	1	0		0	0	0	1
L117P	1	0	1		0	1	0	0
G123G	41	27 (3.9)	14 (4.8)	0.24	41	0	0	0
3774522 ins c	1	1	0		0	1	0	0
Rv3365								
MfpE								
R6C	2	2	0		0	0	0	2
G106E	2	2	0		0	0	0	2
V154M	6	3	3		0	0	0	6
S187S	1	1	0		0	0	0	1
T215S	1	1	0		0	0	0	1
A221A	0	0	2		0	0	0	2
L258R	2	0	2		0	0	0	2
A266T	161	111	50		0	0	0	161
S19F A266T	2	0	2		0	0	0	2
total A266T	163	111 (16.1)	52 (18.2)	0.5	0	0	0	163
A327V	1	1	0		0	0	0	1
L350L	1	0	1		0	0	0	1
R370H	1	1	0		0	0	0	1
L412F	1	1	0		0	0	1	0
A462A	1	1	0		0	0	0	1
I508T	5	3	2		0	0	0	5
P544P	1	1	0		0	0	0	1
C567G	4	3	1		0	0	0	4
G607G	1	1	0		0	0	0	1
T664M	1	0	1		0	0	0	1

A690G	1	0	1	0	0	0	1
W708R	1	1	0	0	0	0	1
P717P	1	1	0	0	0	0	1
P720P	1	0	1	0	0	0	1
A762T	1	1	0	0	0	0	1
P787P	1	1	0	0	0	0	1
H865Y	1	1	0	1	0	0	0
S687R Q698R	343	238	105	0	343	0	0
F4L S687R Q698R	1	1	0	0	1	0	0
A15A S687R Q698R	1	1	0	0	1	0	0
P38L S687R Q698R	41	31	10	0	41	0	0
D135N A322T S687R Q698R	1	1	0	0	1	0	0
A175V S687R Q698R	1	1	0	0	1	0	0
G205A S687R Q698R	1	0	1	0	1	0	0
A221A S687R Q698R	4	0	4	0	4	0	0
A266T S687R Q698R	1	0	1	0	1	0	0
I285M S687R Q698R	1	0	1	0	1	0	0
A311A S687R Q698R	1	1	0	0	1	0	0
A322T S687R Q698R	11	4	7	0	11	0	0
A322T S687R Q698R P737P	1	1	0	0	1	0	0
G522G S687R Q698R	1	0	1	0	1	0	0
R579W S687R Q698R	2	2	0	0	2	0	0
S687R Q698R S778L	1	1	0	0	1	0	0
S687R Q698R R849R	1	1	0	0	1	0	0
S687R Q698R 3777467 del cga	1	1	0	0	1	0	0
total S687R Q698R	414	284 (41.3)	130 (45.4)	0.48	0	414	0
3775590 ins c	1	1	0	0	0	0	1

^a (Fisher's exact test)

Table 6: Characteristics of CRyPTIC isolates for which a large-scale duplication containing the *mfpAE* operon was identified by genomic analysis.

Isolate	Phenotype						Lineage	<i>mfpAE</i> operon mutations	<i>gyrA/gyrB</i> mutations
	FQ	LVX MIC	MXF MIC	OFX LJ	MXF LJ	MD R			
site.05.subj.LR-2061.lab.FN-00810-15.iso.1	S	0.5	0.25	-	-	yes	4.3.4.2	MfpE A266T	-
site.05.subj.LR-2134.lab.FN-01939-15.iso.1	S	0.25	0.12	-	-	yes	4.3.4.2	MfpE A266T	-
site.06.subj.06TB_0234.lab.06MIL0695.iso.1	S	0.5	0.25	-	-	yes	4.10	no	-
site.ENA.subj.SAMEA1016182.lab.1.iso.1	R	-	-	R	S	yes	2.2.10	MfpE S687R Q698R	-
site.ENA.subj.SAMEA1403593.lab.1.iso.1	R	-	-	S	R	yes	2.2.10	MfpE A221A S687R Q698R	-
site.ENA.subj.SAMEA1707194.lab.1.iso.1	R	-	-	S	R	yes	2.2.10	MfpE S687R Q698R	-
site.ENA.subj.SAMEA1707356.lab.1.iso.1	R	-	-	R	-	yes	2.2.10	MfpE S687R Q698R	-
site.05.subj.PMOP-0615.lab.MOP-177.iso.1	R	8	>4		-	yes	2.2	MfpE S687R Q698R	GyrA A90V (42%) + D94G (40%)
site.02.subj.0112.lab.22A066.iso.1	R	0,5	0,5	R	-	yes	2.2	MfpE S687R Q698R	-
site.03.subj.8058-02_LIB9197.lab.8058-02_LIB9197.iso.1	R	-	-	R	-	yes	4.8	MfpE V154M	-

3 **FIGURES**

4 **Figure legends**

5 **Figure 1: Design of the study.**

6 **Figure 2: Mutations observed in mice treated by LVX monotherapy.** Mice whose FQ-R
7 clones harbored only FQ-R known mutations in the DNA gyrase are represented in blue. Mice
8 whose FQ-R clones harbored only mutations other than known FQ-R DNA gyrase mutations
9 are shown in red. Mice whose FQ-R clones harbored both types of mutations are represented in
10 purple. Mice with no mutation detected are represented in grey.

11 **Figure 3: Timeline characteristics of isogenic FQ-R strains selected *in vivo* without**
12 **mutation in DNA gyrase (FQ's MICs, SNVs, InDels and large-scale duplications).** *compared
13 to MIC of the H37Rv parental strain. **allele frequency > 95%.

14 **Figure 4: Schematic representation of the two duplications evidenced in isogenic FQ-R**
15 **strains selected *in vivo*.** Remarkably they both contain the *mfpAE* operon which is represented
16 in red. A schematic presentation of the *mfpAE* operon is shown on the bottom. PRP =
17 Pentapeptide Repeat Protein; HTH = Helix Turn Helix.

18 **Figure 5: Coverage plots around large-scale duplications boundaries relative to H37Rv**
19 **parental strain.** The six isogenic FQ-R strains containing the 180-kb duplication are shown in
20 red; the isogenic FQ-R strain containing the 89-kb duplication is represented in pink and the
21 parental H37Rv genome in green. Genes boxed in blue are predicted transposable elements in
22 H37Rv genome annotation. The *mfpAE* operon is boxed in red.

23

24 **Figure 6: Synthetic scheme of the variants evidenced by WGS analysis in both the FQ-R**
25 **strains selected *in vivo* and FQ-R clinical strains without mutation in *gyrA/B* classified by**

26 **cellular processes.** The PROVEAN scores are indicated for the non-synonymous mutations
27 (deleterious in red and neutral in green). This figure was created on BioRender.com.

28 **Figure 7: Schematic representation of the large-scale genomic duplications published and**
29 **evidenced in this study.** The duplications previously described in *M. tuberculosis* strains are
30 represented in black ^{21, 23, 22}, in *M. bovis* BCG in pink, in a *M. tuberculosis* mutant deleted for
31 the *esxGH* region ⁴³ in purple, and those observed in our study are represented in blue. The loci
32 of the boundaries and the size for each duplication are indicated by dashed lines. The *mfpAE*
33 operon is shown in red. The 38-kb insert of the I358 cosmid used in this study is represented in
34 grey.

35 **Figure 8 (preliminary results) :** Relative expression ratios (RR) of transcription of *mfpA* in
36 H37Rv parental strain used to inoculate the mice (H37Rv) and four FQ-R strains isolated from
37 treated mice, among which three with a 180-kb duplication, and one with no duplication. The
38 H37Rv parental was used as the control strain to calculate the ratio, so its RR is equal to 1.

39

40

41

Figure 1

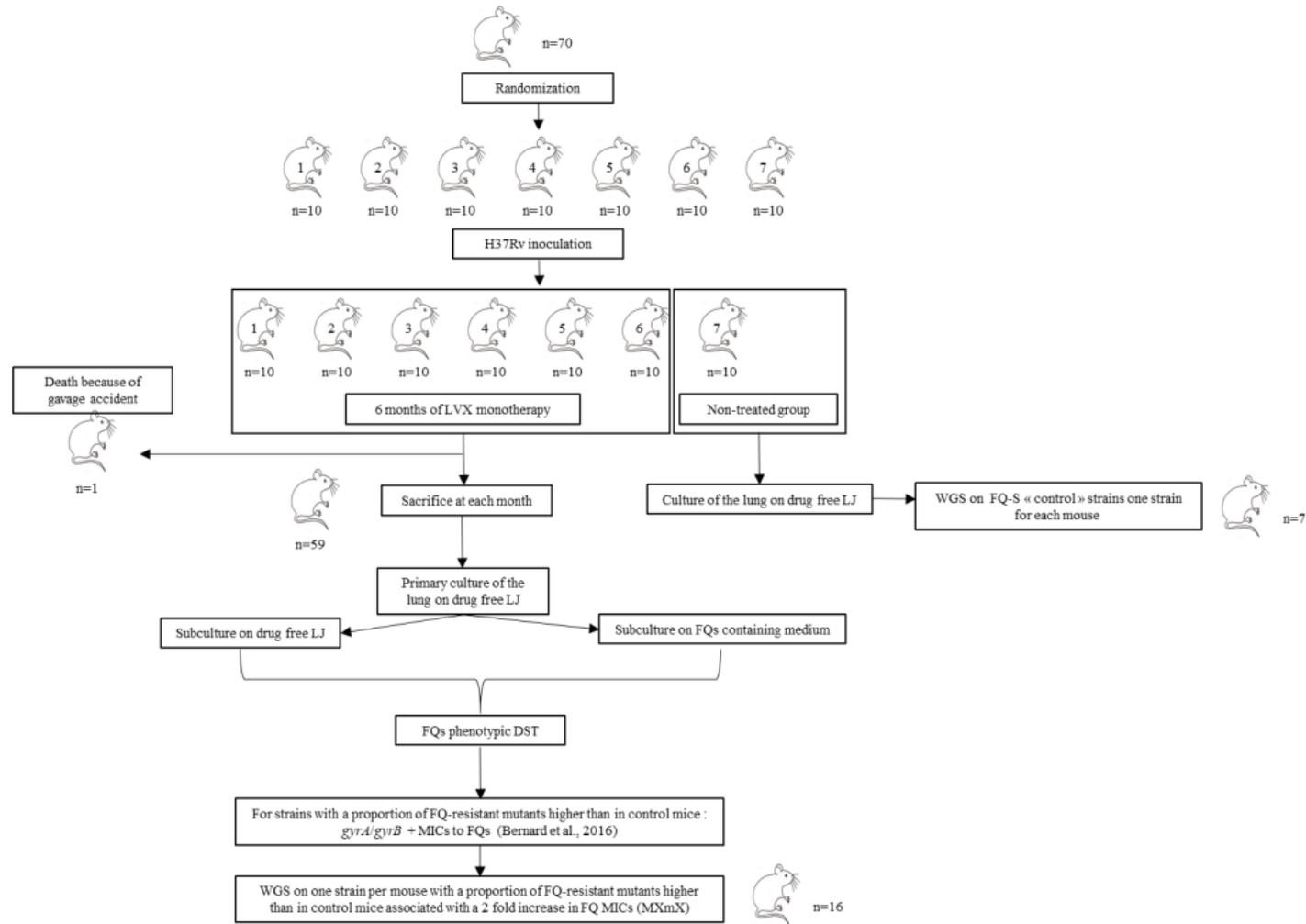


Figure 2

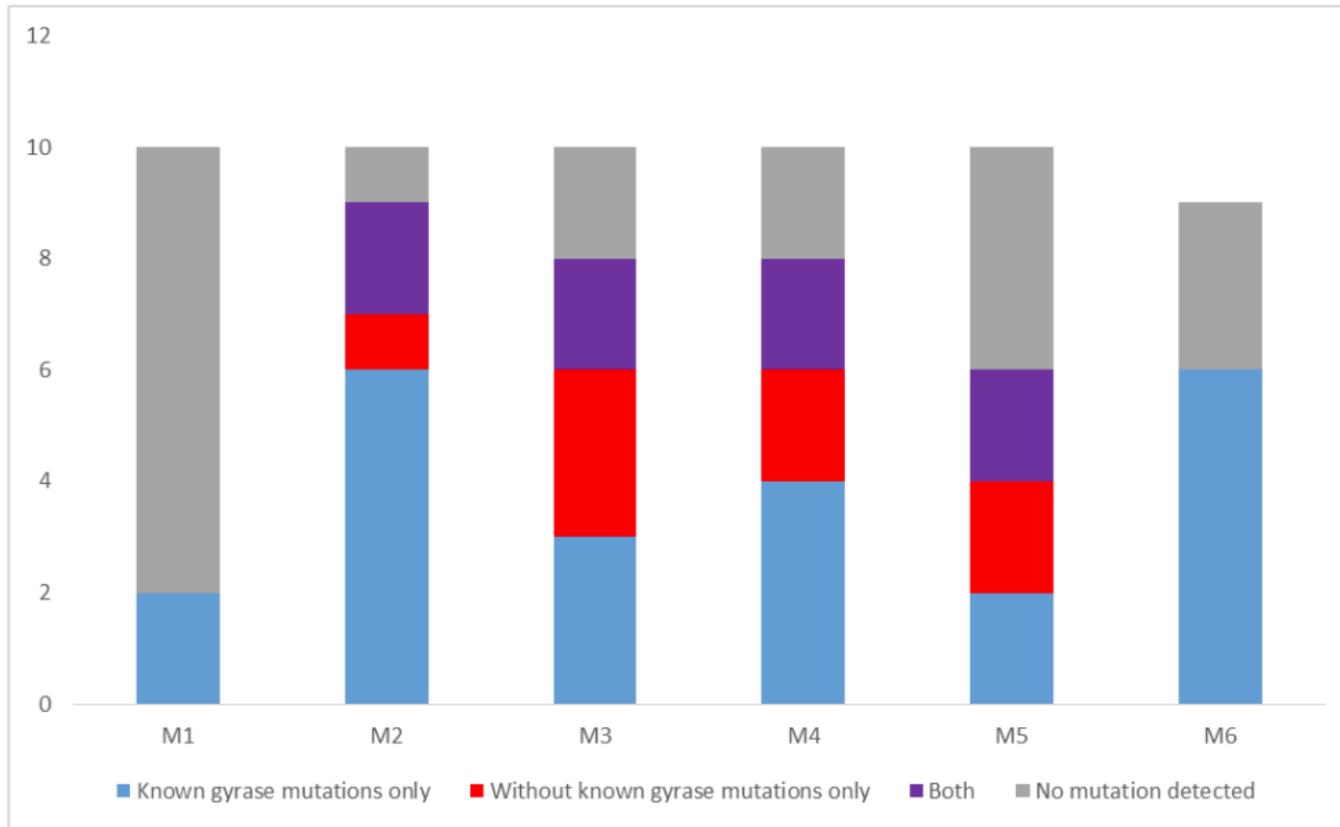


Figure 3

LVX monotherapy

Time of sacrifice	M2			M3				M4				M5				M6
Mouse number	2	3	6	2	4	8	9	1	2	4	5	1	6	8	9	
LVX MIC*	2x	2x	2x	2x	2x	1x	2x	1x	2x	2x	2x	2x	2x	2x	2-4x	
MXF MIC*	8x	4x	4x	2x	2x	2x	4x	1x	4x	4x	4x	2x	4x	2x	4x	
Large-scale duplication	no	yes (180 kb)	yes (180 kb)	no	yes (180 kb)	yes (180 kb)	yes (180 kb)	no	yes (89 kb)	no	no	no	yes (180 kb)	no	no	
Fixed** mutations	PriA S197G QcrA P387L	0	0	0	Rv3253c M400T Rv3668c A225S	0	0	Rv0281 F70V Rv2818 Y365H	AlaS E102A	MhuD E58K	0	Rv0281 N294K AtsA D133A	GyrA E303Q Rv3413c V144V	MfpC V88V Rv3668c A225S	GyrA E303Q EccC5 I1357T Rv3413c V144V	
Unfixed mutations (variant %)	0	0	0	CcsA G80E (89,5%) FtsH T630A (73,5%)	0	0	0	0	0	SigC D134G (34%)	0	0	0	EccD3 T304P (41%)	0	
InDels	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	Rv1819c (BacA) c269ins	0	0	Rv2081c c129ins	

Figure 4

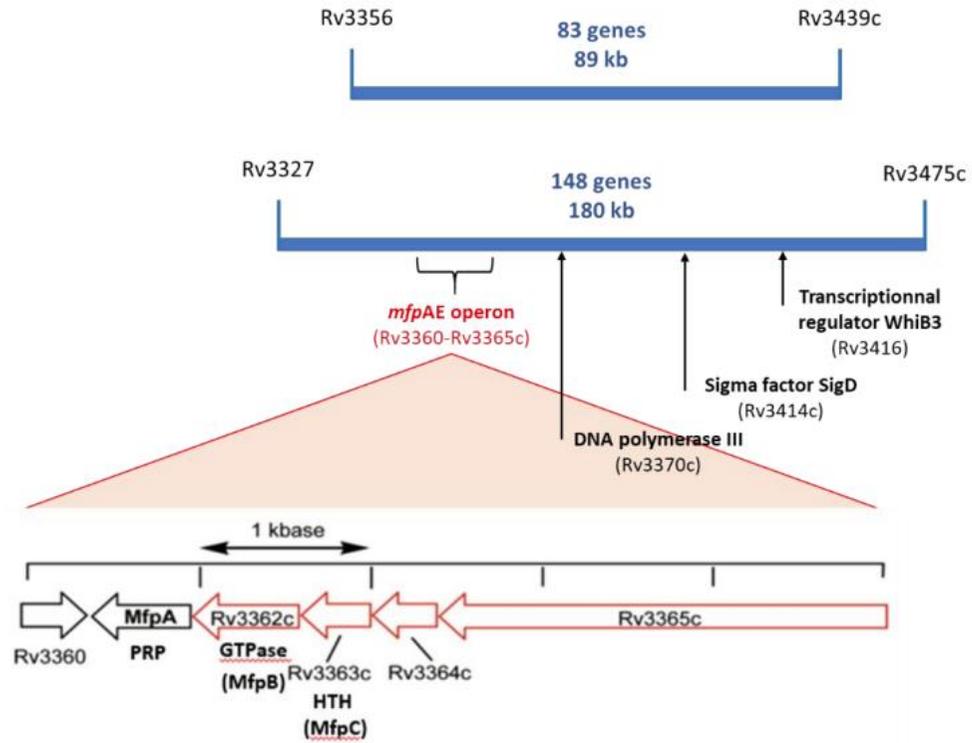
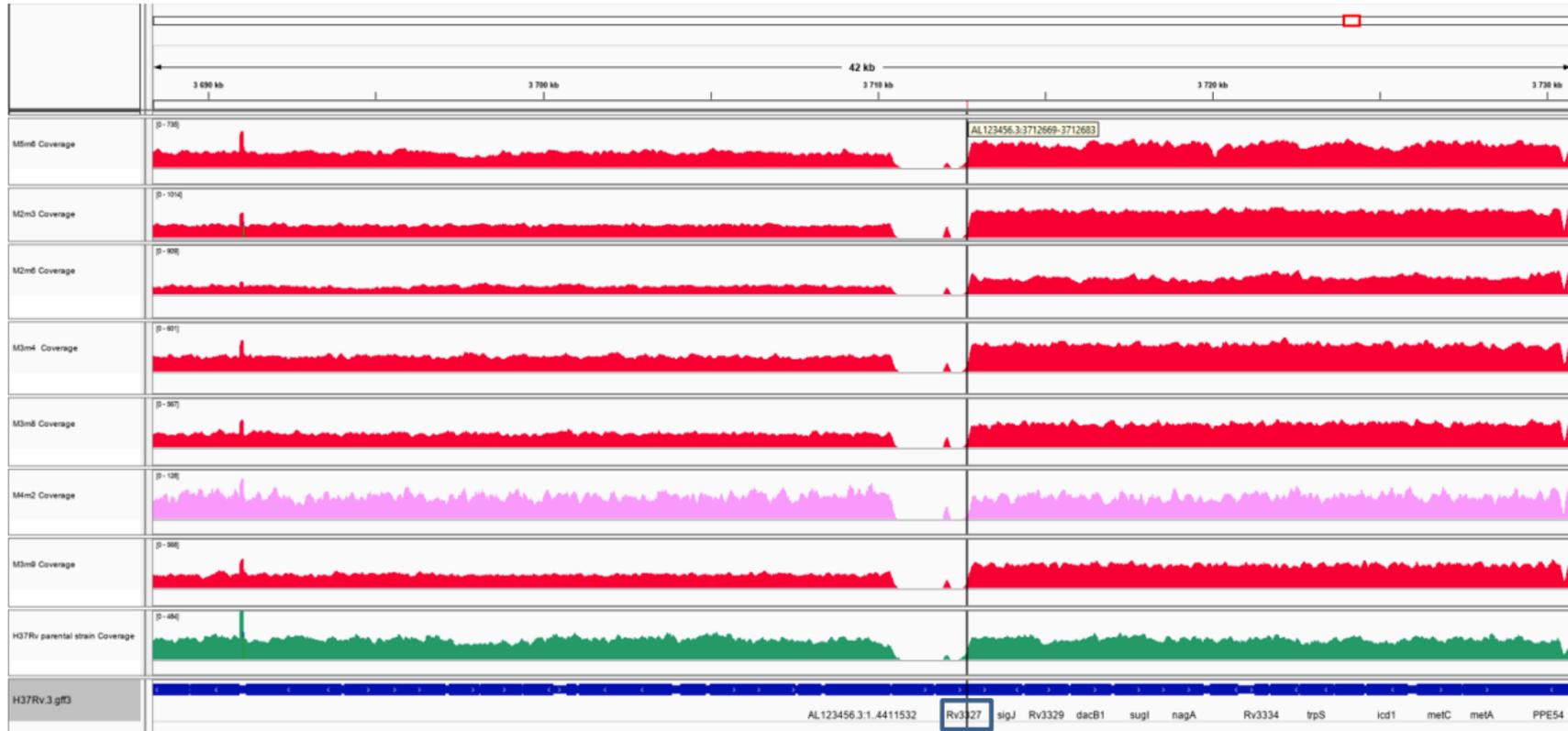
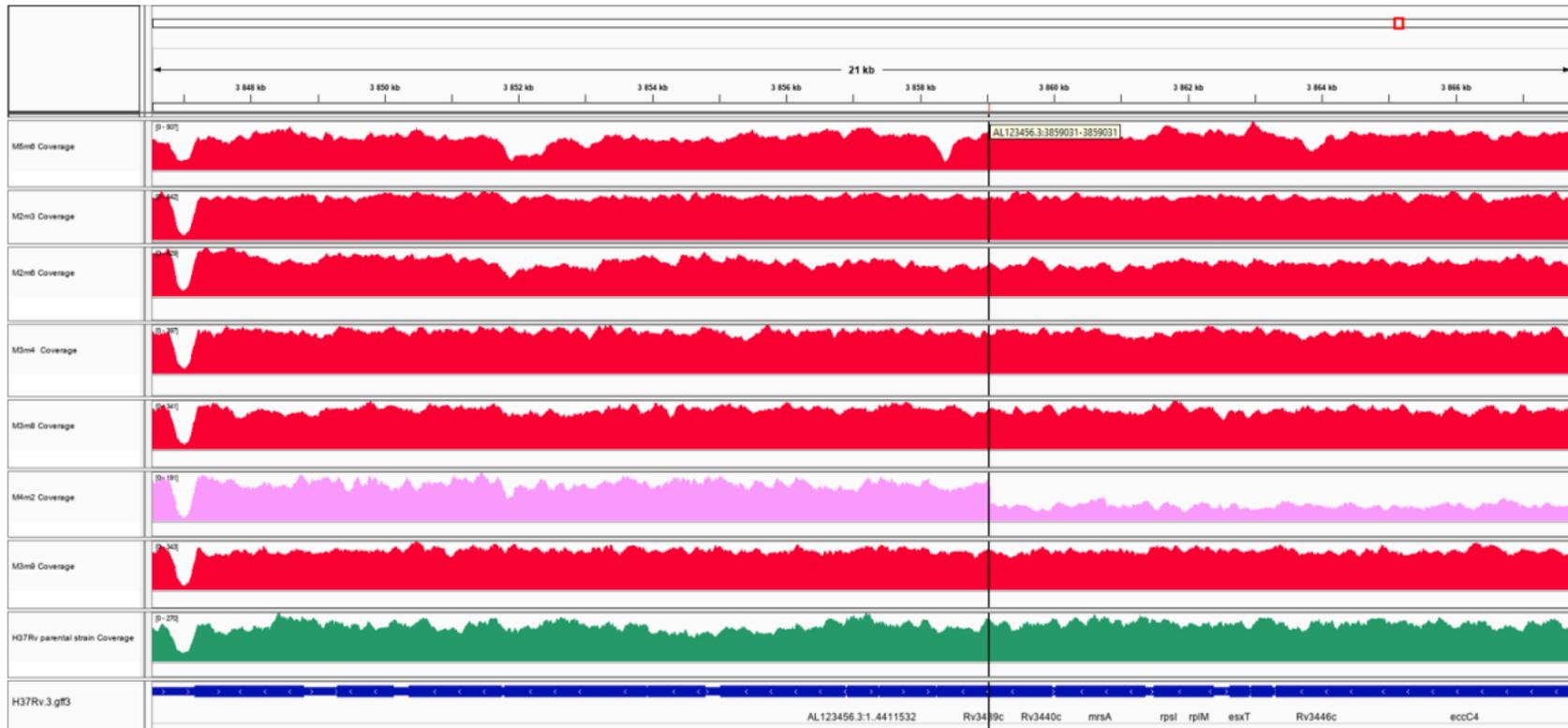


Figure 5







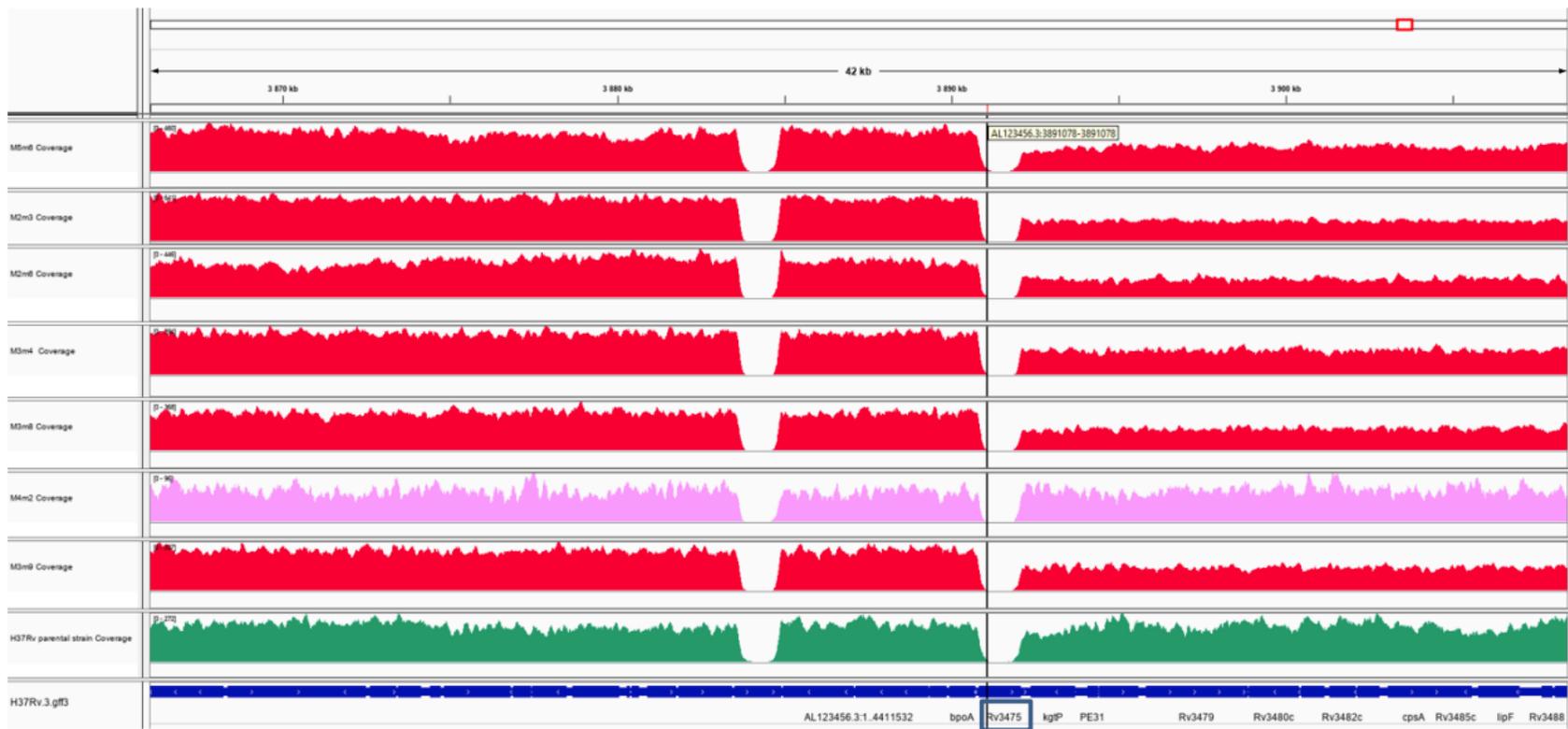


Figure 6

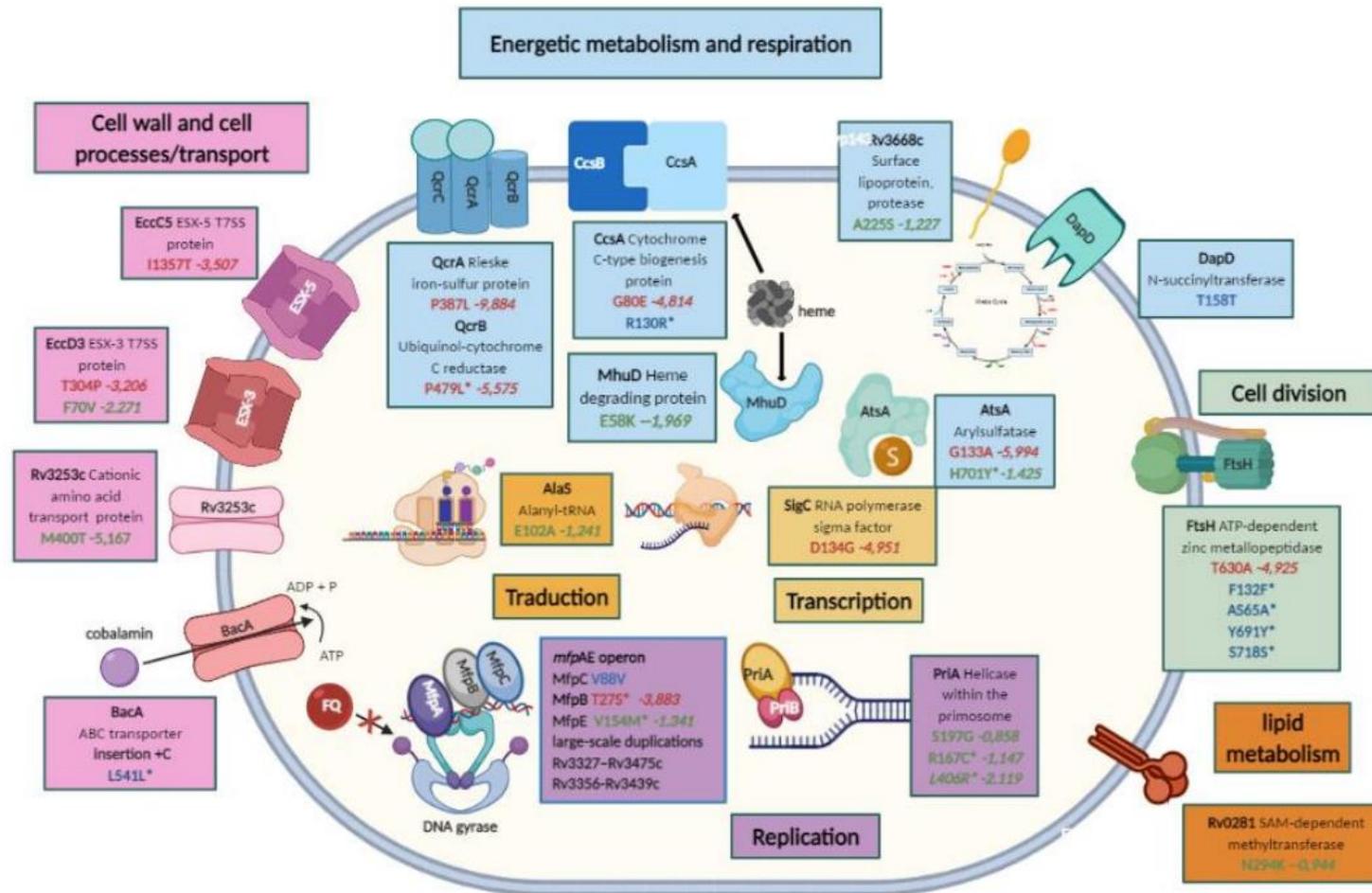


Figure 7

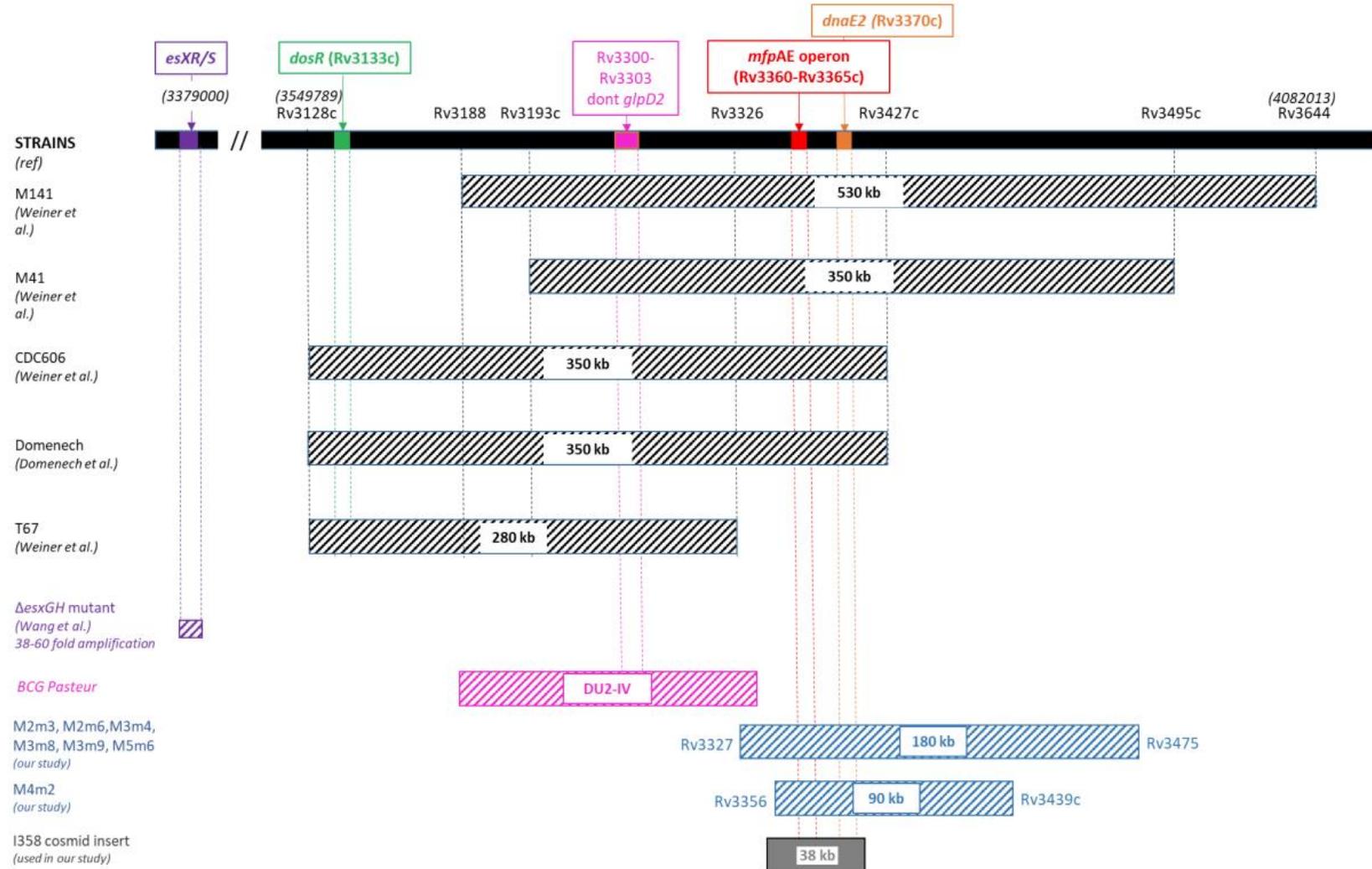


Figure 8

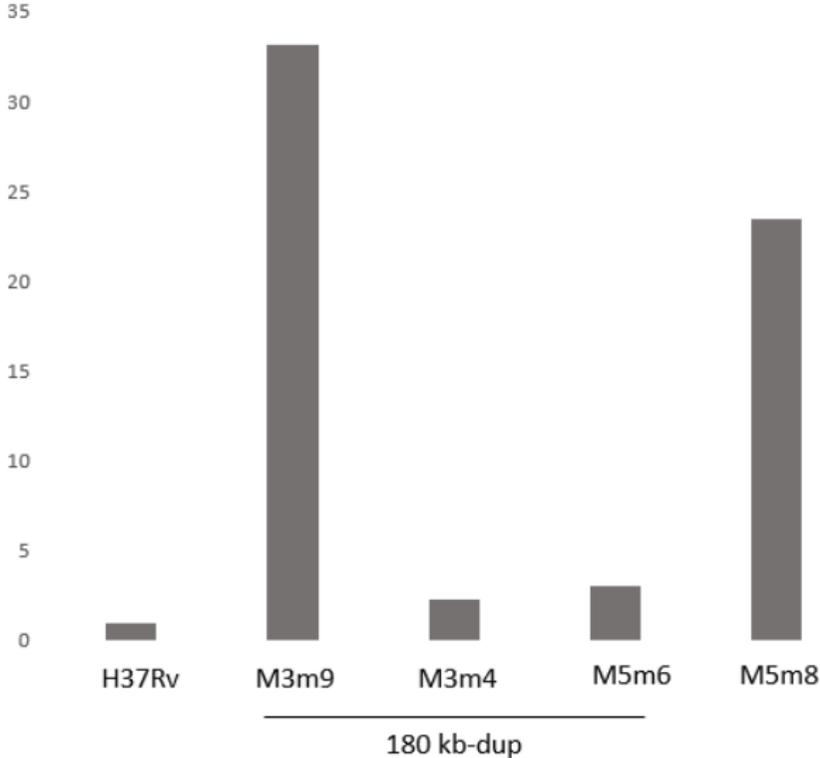


Table S1: SNVs identified by the three pipelines used for WGS analysis among the 14 FQ-R isogenic strains and the six FQ-R clinical strains without DAN gyrase mutations collected at the NRC-MyRMA. Mutations also identified in one control strain isolated from a non-treated mice are in italics.

	SNVs	Strains	Substitution	BIONUMERICs	PhyResSe	Linux
Isogenic FQ-R strains isolated from mice	1344696 G>C	M1m2	DspD: T158T	no	yes	yes
	2459551 C>T	M2m2	QcrA: P387L	yes	yes	yes
	1578201 A>G	M2m2	PriA: S197G	no	yes	no
	620129 G>A	M3m2	CcsA: G80E	yes	yes	yes
	4050996 T>C	M3m2	FtsH: T630A	no	yes	yes
	3632386 A>G	M3m4	Rv3253c: M400T	yes	yes	yes
	<i>298698 A>G</i>	M3m6	<i>Rv0247c: A15A</i>	yes	yes	yes
	<i>2863254 G>A</i>	M3m6	<i>AraF: R387C</i>	yes	yes	yes
	4109809 C>A	M3m4, M5m8	Rv3668c: A225S	no	yes	yes
	341205 T>G	M4m1	Rv0281: F70V	yes	yes	yes
	3125002 A>G	M4m1	Rv2818c: Y365H	no	yes	no
	2876181 T>G	M4m2	AtaS: E102A	yes	yes	yes
	4034228 G>A	M4m4	MhuD: E58K	yes	yes	yes
	2327344 A>G	M4m4	SigC: D134G	no	yes	yes
	341879 C>G	M5m1	Rv0281: N294K	yes	yes	yes
	806732 G>C	M5m1	AtaA: G133A	no	yes	no
	3832614 G>A	M5m6, M5m9	Rv3413c: V144V	yes	yes	yes
	353992 A>C	M5m8	EccD3: T304P	no	yes	no
	3774241 G>T	M5m8	MspC : V88V	no	yes	no
2023326 T>C	M5m9	EccC5: I1357T	yes	yes	yes	
Total of different SNVs	20			11	20	15
FQ-R clinical strains without mutations in <i>gyrA</i> and <i>gyrB</i>	620280 C>T	C1510097996	CcsA: R130R	yes	yes	yes
	808435 C>T	C1711111720	AtaA: H701Y	yes	yes	yes
	1578111 C>T	C1510097996	PriA: R167C	yes	yes	yes
	1578829 T>G	C2105082467	PriA: L406R	yes	yes	yes
	2063106 C>T	C1401047927 C1510097996	BacA: L541L	yes	yes	yes
	2461113 C>T	C1706098817 C1401047927	QcrB: P479L	yes	yes	yes
	3774077 T>A	C1510097996 C1711111720	MspE: T27S	yes	yes	yes
	3777042 C>T	C1406063055	MspE: V154M	yes	yes	yes
	4050730 G>A	C1510097996	FtsH: S718S	yes	yes	yes
	4051189 C>A	C1706098817	FtsH: A565A	yes	yes	yes
	4052488 G>A	C1706098817	FtsH: F132F	yes	yes	yes
	4052770 G>C	C1706098817	FtsH: T38T	yes	yes	yes
	Total of different SNVs	12			12	12

Table S2: List of genes located inside the two large-scale duplications identified in FQ-R strains selected in mice. The genes belonging to the *mfp*AE operon are in bold.

Type of duplication	Locus	Name	Description	start_position	end_position
180-kb	Rv3327	Rv3327	transposase fusion protein	3711749	3713461
	Rv3328c	sigJ	ECF RNA polymerase sigma factor SigJ	3713394	3714332
	Rv3329	Rv3329	aminotransferase	3714392	3715708
	Rv3330	dacB1	penicillin-binding protein DacB	3715777	3716994
	Rv3331	sugI	sugar-transport integral membrane protein SugI	3717090	3718598
	Rv3332	nagA	N-acetylglucosamine-6-phosphate deacetylase NagA	3718595	3719746
	Rv3333c	Rv3333c	hypothetical protein	3719937	3720782
	Rv3334	Rv3334	MerR family transcriptional regulator	3721257	3721697
	Rv3335c	Rv3335c	integral membrane protein	3721731	3722600
	Rv3336c	trpS	tryptophan--tRNA ligase	3722621	3723631
	Rv3337	Rv3337	hypothetical protein	3723728	3724548
	Rv3339c	icd1	isocitrate dehydrogenase	3724615	3725844
	Rv3340	metC	O-acetylhomoserine sulfhydrylase	3726127	3727476
	Rv3341	metA	homoserine O-acetyltransferase	3727488	3728627
	Rv3342	Rv3342	methyltransferase	3728624	3729355
	Rv3343c	PPE54	PPE family protein PPE54	3729364	3736935
	Rv3344c	PE_PGRS49	PE-PGRS family protein PE_PGRS49	3736984	3738000
	Rv3345c	PE_PGRS50	PE-PGRS family protein PE_PGRS50	3738158	3742774
	Rv3346c	Rv3346c	transmembrane protein	3743198	3743455
	Rv3347c	PPE55	PPE family protein PPE55	3743711	3753184
	Rv3348	Rv3348	transposase	3753765	3754256
	Rv3349c	Rv3349c	transposase	3754293	3755237
Rv3350c	PPE56	PPE family protein PPE56	3755952	3767102	
Rv3351c	Rv3351c	hypothetical protein	3767346	3768140	

	Rv3352c	Rv3352c	oxidoreductase	3768222	3768593
	Rv3353c	Rv3353c	hypothetical protein	3768736	3768996
	Rv3354	Rv3354	hypothetical protein	3769111	3769500
	Rv3355c	Rv3355c	integral membrane protein	3769514	3769807
89-kb	Rv3356c	folD	bifunctional methylenetetrahydrofolate dehydrogenase/methenyltetrahydrofolate cyclohydrolase	3769804	3770649
	Rv3357, relB3, yefM	relJ	antitoxin RelJ	3770773	3771048
	Rv3358, relE3, yoeB	relK	toxin RelK	3771045	3771302
	Rv3359	Rv3359	oxidoreductase	3771344	3772534
	Rv3360	Rv3360	hypothetical protein	3772651	3773019
	Rv3361c	Rv3361c	pentapeptide repeat protein	3773016	3773567
	Rv3362c	Rv3362c	ATP/GTP-binding protein	3773574	3774155
	Rv3363c	Rv3363c	Helix-turn-helix protein	3774136	3774504
	Rv3364c	Rv3364c	hypothetical protein	3774482	3774874
	Rv3365c	Rv3365c	hypothetical protein	3774871	3775501
	Rv3366	spoU	tRNA/rRNA methylase SpoU	3777737	3778201
	Rv3367	PE_PGRS51	PE-PGRS family protein PE_PGRS51	3778568	3780334
	Rv3368c	Rv3368c	oxidoreductase	3780335	3780979
	Rv3369	Rv3369	hypothetical protein	3780978	3781412
	Rv3370c	dnaE2	error-prone DNA polymerase	3781501	3784740
	Rv3371	Rv3371	diacylglycerol O-acyltransferase	3784932	3786272
	Rv3372	otsB2	trehalose 6-phosphate phosphatase	3786314	3787489
	Rv3373	echA18	enoyl-CoA hydratase	3787726	3788367
	Rv3374, echA18'	Rv3374	hypothetical protein	3788368	3788616
	Rv3375	amiD	amidase	3788621	3790048
	Rv3376	Rv3376	phosphatase	3790156	3790809
	Rv3377c	Rv3377c	type B diterpene cyclase	3790848	3792353
	Rv3378c	Rv3378c	diterpene synthase	3792358	3793248
	Rv3379c	dxs2	1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase	3793257	3794867
	Rv3382c	Rv3382c	4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate reductase	3796448	3797437

Rv3383c	idsB	polyprenyl synthetase IdsB	3797437	3798489
Rv3384c	vapC46	ribonuclease VapC46	3799243	3799635
Rv3385c	vapB46	antitoxin VapB46	3799635	3799943
Rv3386	Rv3386	transposase	3800092	3800796
Rv3387	Rv3387	transposase	3800786	3801463
Rv3388	PE_PGRS52	PE-PGRS family protein PE_PGRS52	3801653	3803848
Rv3389c	htdY	3-hydroxyacyl-thioester dehydratase HtdY	3803919	3804791
Rv3390	lpqD	lipoprotein LpqD	3804865	3805575
Rv3391	acrA1	acyl-CoA-reductase AcrA	3805621	3807573
Rv3392c	cmaA1	cyclopropane mycolic acid synthase CmaA	3807574	3808437
Rv3393	iunH	nucleoside hydrolase	3808461	3809387
Rv3394c	Rv3394c	hypothetical protein	3809442	3811025
Rv3395A	Rv3395A	membrane protein	3811719	3812345
Rv3395c	Rv3395c	hypothetical protein	3811022	3811636
Rv3396c	guaA	GMP synthase	3812501	3814078
Rv3397c, crtB	phyA	phytoene synthase	3814090	3814998
Rv3398c, idsA	idsA1	multifunctional dimethylallyltransferase/geranyltranstransferase/farnesyltranstransferase	3815027	3816106
Rv3399	Rv3399	S-adenosylmethionine-dependent methyltransferase	3816129	3817175
Rv3400	Rv3400	hydrolase	3817239	3818027
Rv3401	Rv3401	glycosyl hydrolase	3818042	3820402
Rv3402c	Rv3402c	hypothetical protein	3820653	3821891
Rv3403c	Rv3403c	hypothetical protein	3822262	3823863
Rv3404c	Rv3404c	hypothetical protein	3823880	3824584
Rv3405c	Rv3405c	HTH-type transcriptional regulator	3824702	3825268
Rv3406	Rv3406	dioxygenase	3825330	3826217
Rv3407	vapB47	antitoxin VapB47	3826252	3826551
Rv3408	vapC47	ribonuclease VapC47	3826548	3826958
Rv3409c	choD	cholesterol oxidase	3826991	3828727
Rv3410c	guaB3	oxidoreductase	3828783	3829910

Rv3411c	guaB2	inosine-5'-monophosphate dehydrogenase	3829930	3831519
Rv3412	Rv3412	hypothetical protein	3831726	3832136
Rv3413c	Rv3413c	anti-sigma-D factor RsdA	3832146	3833045
Rv3414c	sigD	ECF RNA polymerase sigma factor SigD	3833038	3833676
Rv3415c	Rv3415c	hypothetical protein	3833694	3834521
Rv3416, whmB	whiB3	redox-responsive transcriptional regulator WhiB3	3834892	3835200
Rv3417c, cpn60_1	groEL1	chaperonin GroEL	3835272	3836891
Rv3418c, cpn10, mpt57	groES	chaperonin GroES	3836986	3837288
Rv3419c	gcp	O-sialoglycoprotein endopeptidase	3837555	3838589
Rv3420c	rimI	ribosomal-protein-alanine acetyltransferase RimI	3838586	3839062
Rv3421c	Rv3421c	hypothetical protein	3839059	3839694
Rv3422c	Rv3422c	tRNA threonylcarbamoyladenosine biosynthesis protein	3839691	3840197
Rv3423c	alr	alanine racemase	3840194	3841420
Rv3424c	Rv3424c	hypothetical protein	3841714	3842076
Rv3425	PPE57	PPE family protein PPE57	3842239	3842769
Rv3426	PPE58	PPE family protein PPE58	3843036	3843734
Rv3427c	Rv3427c	transposase	3843885	3844640
Rv3428c	Rv3428c	transposase	3844738	3845970
Rv3429	PPE59	PPE family protein PPE59	3847165	3847701
Rv3430a	Rv3430a	hypothetical protein	3848844	3848999
Rv3430c	Rv3430c	transposase	3847642	3848805
Rv3432c	gadB	glutamate decarboxylase GadB	3850372	3851754
Rv3433c	Rv3433c	bifunctional ADP-dependent (S)-NAD(P)H-hydrate dehydratase/NAD(P)H-hydrate epimerase	3851792	3853213
Rv3434c	Rv3434c	transmembrane protein	3853215	3853928
Rv3435c	Rv3435c	transmembrane protein	3853939	3854793
Rv3436c	glmS	glucosamine--fructose-6-phosphate aminotransferase	3855015	3856889
Rv3437	Rv3437	transmembrane protein	3856911	3857387
Rv3438	Rv3438	hypothetical protein	3857397	3858239

	Rv3439c	Rv3439c	hypothetical protein	3858259	3859662
	Rv3440c	Rv3440c	hypothetical protein	3859665	3859976
	Rv3441c	mrsA	phosphoglucosamine mutase	3860024	3861370
	Rv3442c	rpsI	30S ribosomal protein S9	3861495	3861950
	Rv3443c	rplM	50S ribosomal protein L13	3861947	3862390
	Rv3444c	esxT	ESAT-6 like protein EsxT	3862624	3862926
	Rv3445c	esxU	ESAT-6 like protein EsxU	3862947	3863264
	Rv3446c	Rv3446c	hypothetical protein	3863317	3864531
	Rv3447c	eccC4	ESX-4 secretion system protein EccC4	3864528	3868238
	Rv3448	eccD4	ESX-4 secretion system protein EccD4	3868352	3869755
	Rv3449	mycP4	membrane-anchored mycosin	3869752	3871119
	Rv3450c	eccB4	ESX-4 secretion system protein EccB4	3871084	3872496
	Rv3451, clp3, culp3	cut3	cutinase	3872617	3873405
	Rv3452, clp4, culp4	cut4	cutinase	3873452	3874132
	Rv3453	Rv3453	hypothetical protein	3874404	3876090
	Rv3455c	truA	tRNA pseudouridine synthase A	3876052	3876822
	Rv3456c	rplQ	50S ribosomal protein L17	3876890	3877432
	Rv3457c	rpoA	DNA-directed RNA polymerase subunit alpha	3877464	3878507
	Rv3458c	rpsD	30S ribosomal protein S4	3878659	3879264
	Rv3459c	rpsK	30S ribosomal protein S11	3879273	3879692
	Rv3460c	rpsM	30S ribosomal protein S13	3879696	3880070
	Rv3461c	rpmJ	50S ribosomal protein L36	3880286	3880399
	Rv3462c	infA	translation initiation factor IF-1	3880432	3880653
	Rv3463	Rv3463	hypothetical protein	3880907	3881764
	Rv3464, rfbB	rmlB	dTDP-glucose 4,6-dehydratase	3881837	3882832
	Rv3465, rfbC	rmlC	dTDP-4-dehydrorhamnose 3,5-epimerase	3882834	3883442
	Rv3466	Rv3466	hypothetical protein	3883525	3884193
	Rv3467	Rv3467	hypothetical protein	3883964	3884917
	Rv3468c, rmlB3	Rv3468c	dTDP-glucose 4,6-dehydratase	3884975	3886069

	Rv3469c	mhpE	4-hydroxy-2-oxovalerate aldolase MhpE	3886073	3887083
	Rv3470c	ilvB2	acetolactate synthase large subunit	3887144	3888802
	Rv3471c	Rv3471c	hypothetical protein	3888808	3889341
	Rv3472	Rv3472	hypothetical protein	3889362	3889868
	Rv3473c	bpoA	peroxidase BpoA	3889948	3890733
	Rv3474	Rv3474	Possible transposase for insertion element IS6110 (fragment)	3890830	3891156
	Rv3475	Rv3475	Possible transposase for insertion element IS6110 [second part]	3891105	3892091

Table S3: FQ activities against *M. tuberculosis* WT DNA gyrase and with the E303Q substitution.

Fluoroquinolone ^a	WT	E303Q
OFX	48	51
MXF	7	10
LVX	15	13

^a OFX, ofloxacin; LVX, levofloxacin; MXF, Moxifloxacin

Table S3: Mutations found genes already described as involved in FQ-R in the literature (other than those commonly found mutated with FQ-R isogenic strains isolated from mice).

Gene	Protein	Function	Strain	Mutation	PROVEAN score
Rv0005	GyrB	DNA gyrase	C1510097996	P400P	NA
Rv0006	GyrA	DNA gyrase	C1510097996	G184G	NA
			C2105082467	L653L	NA
Rv1634	Efflux pump	Major Facilitator Superfamily transporter	C1510097996, C1401047927	I47V	0.318
Rv1258c	Tap	Major Facilitator Superfamily transporter	C2105082467	H343H	NA
Rv0933	PstB	phosphate ABC transporter	C1510097996	R47H	-1.185

Table S4: SNVs and InDels recovered for the clinical strain C1401047927.

Position	Reference	Sample	Type	Gene	AA Exchange
13158	C	T	SNP	Rv0010c	Gly134Asp
13275	T	C	SNP	Rv0010c	Tyr95Cys
13482	G	A	SNP	Rv0010c	Ala26Val(s)
22961	T	G	SNP	Rv0018c (pstP)	Asp74Ala
23174	C	A	SNP	Rv0018c (pstP)	Arg3Leu
27156	C	T	SNP	Rv0022c (whiB5)	Gly96Asp
38332	G	T	SNP	Rv0035 (fadD34)	Glu358Asp
50557	T	C	SNP	Rv0046c (ino1)	Arg190Gly
54785	G	A	SNP	Rv0050 (ponA1)	Gly375Ser
55069	G	C	SNP	Rv0050 (ponA1)	Leu(s)469Phe
55540	G	GCCGCCGCCT	INS	Rv0050 (ponA1)	
64028	C	T	SNP	Rv0060	silent (Pro40)
82897	C	T	SNP	Rv0074	silent (Gly50)
84528	T	G	SNP	Rv0075	Phe178Cys
97767	C	T	SNP	Rv0089	Pro4Ser
102650	A	C	SNP	Rv0092 (ctpA)	Thr690Pro
104856	C	T	SNP	Rv0095c	silent (Leu120)
104858	G	A	SNP	Rv0095c	Leu120Leu(s)
105007	C	G	SNP	Rv0095c	Ser70Thr
105011	G	A	SNP	Rv0095c	Leu69Leu(s)
114519	G	A	SNP	Rv0101 (nrp)	Glu150Lys
114821	C	T	SNP	Rv0101 (nrp)	silent (Asp1607)
117295	G	A	SNP	Rv0101 (nrp)	Ser2432Asn
140857	C	T	SNP	Rv0116c (ldtA)	Val(s)56Met(s)
152602	C	T	SNP	Rv0126 (treS)	silent (Asp93)
164683	C	T	SNP	Rv0136 (cyp138)	Arg440STOP
165741	C	T	SNP	Rv0138	Ala140Val(s)
166188	C	T	SNP	Rv0139	Ala121Val(s)
167621	C	G	SNP	Rv0141c	Glu21Gln
170642	T	G	SNP	Rv0144	Leu120Arg
181779	A	G	SNP	Rv0153c (ptbB)	silent (Val69)
192924	C	A	SNP	Rv0162c (adhE1)	Arg71Leu
196391	G	A	SNP	Rv0166 (fadD5)	Glu467Lys
202006	C	G	SNP	Rv0171 (mce1C)	Pro359Ala
226929	C	T	SNP	Rv0194	Arg18Cys
228258	C	T	SNP	Rv0194	Gln461STOP
234496	C	CGT	INS	Rv0197	
249522	T	C	SNP	Rv0209	Val(s)162Ala
250952	G	A	SNP	Rv0210	Arg278Gln
264976	C	T	SNP	Rv0221	Arg304Cys
278189	T	C	SNP	Rv0232	silent (Asp97)
281208	C	T	SNP	Rv0235c	silent (Pro469)

289300	C	T	SNP	Rv0239 (vapB24)	Ser66Phe
295304	C	T	SNP	Rv0244c (fadE5)	Val(s)110Val
299671	G	A	SNP	Rv0248c	Thr378Met(s)
303315	C	T	SNP	Rv0252 (nirB)	silent (Ala150)
309756	C	T	SNP	Rv0257	Arg20Cys
311167	T	C	SNP	Rv0259c	silent (Ser117)
312138	C	A	SNP	Rv0260c	Val(s)174Val
313425	G	T	SNP	Rv0261c (narK3)	silent (Ile248)
328346	T	C	SNP	Rv0271c (fadE6)	Asn39Ser
352572	C	T	SNP	Rv0289 (espG3)	Arg142Trp
376033	C	T	SNP	Rv0306	silent (Ala40)
379029	G	A	SNP	Rv0310c	silent (Thr40)
381030	A	G	SNP	Rv0312	Ser159Gly
394803	G	A	SNP	Rv0329c	Pro173Leu
406389	G	A	SNP	Rv0339c	Ala687Val(s)
423334	G	A	SNP	Rv0352 (dnaJ1)	Asp295Asn
436382	C	A	SNP	Rv0357c (purA)	Gly130Cys
457437	C	T	SNP	Rv0381c	silent (Leu129)
458885	C	T	SNP	Rv0383c	Cys144Tyr
464914	G	A	SNP	Rv0386	Glu502Lys
466372	G	A	SNP	Rv0386	Glu988Lys
476437	T	C	SNP	Rv0397A	Ile15Thr
485631	C	T	SNP	Rv0404 (fadD30)	Pro552Leu
486603	T	TG	INS	Rv0405 (pks6)	
495746	T	C	SNP	Rv0410c (pknG)	silent (Arg523)
497247	G	A	SNP	Rv0410c (pknG)	Thr23Met(s)
520400	T	G	SNP	Rv0433	Phe26Cys
529363	C	T	SNP	Rv0440 (groEL2)	silent (Val252)
548892	C	T	SNP	Rv0457c	Gly239Glu
549747	G	A	SNP	Rv0458	Gly25Arg
553136	A	G	SNP	Rv0462 (lpdC)	Ile175Val
557841	C	T	SNP	Rv0467 (ic11)	silent (Thr105)
565218	G	A	SNP	Rv0474	Leu(s)66Leu
575797	C	T	SNP	Rv0486 (mshA)	silent (Ile150)
576729	C	T	SNP	Rv0486 (mshA)	Ser461Leu(s)
590463	G	A	SNP	Rv0500 (proC)	silent (Pro127)
605615	C	A	SNP	Rv0513	silent (Thr4)
608777	A	C	SNP	Rv0517	Gln11Pro
636783	C	T	SNP	Rv0545c (pitA)	Val(s)227Val
641416	C	T	SNP	Rv0551c (fadD8)	Val(s)466Met(s)
641642	G	A	SNP	Rv0551c (fadD8)	silent (Val390)
643666	T	C	SNP	Rv0552	Cys260Arg
659165	C	T	SNP	Rv0567	Ala282Val(s)
660465	C	T	SNP	Rv0568 (cyp135B1)	Ala339Val
667021	A	G	SNP	Rv0573c (pncB2)	silent (Arg74)

667468	C	T	SNP	Rv0574c	silent (Leu309)
701867	C	T	SNP	Rv0605	silent (Asp154)
705570	C	T	SNP	Rv0610c	Val114Ile
725900	G	C	SNP	Rv0631c (recC)	Leu803Val
745876	C	G	SNP	Rv0648	Ala1053Gly
754321	G	T	SNP	Rv0658c	Ala30Asp
754944	G	A	SNP	Rv0659c (mazF2)	Pro17Leu
754974	C	T	SNP	Rv0659c (mazF2)	Trp7STOP
765171	C	T	SNP	Rv0668 (rpoC)	Pro601Leu
766658	C	T	SNP	Rv0668 (rpoC)	Arg1097Trp
771950	C	T	SNP	Rv0672 (fadE8)	Thr156Ile
784450	C	T	SNP	Rv0684 (fusA1)	Leu656Leu(s)
788354	C	A	SNP	Rv0688	silent (Arg139)
808435	C	T	SNP	Rv0711 (atsA)	His701Tyr
818061	C	T	SNP	Rv0725c	silent (Glu128)
819110	C	T	SNP	Rv0726c	silent (Ala177)
825925	A	G	SNP	Rv0732 (secY)	Ile376Val
832246	A	G	SNP	Rv0740	silent (Gln157)
842111	C	G	SNP	Rv0750	Leu27Val(s)
842176	C	T	SNP	Rv0750	silent (Asp48)
842221	A	G	SNP	Rv0750	silent (Gln63)
861091	G	A	SNP	Rv0768 (aldA)	silent (Ser60)
867296	C	T	SNP	Rv0773c (ggtA)	Asp32Asn
868535	C	T	SNP	Rv0775	silent (Ala43)
869123	A	C	SNP	Rv0776c	Val(s)214Gly
870112	C	T	SNP	Rv0777 (purB)	silent (Ala35)
872113	C	T	SNP	Rv0778 (cyp126)	Ala228Val
880482	C	T	SNP	Rv0785	silent (Arg381)
902521	C	T	SNP	Rv0808 (purF)	silent (Asn137)
903183	A	G	SNP	Rv0808 (purF)	Gln358Arg
911927	C	T	SNP	Rv0819 (mshD)	silent (Tyr64)
912824	G	A	SNP	Rv0820 (phoT)	silent (Thr33)
913431	A	C	SNP	Rv0820 (phoT)	Ser236Arg
932697	C	T	SNP	Rv0836c	Arg79His
939068	C	T	SNP	Rv0842	silent (Arg319)
953002	T	G	SNP	Rv0856	Trp60Gly
961623	A	G	SNP	Rv0862c	silent (Asp330)
972653	G	A	SNP	Rv0874c	Pro352Ser
988700	C	T	SNP	Rv0888	Arg490Trp
1009823	A	G	SNP	Rv0906	Ile294Val
1016131	C	A	SNP	Rv0911	Pro245Gln
1035797	T	G	SNP	Rv0928 (pstS3)	Phe299Val
1039981	T	C	SNP	Rv0932c (pstS2)	silent (Lys356)
1040706	A	C	SNP	Rv0932c (pstS2)	Ser115Ala
1065616	C	T	SNP	Rv0954	Pro164Ser

1066021	G	A	SNP	Rv0954	Gly299Arg
1075618	G	A	SNP	Rv0963c	silent (Ser160)
1082433	G	A	SNP	Rv0971c (echA7)	Ala51Val(s)
1087718	A	G	SNP	Rv0975c (fadE13)	Leu260Pro
1103995	C	T	SNP	Rv0987	Thr485Ile
1104259	G	A	SNP	Rv0987	Arg573His
1105925	G	T	SNP	Rv0988	Leu(s)270Phe
1121071	G	A	SNP	Rv1004c	Leu360Leu(s)
1141072	G	A	SNP	Rv1020 (mfd)	Val(s)702Val
1151163	A	C	SNP	Rv1028c (kdpD)	Val175Gly
1153635	C	T	SNP	Rv1029 (kdpA)	Leu542Leu(s)
1156144	G	T	SNP	Rv1031 (kdpC)	Val98Phe
1175872	G	T	SNP	Rv1052	silent (Thr50)
1207038	G	A	SNP	Rv1082 (mca)	silent (Lys173)
1210770	G	A	SNP	Rv1086	Arg59Gln
1247003	G	GC	INS	Rv1123c (bpoB)	
1252538	G	A	SNP	Rv1128c	silent (Asp145)
1261056	C	T	SNP	Rv1133c (metE)	silent (Gly97)
1283799	C	T	SNP	Rv1157c	Val(s)125Met(s)
1298540	G	A	SNP	Rv1167c	silent (Gly51)
1301086	C	A	SNP	Rv1170 (mshB)	Asn261Lys
1347777	C	T	SNP	Rv1204c	Ser283Asn
1349954	CG	C	DEL	Rv1206 (fadD6)	
1357881	G	A	SNP	Rv1215c	Pro522Ser
1366473	G	A	SNP	Rv1223 (htrA)	Arg200His
1388955	G	A	SNP	Rv1246c (relE)	silent (His8)
1399129	C	T	SNP	Rv1251c	Ala38Thr
1412686	G	A	SNP	Rv1264	Asp265Asn
1414564	A	T	SNP	Rv1266c (pknH)	Ile426Asn
1414653	C	T	SNP	Rv1266c (pknH)	silent (Pro396)
1415097	C	G	SNP	Rv1266c (pknH)	silent (Ala248)
1420533	T	C	SNP	Rv1272c	silent (Arg591)
1438115	G	A	SNP	Rv1285 (cysD)	silent (Gly69)
1443606	G	C	SNP	Rv1290c	Ala481Gly
1452825	A	G	SNP	Rv1296 (thrB)	Ser277Gly
1465502	G	A	SNP	Rv1309 (atpG)	Val(s)207Met(s)
1474709	G	T	SNP	Rvnr02	rRNA
1499293	C	T	SNP	Rv1330c (pncB1)	Gly423Arg
1500728	T	C	SNP	Rv1331	Val(s)23Ala
1512234	G	C	SNP	Rv1347c (mbtK)	silent (Pro124)
1527802	C	T	SNP	Rv1358	silent (Arg397)
1545119	C	T	SNP	Rv1372	Pro99Ser
1545195	C	T	SNP	Rv1372	Ala124Val
1548038	C	T	SNP	Rv1375	silent (Asp69)
1550719	C	T	SNP	Rv1377c	Glu167Lys

1554291	T	C	SNP	Rv1381 (pyrC)	Ile35Thr
1571938	G	T	SNP	Rv1395	Val(s)298Leu(s)
1586534	C	A	SNP	Rv1410c	silent (Ala411)
1608286	G	A	SNP	Rv1431	silent (Leu68)
1610076	C	T	SNP	Rv1432	silent (Tyr76)
1612579	C	A	SNP	Rv1435c	silent (Pro124)
1612582	T	G	SNP	Rv1435c	silent (Ile123)
1647830	G	A	SNP	Rv1461	Gly281Asp
1658830	C	T	SNP	Rv1469 (ctpD)	Pro623Leu
1665032	T	C	SNP	Rv1475c (acn)	Lys339Glu
1700177	G	A	SNP	Rv1508A	silent (Pro104)
1710356	C	A	SNP	Rv1518	Thr238Lys
1712967	G	A	SNP	Rv1521 (fadD25)	silent (Pro222)
1723717	G	T	SNP	Rv1527c (pks5)	His1565Asn
1748854	C	T	SNP	Rv1547 (dnaE1)	silent (Gly387)
1754117	C	T	SNP	Rv1550 (fadD11)	silent (Val134)
1769780	C	T	SNP	Rv1564c (treX)	Asp608Asn
1778243	G	T	SNP	Rv1570 (bioD)	Val129Phe
1789756	A	G	SNP	Rv1588c	silent (Ser27)
1789795	A	G	SNP	Rv1588c	silent (Asp14)
1789798	A	G	SNP	Rv1588c	silent (Phe13)
1801454	C	A	SNP	Rv1600 (hisC1)	Leu187Met(s)
1802084	G	A	SNP	Rv1601 (hisB)	Arg17Gln
1814135	A	G	SNP	Rv1614 (lgt)	Glu322Gly
1820542	C	T	SNP	Rv1620c (cydC)	silent (Leu384)
1832738	C	T	SNP	Rv1629 (polA)	Leu692Leu(s)
1834319	G	A	SNP	Rv1630 (rpsA)	Val260Ile
1839306	A	G	SNP	Rv1634	Ile47Val
1854045	A	G	SNP	Rv1644 (tsnR)	Tyr147Cys
1874710	G	A	SNP	Rv1660 (pks10)	Gly184Asp
1885772	G	A	SNP	Rv1662 (pks8)	Ala1357Thr
1886263	C	G	SNP	Rv1662 (pks8)	His1520Gln
1887313	C	T	SNP	Rv1663 (pks17)	Gln268STOP
1890565	A	G	SNP	Rv1664 (pks9)	Asp847Gly
1892150	G	A	SNP	Rv1665 (pks11)	Gly309Ser
1919945	C	T	SNP	Rv1696 (recN)	Ser88Leu(s)
1924765	T	C	SNP	Rv1699 (pyrG)	silent (Leu313)
1924874	G	C	SNP	Rv1699 (pyrG)	Ser349Thr
1943535	G	T	SNP	Rv1715 (fadB3)	Ala293Ser
1943723	C	T	SNP	Rv1716	Leu50Leu(s)
1947176	G	A	SNP	Rv1720c (vapC12)	Arg82Cys
1950651	T	C	SNP	Rv1724c	Asp134Gly
1977005	C	T	SNP	Rv1748	His136Tyr
1989370	C	T	SNP	Rv1758 (cut1)	Pro110Leu
1990256	T	G	SNP	Rv1759c (wag22)	silent (Ser774)

1992323	GC	G	DEL	Rv1759c (wag22)	
1993808	A	T	SNP	Rv1760	Glu219Val(s)
2005532	C	A	SNP	Rv1771	silent (Thr124)
2015767	C	T	SNP	Rv1781c (malQ)	silent (Glu570)
2035986	G	T	SNP	Rv1797 (eccE5)	Val(s)168Val
2058160	T	A	SNP	Rv1815	silent (Val211)
2063106	C	T	SNP	Rv1819c (bacA)	silent (Leu541)
2073192	G	A	SNP	Rv1828	Ala38Thr
2075649	C	T	SNP	Rv1831	Arg27Trp
2078015	C	T	SNP	Rv1832 (gcvB)	silent (His713)
2078024	G	A	SNP	Rv1832 (gcvB)	silent (Pro716)
2083610	G	C	SNP	Rv1836c	Leu343Val
2086411	T	C	SNP	Rv1837c (glcB)	Thr191Ala
2091783	C	G	SNP	Rv1842c	silent (Arg101)
2100207	T	G	SNP	Rv1851 (ureF)	Ser172Ala
2110526	G	A	SNP	Rv1862 (adhA)	Arg328His
2114734	G	A	SNP	Rv1866	Arg532Gln
2116651	G	A	SNP	Rv1867	silent (Arg296)
2118897	C	T	SNP	Rv1868	silent (Ala517)
2120953	C	G	SNP	Rv1870c	Glu160Gln
2122826	G	A	SNP	Rv1872c (lldD2)	Thr109Ile
2124766	C	T	SNP	Rv1875	Ala129Val(s)
2127064	C	T	SNP	Rv1877	silent (Ile387)
2129345	G	A	SNP	Rv1878 (glnA3)	Asp442Asn
2131605	C	T	SNP	Rv1880c (cyp140)	Glu85Lys
2132666	G	A	SNP	Rv1882c	Pro180Ser
2156196	G	A	SNP	Rv1909c (furA)	silent (Leu133)
2156223	C	T	SNP	Rv1909c (furA)	Asp124Asn
2179068	G	T	SNP	Rv1926c (mpt63)	silent (Ile123)
2183221	G	A	SNP	Rv1931c	Pro7Ser
2195727	C	T	SNP	Rv1944c	Gly70Ser
2197065	C	G	SNP	Rv1945	silent (Ala359)
2202939	A	C	SNP	Rv1957	Asp119Ala
2267072	G	T	SNP	Rv2021c	silent (Pro13)
2317749	A	G	SNP	Rv2062c (cobN)	Leu1002Pro
2339719	A	G	SNP	Rv2082	silent (Ala337)
2339722	G	C	SNP	Rv2082	silent (Gly338)
2339724	C	T	SNP	Rv2082	Ala339Val(s)
2339726	C	G	SNP	Rv2082	Leu340Val(s)
2341636	C	G	SNP	Rv2083	Leu256Val(s)
2342403	C	G	SNP	Rv2084	Ala199Gly
2343595	G	A	SNP	Rv2086	silent (Arg95)
2344950	G	A	SNP	Rv2088 (pknJ)	Leu(s)180Leu
2349634	C	T	SNP	Rv2092c (helY)	silent (Thr807)
2351735	A	G	SNP	Rv2092c (helY)	Met(s)107Thr

2373280	C	T	SNP	Rv2113	silent (Ala217)
2379419	C	T	SNP	Rv2120c	Trp103STOP
2388650	G	T	SNP	Rv2127 (ansP1)	Gly12Val
2390900	G	A	SNP	Rv2129c	Ser97Phe
2393567	G	A	SNP	Rv2132	Asp53Asn
2409201	G	T	SNP	Rv2150c (ftsZ)	silent (Thr108)
2432309	C	T	SNP	Rv2170	silent (Val25)
2439519	G	A	SNP	Rv2177c	silent (Arg143)
2455970	CGTG	C	DEL	Rv2192c (trpD)	
2468471	G	T	SNP	Rv2203	Val81Leu
2472294	T	G	SNP	Rv2207 (cobT)	Leu295Arg
2474022	C	G	SNP	Rv2209	Ser208Cys
2478018	G	A	SNP	Rv2212	Val277Ile
2484131	CG	C	DEL	Rv2216	
2502618	C	A	SNP	Rv2228c	Gly41Cys
2504157	G	A	SNP	Rv2230c	Ala151Val
2517610	G	A	SNP	Rv2243 (fabD)	Ser275Asn
2522084	G	A	SNP	Rv2247 (accD6)	Ala448Thr
2535073	C	T	SNP	Rv2262c	silent (Ala160)
2536626	G	A	SNP	Rv2264c	silent (Pro575)
2542820	C	CG	INS	Rv2268c (cyp128)	
2551569	A	C	SNP	Rv2280	Met(s)4Leu
2574591	A	C	SNP	Rv2303c	silent (Arg143)
2576255	G	A	SNP	Rv2305	silent (Glu149)
2584179	A	C	SNP	Rv2311	Asp99Ala
2593192	G	A	SNP	Rv2320c (rocE)	Ala321Val(s)
2597869	C	T	SNP	Rv2326c	silent (Ala693)
2623224	G	A	SNP	Rv2344c (dgt)	Leu177Phe
2630224	T	TCC	INS	Rv2350c (plcB)	
2631565	T	C	SNP	Rv2351c (plcA)	Ile171Val
2631574	T	C	SNP	Rv2351c (plcA)	Thr168Ala
2631583	G	A	SNP	Rv2351c (plcA)	Leu165Leu(s)
2631599	G	A	SNP	Rv2351c (plcA)	silent (Ile159)
2631620	A	G	SNP	Rv2351c (plcA)	silent (Gly152)
2631641	T	G	SNP	Rv2351c (plcA)	silent (Pro145)
2647429	G	A	SNP	Rv2366c	silent (Val313)
2651132	A	G	SNP	Rv2370c	Phe143Leu
2660237	T	C	SNP	Rv2379c (mbtF)	Ile617Val
2662168	C	T	SNP	Rv2380c (mbtE)	Glu1650Lys
2672667	C	T	SNP	Rv2383c (mbtB)	silent (Ala1057)
2676063	A	G	SNP	Rv2384 (mbtA)	Asp43Gly
2677910	G	A	SNP	Rv2385 (mbtJ)	Gly61Glu
2704942	G	A	SNP	Rv2407	Leu(s)82Leu
2717684	A	G	SNP	Rv2419c (gpgP)	Val39Ala
2721114	G	A	SNP	Rv2424c	His222Tyr

2724547	G	A	SNP	Rv2427c (proA)	Leu311Leu(s)
2730008	G	T	SNP	Rv2434c	Pro185Thr
2731403	T	G	SNP	Rv2435c	silent (Thr449)
2741980	G	A	SNP	Rv2443 (dctA)	silent (Leu424)
2751072	G	T	SNP	Rv2449c	silent (Thr167)
2768334	G	A	SNP	Rv2466c	Ser184Leu(s)
2772689	C	A	SNP	Rv2469c	Arg116Leu
2772960	G	A	SNP	Rv2469c	Leu26Leu(s)
2774932	G	A	SNP	Rv2471 (aglA)	Ala457Thr
2801019	C	T	SNP	Rv2489c	Asp43Asn
2866551	C	G	SNP	Rv2543 (lppA)	silent (Ala28)
2866569	C	A	SNP	Rv2543 (lppA)	silent (Thr34)
2866578	C	A	SNP	Rv2543 (lppA)	His37Gln
2866580	A	G	SNP	Rv2543 (lppA)	Asn38Ser
2866607	G	A	SNP	Rv2543 (lppA)	Gly47Asp
2866647	G	A	SNP	Rv2543 (lppA)	silent (Lys60)
2866671	G	A	SNP	Rv2543 (lppA)	silent (Glu68)
2866677	A	C	SNP	Rv2543 (lppA)	silent (Leu70)
2866863	C	G	SNP	Rv2543 (lppA)	silent (Ala132)
2866876	A	G	SNP	Rv2543 (lppA)	Ile137Val
2866880	C	T	SNP	Rv2543 (lppA)	Ala138Val
2866882	G	A	SNP	Rv2543 (lppA)	Ala139Thr
2867207	C	G	SNP	Rv2544 (lppB)	silent (Ala28)
2867230	G	A	SNP	Rv2544 (lppB)	Gly36Asp
2867231	C	T	SNP	Rv2544 (lppB)	silent (Gly36)
2867236	A	G	SNP	Rv2544 (lppB)	Asn38Ser
2867240	C	T	SNP	Rv2544 (lppB)	silent (Pro39)
2867245	A	C	SNP	Rv2544 (lppB)	Lys41Thr
2867298	C	A	SNP	Rv2544 (lppB)	His59Asn
2867347	A	G	SNP	Rv2544 (lppB)	Gln75Arg
2873093	G	GCCA	INS	Rv2553c	
2899018	C	CG	INS	Rv2574	
2907840	T	G	SNP	Rv2583c (relA)	Thr787Pro
2913880	G	A	SNP	Rv2586c (secF)	silent (His44)
2925594	G	A	SNP	Rv2595 (vapB40)	Asp35Asn
2930950	G	A	SNP	Rv2603c	Pro204Leu
2989683	C	T	SNP	Rv2673 (aftC)	silent (Ala131)
3021283	G	A	SNP	Rv2707	silent (Arg237)
3023936	C	T	SNP	Rv2711 (ideR)	silent (Thr124)
3025281	C	T	SNP	Rv2712c	silent (Leu16)
3030146	G	A	SNP	Rv2717c	silent (Arg72)
3040078	C	T	SNP	Rv2727c (miaA)	Arg231His
3041822	C	G	SNP	Rv2729c	Gln218His
3064632	G	A	SNP	Rv2752c	silent (Ala520)
3068518	G	C	SNP	Rv2756c (hsdM)	Phe522Leu(s)

3091467	G	C	SNP	Rv2783c (gpsI)	silent (Gly377)
3097924	C	A	SNP	Rv2789c (fadE21)	Ala339Ser
3104411	C	T	SNP	Rv2795c	silent (Leu167)
3130425	C	A	SNP	Rv2823c	Cys450Phe
3133016	C	G	SNP	Rv2825c	Arg175Thr
3138245	G	A	SNP	Rv2832c (ugpC)	Gln313STOP
3148146	C	A	SNP	Rv2840c	Ser38Ile
3154090	G	C	SNP	Rv2846c (efpA)	Ala181Gly
3171501	G	A	SNP	Rv2859c	Pro49Leu
3183335	G	A	SNP	Rv2871 (vapB43)	silent (Ser66)
3198610	G	A	SNP	Rv2889c (tsf)	silent (Arg166)
3199541	G	C	SNP	Rv2890c (rpsB)	Leu148Val
3207495	C	A	SNP	Rv2897c	Val(s)150Leu(s)
3220545	C	T	SNP	Rv2913c	Trp385STOP
3221093	C	T	SNP	Rv2913c	silent (Glu202)
3237674	C	T	SNP	Rv2922c (sme)	Ala45Thr
3260430	C	T	SNP	Rv2933 (ppsC)	silent (Thr1582)
3260844	C	T	SNP	Rv2933 (ppsC)	silent (Leu1720)
3266874	C	T	SNP	Rv2934 (ppsD)	Arg1543Trp
3289114	G	A	SNP	Rv2943	silent (Ala217)
3297797	T	G	SNP	Rv2947c (pks15)	Gln15Pro
3305106	G	A	SNP	Rv2952	silent (Gln222)
3314243	G	A	SNP	Rv2962c	Gln294STOP
3327780	C	T	SNP	Rv2973c (recG)	Ala723Thr
3330725	C	T	SNP	Rv2974c	Ala213Thr
3330952	T	G	SNP	Rv2974c	Gln137Pro
3347293	C	T	SNP	Rv2990c	Glu143Lys
3350883	C	G	SNP	Rv2993c	Val(s)37Val
3351757	CG	C	DEL	Rv2994	
3353493	T	C	SNP	Rv2996c (serA1)	Asp526Gly
3385542	C	G	SNP	Rv3026c	Arg179Pro
3392523	G	A	SNP	Rv3032	silent (Ala330)
3395403	G	A	SNP	Rv3035	Ala9Thr
3397850	G	GT	INS	Rv3037c	
3403250	C	T	SNP	Rv3043c (ctaD)	Ala558Thr
3451002	A	G	SNP	Rv3085	Glu28Gly
3454750	C	CATCGACGGTGAAG	INS	Rv3088 (tgs4)	
3459853	C	A	SNP	Rv3091	silent (Ile246)
3471796	G	A	SNP	Rv3103c	Arg19Cys
3477663	G	A	SNP	Rv3109 (moaA1)	silent (Thr5)
3490283	C	T	SNP	Rv3124 (moaR1)	Arg260Cys
3496264	C	T	SNP	Rv3130c (tgs1)	Ala35Thr
3497863	G	A	SNP	Rv3132c (devS)	Ala468Val
3507700	A	C	SNP	Rv3140 (fadE23)	Glu304Ala
3562702	G	A	SNP	Rv3193c	silent (Leu157)

3578983	A	C	SNP	Rv3202c	silent (Ala406)
3615362	TGGC	T	DEL	Rv3239c	
3617763	ACCGGCCGGCACT	A	DEL	Rv3240c (secA1)	
3622969	C	T	SNP	Rv3243c	silent (Ala41)
3629776	A	G	SNP	Rv3249c	silent (Arg204)
3639650	C	A	SNP	Rv3259	silent (Arg76)
3650996	T	C	SNP	Rv3270 (ctpC)	silent (Asp157)
3657710	C	G	SNP	Rv3274c (fadE25)	Gly127Ala
3683282	C	T	SNP	Rv3299c (atsB)	silent (Glu894)
3718871	C	G	SNP	Rv3332 (nagA)	Leu93Val(s)
3724392	G	A	SNP	Rv3338	silent (Arg163)
3769709	A	G	SNP	Rv3355c	silent (Ala33)
3769710	G	A	SNP	Rv3355c	Ala33Val
3774077	T	A	SNP	Rv3362c	Thr27Ser
3784710	G	A	SNP	Rv3370c (dnaE2)	His11Tyr
3789276	C	A	SNP	Rv3375 (amiD)	Ala219Glu
3811007	C	A	SNP	Rv3394c	Val(s)7Leu(s)
3813364	C	T	SNP	Rv3396c (guaA)	Ala239Thr
3815268	G	A	SNP	Rv3398c (idsA1)	Ser280Leu(s)
3839512	T	C	SNP	Rv3421c	silent (Thr61)
3868019	C	G	SNP	Rv3447c (eccC4)	Val(s)74Leu
3874572	C	T	SNP	Rv3453	Leu57Leu(s)
3883605	T	C	SNP	Rv3466	silent (Ser27)
3889041	G	A	SNP	Rv3471c	Gln101STOP
3902763	G	A	SNP	Rv3483c	Ser17Phe
3938875	T	C	SNP	Rv3510c	Tyr128Cys
3951036	G	C	SNP	Rv3515c (fadD19)	Gln479Glu
3961802	A	G	SNP	Rv3525c	STOP175Gln
3962090	T	C	SNP	Rv3525c	Thr79Ala
3967223	G	A	SNP	Rv3530c	His200Tyr
3967807	A	G	SNP	Rv3530c	Leu5Pro
3982711	C	T	SNP	Rv3543c (fadE29)	Asp144Asn
4004698	C	T	SNP	Rv3563 (fadE32)	silent (Ala136)
4024967	C	G	SNP	Rv3582c (ispD)	Val(s)25Leu
4049564	G	A	SNP	Rv3608c (folP1)	silent (Thr139)
4054364	C	T	SNP	Rv3614c (espD)	silent (Leu111)
4055803	G	A	SNP	Rv3616c (espA)	silent (Gly191)
4059715	G	A	SNP	Rv3618	Glu340Lys
4072697	G	A	SNP	Rv3634c (galE1)	silent (Val305)
4108131	G	A	SNP	Rv3667 (acs)	Ala114Thr
4130537	G	T	SNP	Rv3689	Ala61Ser
4134588	G	A	SNP	Rv3692 (moxR2)	Arg358His
4146679	G	A	SNP	Rv3703c	silent (Val71)
4155266	C	G	SNP	Rv3710 (leuA)	silent (Gly509)
4177882	C	A	SNP	Rv3728	Leu1004Met(s)

4182492	G	A	SNP	Rv3731 (ligC)	silent (Ala245)
4184811	C	T	SNP	Rv3734c (tgs2)	silent (Ala360)
4193625	G	A	SNP	Rv3743c (ctpJ)	silent (Thr583)
4195004	C	A	SNP	Rv3743c (ctpJ)	Val124Leu
4216522	G	C	SNP	Rv3771c	Ala70Gly
4218940	G	T	SNP	Rv3774 (echA21)	Gly31Val(s)
4222852	G	C	SNP	Rv3777	silent (Pro53)
4224444	T	G	SNP	Rv3778c	Glu151Ala
4225363	A	G	SNP	Rv3779	Ile127Val
4234844	T	C	SNP	Rv3788	Leu(s)22Ser
4243848	G	A	SNP	Rv3794 (embA)	Val(s)206Met(s)
4244096	C	T	SNP	Rv3794 (embA)	silent (Gly288)
4255571	C	T	SNP	Rv3799c (accD4)	silent (Pro126)
4261908	C	T	SNP	Rv3801c (fadD32)	Ala387Thr
4263964	C	T	SNP	Rv3802c	silent (Leu134)
4267938	C	A	SNP	Rv3805c (aftB)	Arg300Leu
4268513	G	A	SNP	Rv3805c (aftB)	silent (Pro108)
4275218	G	A	SNP	Rv3811	Gly141Arg
4281959	T	G	SNP	Rv3817	Trp105Gly
4286156	T	C	SNP	Rv3821	Leu(s)62Leu
4300694	A	G	SNP	Rv3826 (fadD23)	Thr295Ala
4301940	G	A	SNP	Rv3827c	Leu284Leu(s)
4312034	G	T	SNP	Rv3838c (pheA)	silent (Pro212)
4314216	G	A	SNP	Rv3841 (bfrB)	silent (Ala13)
4333222	G	A	SNP	Rv3859c (gltB)	His954Tyr
4337387	C	T	SNP	Rv3860	Thr204Ile
4338242	G	C	SNP	Rv3861	
4345427	T	C	SNP	Rv3869 (eccB1)	Ile130Thr
4355917	T	C	SNP	Rv3877 (eccD1)	Val304Ala
4356054	G	A	SNP	Rv3877 (eccD1)	Val(s)350Met(s)
4356864	C	CTG	INS	Rv3878 (espJ)	
4359177	T	TCCCGGTGTG	INS	Rv3879c (espK)	
4364375	A	C	SNP	Rv3883c (mycP1)	Ile128Ser
4369848	G	A	SNP	Rv3886c (mycP2)	Pro108Leu
4372653	G	A	SNP	Rv3888c	silent (Arg18)
4386108	A	G	SNP	Rv3900c	silent (Ile67)
4386142	A	G	SNP	Rv3900c	Leu(s)56Ser
4386288	C	T	SNP	Rv3900c	silent (Pro7)
4386629	GGTCGTAGCC	G	DEL	Rv3901c	
4386702	G	C	SNP	Rv3901c	Ala38Gly
4404247	G	A	SNP	Rv3915	silent (Leu352)
4407873	C	A	SNP	Rv3919c (gid)	Val(s)110Val
4409660	C	A	SNP	Rv3921c	Gly137Val
4409880	G	A	SNP	Rv3921c	Arg64Cys
4410487	G	A	SNP	Rv3923c (rnpA)	silent (Val101)

Table S5: SNVs and InDels recovered for the clinical strain C1406063055.

Position	Reference	Sample	Type	Gene	AA Exchange
14395	T	C	SNP	Rv0012	Ser103Pro
15267	G	T	SNP	Rv0013 (trpG)	Val(s)118Val
28640	T	C	SNP	Rv0024	silent (Val93)
33670	C	T	SNP	Rv0031	Ala30Val
35774	A	G	SNP	Rv0032 (bioF2)	Ser494Gly
45115	C	T	SNP	Rv0041 (leuS)	silent (Arg518)
45875	C	T	SNP	Rv0041 (leuS)	Leu772Leu(s)
54070	G	C	SNP	Rv0050 (ponA1)	silent (Thr136)
65975	A	C	SNP	Rv0062 (celA1)	Thr142Pro
74730	T	C	SNP	Rv0067c	Thr157Ala
75187	A	G	SNP	Rv0067c	silent (Thr4)
79504	TCGGTGGACC	T	DEL	Rv0071	
81649	C	G	SNP	Rv0072	silent (Pro342)
117880	C	G	SNP	Rv0102	Pro56Arg
143262	C	T	SNP	Rv0118c (oxcA)	silent (Ala205)
151169	T	G	SNP	Rv0125 (pepA)	Ser8Ala
202878	C	T	SNP	Rv0172 (mce1D)	Pro135Ser
212244	G	A	SNP	Rv0180c	Gln3STOP
219104	GA	G	DEL	Rv0187	
220350	C	T	SNP	Rv0189c (ilvD)	silent (Lys458)
232361	A	G	SNP	Rv0197	Tyr44Cys
234496	C	CGT	INS	Rv0197	
257071	C	G	SNP	Rv0214 (fadD4)	Tyr336STOP
271796	C	T	SNP	Rv0227c	silent (Ala348)
276279	C	T	SNP	Rv0231 (fadE4)	silent (Arg74)
281627	C	A	SNP	Rv0235c	Val330Phe
284047	C	G	SNP	Rv0236c (aftD)	silent (Leu935)
317300	G	A	SNP	Rv0265c	silent (Asp68)
365513	G	A	SNP	Rv0303	Val(s)94Met(s)
384436	A	G	SNP	Rv0315	Thr279Ala
386210	T	C	SNP	Rvnt04	tRNA
388768	C	T	SNP	Rv0321 (dcd)	Leu63Leu(s)
397910	G	C	SNP	Rv0332	Gly157Arg
444309	C	T	SNP	Rv0366c	silent (Gly169)
454253	C	T	SNP	Rv0376c	silent (Gly40)
500215	C	T	SNP	Rv0413 (mutT3)	Pro168Leu
505454	C	T	SNP	Rv0419 (lpqM)	silent (Ser123)
587065	G	C	SNP	Rv0496	silent (Leu224)
616514	G	A	SNP	Rv0525	Gly98Ser
618505	C	T	SNP	Rv0528	silent (Thr67)
631002	G	T	SNP	Rv0538	silent (Gly321)
667088	C	T	SNP	Rv0573c (pncB2)	Gly52Glu

718799	G	A	SNP	Rv0628c	His372Tyr
766085	C	G	SNP	Rv0668 (rpoC)	Pro906Ala
780862	G	A	SNP	Rv0681	Val(s)48Met(s)
793421	T	G	SNP	Rv0694 (lldD1)	Ile29Met(s)
855719	C	T	SNP	Rv0761c (adhB)	silent (Ala36)
884985	C	T	SNP	Rv0791c	Ala286Thr
899094	C	T	SNP	Rv0805	silent (Gly88)
931011	CCACGGCATGCTCGTTTCAA GCCACAT	C	DEL	Rv0835 (lpqQ)	
945005	G	A	SNP	Rv0848 (cysK2)	Arg23Gln
1030214	C	G	SNP	Rv0923c	Asp122His
1067652	A	C	SNP	Rv0956 (purN)	Asp31Ala
1082445	T	A	SNP	Rv0971c (echA7)	Glu47Val
1085679	C	T	SNP	Rv0973c (accA2)	silent (Arg24)
1121109	G	A	SNP	Rv1004c	Pro347Leu
1130526	G	A	SNP	Rv1011 (ispE)	silent (Ala112)
1137067	C	T	SNP	Rv1018c (glmU)	Gly332Arg
1196865	C	T	SNP	Rv1072	Ala196Val(s)
1207386	A	G	SNP	Rv1082 (mca)	
1207610	A	G	SNP	Rv1083	silent (Gly76)
1227217	C	T	SNP	Rv1098c (fum)	Ala117Thr
1273071	T	C	SNP	Rv1145 (mmpL13a)	Ser217Pro
1284548	AGTTAGCGCGGGGGCCGCG	A	DEL	Rv1158c	
1289307	C	T	SNP	Rv1161 (narG)	silent (Phe660)
1342581	T	C	SNP	Rv1199c	Thr9Ala
1358042	G	A	SNP	Rv1215c	Pro468Leu
1358411	T	C	SNP	Rv1215c	Asp345Gly
1442288	C	T	SNP	Rv1288	Ala314Val(s)
1460992	A	C	SNP	Rv1304 (atpB)	His250Pro
1469503	C	T	SNP	Rv1313c	Val(s)1Val
1474001	C	T	SNP	Rvnr02	rRNA
1478182	G	A	SNP	Rv1317c (alkA)	Arg313Cys
1480174	C	G	SNP	Rv1318c	silent (Leu217)
1480176	G	T	SNP	Rv1318c	Leu217Met(s)
1480184	G	A	SNP	Rv1318c	Pro214Leu
1480186	C	T	SNP	Rv1318c	silent (Ala213)
1480189	C	G	SNP	Rv1318c	Leu(s)212Phe
1480195	G	T	SNP	Rv1318c	silent (Arg210)
1480197	G	C	SNP	Rv1318c	Arg210Gly
1480198	T	C	SNP	Rv1318c	silent (Pro209)
1480205	G	A	SNP	Rv1318c	Pro207Leu
1480219	C	T	SNP	Rv1318c	silent (Ala202)
1480231	G	C	SNP	Rv1318c	Phe198Leu(s)
1480233	A	C	SNP	Rv1318c	Phe198Val
1480242	A	G	SNP	Rv1318c	Leu(s)195Leu

1480243	T	A	SNP	Rv1318c	silent (Ala194)
1480945	C	G	SNP	Rv1319c	silent (Thr519)
1480948	C	T	SNP	Rv1319c	silent (Glu518)
1504420	G	A	SNP	Rv1337	Arg22His
1553567	C	T	SNP	Rv1380 (pyrB)	silent (Gly112)
1710786	T	G	SNP	Rv1519	silent (Gly18)
1712779	C	T	SNP	Rv1521 (fadD25)	Arg160Cys
1748133	A	G	SNP	Rv1547 (dnaE1)	Glu147Gly
1755810	G	A	SNP	Rv1551 (plsB1)	silent (Ser122)
1799356	G	T	SNP	Rv1598c	Thr43Lys
1832423	G	A	SNP	Rv1629 (polA)	Ala587Thr
1834028	C	T	SNP	Rv1630 (rpsA)	Pro163Ser
1885772	G	A	SNP	Rv1662 (pks8)	Ala1357Thr
1999354	A	G	SNP	Rv1765A	Trp2Arg
2082856	T	G	SNP	Rv1836c	Gln594Pro
2094479	T	C	SNP	Rv1844c (gnd1)	Asp237Gly
2123145	C	T	SNP	Rv1872c (lldD2)	Val3Ile
2173090	C	G	SNP	Rv1921c (lppF)	Ala236Pro
2175826	C	G	SNP	Rv1923 (lipD)	silent (Leu218)
2184176	G	A	SNP	Rv1933c (fadE18)	Ala261Val(s)
2184715	TG	T	DEL	Rv1933c (fadE18)	
2212762	C	T	SNP	Rv1968 (mce3C)	silent (Gly379)
2213395	A	G	SNP	Rv1969 (mce3D)	Ile181Val
2237730	G	A	SNP	Rv1994c (cmtR)	silent (Ala85)
2246603	C	T	SNP	Rv2000	silent (Ser465)
2246706	C	A	SNP	Rv2000	His500Asn
2298776	C	A	SNP	Rv2048c (pks12)	silent (Ala2737)
2302301	C	T	SNP	Rv2048c (pks12)	silent (Gly1562)
2326147	T	G	SNP	Rv2068c (blaC)	silent (Ala221)
2341636	C	G	SNP	Rv2083	Leu256Val(s)
2373696	A	ACCG	INS	Rv2113	
2377671	C	T	SNP	Rv2118c	silent (Glu214)
2391089	A	G	SNP	Rv2129c	Val(s)34Ala
2397218	G	T	SNP	Rv2137c	Ser33Tyr
2397635	C	A	SNP	Rv2138 (lppL)	His102Gln
2410831	T	C	SNP	Rv2152c (murC)	His431Arg
2417814	G	C	SNP	Rv2157c (murF)	silent (Ala397)
2420388	G	A	SNP	Rv2158c (murE)	Pro74Leu
2469665	C	T	SNP	Rv2205c	Gly267Ser
2480796	G	A	SNP	Rv2214c (ephD)	silent (Asp302)
2489669	A	C	SNP	Rv2221c (glnE)	Val895Val(s)
2507254	G	A	SNP	Rv2234 (ptpA)	Ala37Thr
2588048	TG	T	DEL	Rv2315c	
2631574	T	C	SNP	Rv2351c (plcA)	Thr168Ala
2631583	G	A	SNP	Rv2351c (plcA)	Leu165Leu(s)

2631599	G	A	SNP	Rv2351c (plcA)	silent (Ile159)
2631620	A	G	SNP	Rv2351c (plcA)	silent (Gly152)
2682554	A	C	SNP	Rv2388c (hemN)	Leu(s)197Val(s)
2728778	G	A	SNP	Rv2432c	His24Tyr
2742477	T	C	SNP	Rv2444c (rne)	silent (Glu836)
2757492	T	C	SNP	Rv2456c	His234Arg
2762592	T	G	SNP	Rv2460c (clpP2)	Lys195Thr
2788195	C	T	SNP	Rv2482c (plsB2)	silent (Lys363)
2809250	C	T	SNP	Rv2495c (bkdC)	Leu(s)230Leu
2829779	T	C	SNP	Rv2512c	Thr9Ala
2899426	G	A	SNP	Rv2575	Gly30Ser
2930254	G	A	SNP	Rv2601A (vapB41)	Gly62Asp
2932663	A	T	SNP	Rv2605c (tesB2)	silent (Leu160)
2955061	T	C	SNP	Rv2628	Ser2Pro
2974933	A	G	SNP	Rv2650c	Ile101Thr
3017134	G	T	SNP	Rv2702 (ppgK)	Ala93Ser
3037982	G	A	SNP	Rv2725c (hflX)	silent (Arg311)
3098381	C	T	SNP	Rv2789c (fadE21)	Val(s)186Val
3136025	G	A	SNP	Rv2828c	silent (Ile103)
3145309	G	A	SNP	Rv2839c (infB)	silent (Ile855)
3164260	G	A	SNP	Rv2854	Gly37Ser
3168967	C	A	SNP	Rv2857c	Val(s)131Val
3176535	T	C	SNP	Rv2864c	Gln244Arg
3187220	C	A	SNP	Rv2875 (mpt70)	Ala64Asp
3190721	C	T	SNP	Rv2881c (cdsA)	Val301Ile
3207640	C	T	SNP	Rv2897c	silent (Leu101)
3250799	C	T	SNP	Rv2931 (ppsA)	silent (Thr1785)
3251611	A	G	SNP	Rv2932 (ppsB)	silent (Ala180)
3269380	T	C	SNP	Rv2935 (ppsE)	silent (Asp548)
3275416	C	G	SNP	Rv2939 (papA5)	silent (Thr156)
3319863	T	C	SNP	Rv2967c (pca)	Ile1062Val
3414248	G	A	SNP	Rv3052c (nrdI)	Ser146Leu
3419339	G	T	SNP	Rv3058c	Pro13Gln
3468628	A	G	SNP	Rv3099c	Ser213Pro
3468629	C	A	SNP	Rv3099c	silent (Leu212)
3474439	CT	C	DEL	Rv3106 (fprA)	
3515397	C	T	SNP	Rv3149 (nuoE)	silent (Thr247)
3517718	G	A	SNP	Rv3151 (nuoG)	Ala325Thr
3563387	C	G	SNP	Rv3194c	Lys300Asn
3564735	C	T	SNP	Rv3195	silent (Asp124)
3589438	C	T	SNP	Rv3212	silent (Ala15)
3603803	A	G	SNP	Rv3227 (aroA)	Thr143Ala
3641895	C	T	SNP	Rv3262 (fbiB)	Leu121Leu(s)
3643833	A	C	SNP	Rv3263	silent (Gly219)
3660819	C	T	SNP	Rv3278c	silent (Glu117)

3678227	A	G	SNP	Rv3296 (lhr)	Thr485Ala
3701000	C	A	SNP	Rv3312A	Cys6Phe
3743434	G	A	SNP	Rv3346c	Arg8Trp
3777042	C	T	SNP	Rv3365c	Val(s)154Met(s)
3797484	G	A	SNP	Rv3383c (idsB)	Pro336Ser
3836739	G	A	SNP	Rv3417c (groEL1)	silent (Asp51)
3840764	C	G	SNP	Rv3423c (alr)	silent (Leu219)
3866914	G	A	SNP	Rv3447c (eccC4)	Thr442Ile
3867085	C	T	SNP	Rv3447c (eccC4)	Ser385Asn
3896705	GTCGACGAGCCACTCGGGCT CA	G	DEL	Rv3479	
4023265	T	G	SNP	Rv3580c (cysS1)	Gln180Pro
4028292	C	T	SNP	Rv3586	silent (Val134)
4039016	G	A	SNP	Rv3596c (clpC1)	silent (Ser563)
4053050	A	G	SNP	Rv3611	Asn34Ser
4073069	C	T	SNP	Rv3634c (galE1)	silent (Gln181)
4078051	T	C	SNP	Rv3639c	Arg134Gly
4088526	T	G	SNP	Rv3648c (cspA)	silent (Pro2)
4118778	G	A	SNP	Rv3679	Met(s)1Ile
4145009	G	A	SNP	Rv3702c	silent (Asp202)
4158865	G	A	SNP	Rv3713 (cobQ2)	silent (Ala213)
4184706	G	A	SNP	Rv3734c (tgs2)	silent (Asp395)
4188020	A	G	SNP	Rv3737	Ile108Val
4197895	C	G	SNP	Rv3749c	Lys81Asn
4200576	C	G	SNP	Rv3754 (tyrA)	silent (Ala52)
4206141	T	C	SNP	Rv3761c (fadE36)	Leu259Leu(s)
4210362	G	A	SNP	Rv3764c (tcrY)	silent (Ser216)
4218436	C	G	SNP	Rv3773c	Trp130Cys
4230597	G	A	SNP	Rv3784	Leu(s)114Leu
4232921	T	C	SNP	Rv3786c	Tyr226Cys
4237297	G	A	SNP	Rv3791 (dprE2)	Asp45Asn
4258074	T	A	SNP	Rv3800c (pks13)	Met(s)1025Leu(s)
4284570	A	C	SNP	Rv3820c (papA2)	Val419Gly
4286806	C	A	SNP	Rv3822	Ala29Asp
4289112	G	A	SNP	Rv3823c (mmpL8)	silent (Pro806)
4307292	C	T	SNP	Rv3833	silent (Pro142)
4314390	T	C	SNP	Rv3841 (bfrB)	silent (Leu71)
4337887	G	A	SNP	Rv3860	Ala371Thr
4341081	G	C	SNP	Rv3864 (espE)	Gly271Ala
4380828	CG	C	DEL	Rv3895c (eccB2)	
4387549	G	C	SNP	Rv3902c	Thr116Arg
4388870	C	G	SNP	Rv3903c	silent (Arg521)
4403036	C	A	SNP	Rv3914 (trxC)	Ala102Asp

Table S6: SNVs and InDels recovered for the clinical strain C1510097996.

Position	Reference	Sample	Type	Gene	AA Exchange
6439	C	G	SNP	Rv0005 (gyrB)	silent (Pro400)
7853	C	T	SNP	Rv0006 (gyrA)	silent (Gly184)
22961	T	G	SNP	Rv0018c (pstP)	Asp74Ala
23174	C	A	SNP	Rv0018c (pstP)	Arg3Leu
29072	C	A	SNP	Rv0024	silent (Val237)
36798	C	T	SNP	Rv0033 (acpA)	silent (Asp64)
39277	C	G	SNP	Rv0036c	Glu185Gln
39468	C	T	SNP	Rv0036c	Trp121STOP
39908	C	T	SNP	Rv0037c	Gly432Glu
40354	C	T	SNP	Rv0037c	Val(s)283Val
45738	G	A	SNP	Rv0041 (leuS)	Gly726Glu
50557	T	C	SNP	Rv0046c (ino1)	Arg190Gly
53774	G	A	SNP	Rv0050 (ponA1)	Gly38Ser
55069	G	C	SNP	Rv0050 (ponA1)	Leu(s)469Phe
55540	G	GCCGCCGCCT	INS	Rv0050 (ponA1)	
64028	C	T	SNP	Rv0060	silent (Pro40)
84528	T	G	SNP	Rv0075	Phe178Cys
87362	G	A	SNP	Rv0078A	Pro147Leu
89776	C	T	SNP	Rv0081	Arg68Cys
93813	C	T	SNP	Rv0085 (hycP)	silent (Ala175)
104817	T	G	SNP	Rv0095c	Glu133Asp
105007	C	G	SNP	Rv0095c	Ser70Thr
117295	G	A	SNP	Rv0101 (nrp)	Ser2432Asn
133666	A	T	SNP	Rv0110	Gln216Leu
135529	C	G	SNP	Rv0111	Pro527Arg
138574	T	C	SNP	Rv0115 (hddA)	Val(s)21Ala
170523	TC	T	DEL	Rv0144	
172414	C	T	SNP	Rv0146	silent (Ala68)
172810	G	A	SNP	Rv0146	silent (Leu200)
192924	C	A	SNP	Rv0162c (adhE1)	Arg71Leu
197247	G	A	SNP	Rv0167 (yrbE1A)	silent (Glu129)
200488	T	C	SNP	Rv0170 (mce1B)	silent (Gly198)
209629	G	T	SNP	Rv0178	Arg231Met(s)
217929	A	G	SNP	Rv0186 (bglS)	Tyr554Cys
226929	C	T	SNP	Rv0194	Arg18Cys
234496	C	CGT	INS	Rv0197	
237692	G	T	SNP	Rv0200	Gly163Cys
239432	G	A	SNP	Rv0202c (mmpL11)	Arg621Trp
249522	T	C	SNP	Rv0209	Val(s)162Ala
251510	A	G	SNP	Rv0210	Asp464Gly
260962	C	T	SNP	Rv0218	silent (Ala13)
261369	C	A	SNP	Rv0218	Ser149STOP

272529	C	G	SNP	Rv0227c	Gly104Ala
275793	G	A	SNP	Rv0230c (php)	silent (Leu57)
278189	T	C	SNP	Rv0232	silent (Asp97)
281208	C	T	SNP	Rv0235c	silent (Pro469)
286103	C	T	SNP	Rv0236c (aftD)	Gly250Asp
289300	C	T	SNP	Rv0239 (vapB24)	Ser66Phe
291157	G	A	SNP	Rv0242c (fabG4)	silent (Ile291)
299737	T	C	SNP	Rv0248c	Glu356Gly
313425	G	T	SNP	Rv0261c (narK3)	silent (Ile248)
318507	G	A	SNP	Rv0266c (oplA)	Ala883Val
381030	A	G	SNP	Rv0312	Ser159Gly
386773	G	A	SNP	Rv0318c	silent (Gly109)
403200	T	C	SNP	Rv0338c	Lys881Arg
406389	G	A	SNP	Rv0339c	Ala687Val(s)
419490	G	A	SNP	Rv0349	Trp181STOP
423334	G	A	SNP	Rv0352 (dnaJ1)	Asp295Asn
456100	G	A	SNP	Rv0379 (secE2)	Glu42Lys
478322	CGG	C	DEL	Rv0399c (lpqK)	
485631	C	T	SNP	Rv0404 (fadD30)	Pro552Leu
488062	G	A	SNP	Rv0405 (pks6)	Val(s)778Met(s)
488372	G	A	SNP	Rv0405 (pks6)	Ser881Asn
495998	C	T	SNP	Rv0410c (pknG)	Val(s)439Val
501291	C	T	SNP	Rv0415 (thiO)	silent (Gly48)
517184	C	T	SNP	Rv0428c	Ser207Asn
529363	C	T	SNP	Rv0440 (groEL2)	silent (Val252)
551630	G	A	SNP	Rv0459	Val145Ile
560292	C	G	SNP	Rv0469 (umaA)	Ile135Met(s)
565026	G	A	SNP	Rv0474	silent (Ser2)
565418	G	A	SNP	Rv0474	Ser133Asn
572321	C	T	SNP	Rv0483 (lprQ)	silent (Gly204)
583103	T	G	SNP	Rv0492c	Glu92Asp
585333	C	T	SNP	Rv0494	silent (Ala213)
588498	C	T	SNP	Rv0498	silent (Arg58)
601395	C	T	SNP	Rv0509 (hemA)	His319Tyr
602998	G	A	SNP	Rv0511 (hemD)	Val(s)60Val
620280	C	T	SNP	Rv0529 (ccsA)	silent (Arg130)
625092	C	T	SNP	Rv0533c (fabH)	Gly130Asp
626657	G	A	SNP	Rv0535 (pnp)	Val(s)67Val
651184	G	T	SNP	Rv0560c	silent (Arg107)
657172	T	C	SNP	Rv0565c	Asp100Gly
663627	C	T	SNP	Rv0571c	Val398Ile
679462	G	A	SNP	Rv0584	silent (Pro78)
701867	C	T	SNP	Rv0605	silent (Asp154)
705570	C	T	SNP	Rv0610c	Val114Ile
716508	G	A	SNP	Rv0623 (vapB30)	Leu(s)33Leu

749361	G	C	SNP	Rv0653c	Ala190Gly
765171	C	T	SNP	Rv0668 (rpoC)	Pro601Leu
800864	A	AAAGCAACAG	INS	Rv0701 (rplC)	
806717	T	C	SNP	Rv0711 (atsA)	Val(s)128Ala
808152	C	A	SNP	Rv0711 (atsA)	silent (Pro606)
813849	G	A	SNP	Rv0719 (rplF)	Arg151His
832246	A	G	SNP	Rv0740	silent (Gln157)
861219	C	T	SNP	Rv0768 (aldA)	Thr103Ile
870112	C	T	SNP	Rv0777 (purB)	silent (Ala35)
871614	G	A	SNP	Rv0778 (cyp126)	Glu62Lys
878005	C	T	SNP	Rv0783c (emrB)	Gly146Ser
899367	G	A	SNP	Rv0805	Met(s)179Ile
899419	G	A	SNP	Rv0805	Gly197Ser
902159	C	T	SNP	Rv0808 (purF)	Gln17STOP
903508	G	A	SNP	Rv0808 (purF)	Met(s)466Ile
910498	G	A	SNP	Rv0817c	silent (Val115)
920675	T	G	SNP	Rv0826	Cys348Gly
932790	G	A	SNP	Rv0836c	Ala48Val
935723	C	G	SNP	Rv0839	silent (Gly49)
936476	A	C	SNP	Rv0840c (pip)	Leu281Arg
940018	G	A	SNP	Rv0843	Val211Ile
945919	G	T	SNP	Rv0848 (cysK2)	Ala328Ser
950630	G	A	SNP	Rv0853c (pdc)	silent (Ser163)
972653	G	A	SNP	Rv0874c	Pro352Ser
984090	G	C	SNP	Rv0886 (fprB)	Lys96Asn
995375	G	A	SNP	Rv0893c	silent (Pro307)
1016131	C	A	SNP	Rv0911	Pro245Gln
1032888	C	T	SNP	Rv0926c	Cys300Tyr
1039981	T	C	SNP	Rv0932c (pstS2)	silent (Lys356)
1040706	A	C	SNP	Rv0932c (pstS2)	Ser115Ala
1041403	G	A	SNP	Rv0933 (pstB)	Arg47His
1042880	G	C	SNP	Rv0934 (pstS1)	Ala256Pro
1043031	C	T	SNP	Rv0934 (pstS1)	Pro306Leu
1071677	G	A	SNP	Rv0959	silent (Ser141)
1106540	C	A	SNP	Rv0989c (grcC2)	silent (Pro281)
1113109	G	A	SNP	Rv0996	silent (Ala242)
1129798	A	G	SNP	Rv1010 (ksgA)	Asp216Gly
1152351	T	A	SNP	Rv1029 (kdpA)	Phe114Ile
1160770	T	A	SNP	Rv1037c (esxI)	Gln20Leu
1167274	C	T	SNP	Rv1044	silent (Asp74)
1183434	C	T	SNP	Rv1059	silent (Ala348)
1198240	C	T	SNP	Rv1074c (fadA3)	silent (Gln378)
1200085	C	T	SNP	Rv1075c	Val(s)96Met(s)
1224885	C	A	SNP	Rv1096	Asp167Glu
1256267	G	A	SNP	Rv1131 (prpC)	Val(s)46Met(s)

1261056	C	T	SNP	Rv1133c (metE)	silent (Gly97)
1279665	G	C	SNP	Rv1152	Arg4Pro
1297174	C	T	SNP	Rv1166 (lpqW)	silent (Ala341)
1306994	G	A	SNP	Rv1175c (fadH)	silent (Ile411)
1309655	G	A	SNP	Rv1178	Ala98Thr
1323023	G	C	SNP	Rv1183 (mmpL10)	Gly502Arg
1336826	G	T	SNP	Rv1193 (fadD36)	Ala345Ser
1337900	A	G	SNP	Rv1194c	Ile205Thr
1343782	G	A	SNP	Rv1200	Gly281Arg
1356954	C	A	SNP	Rv1213 (glgC)	silent (Pro373)
1368317	G	A	SNP	Rv1225c	silent (Pro135)
1368438	A	G	SNP	Rv1225c	Leu95Pro
1371072	A	C	SNP	Rv1228 (lpqX)	silent (Ile51)
1396088	C	A	SNP	Rv1251c	silent (Gly1051)
1399129	C	T	SNP	Rv1251c	Ala38Thr
1412686	G	A	SNP	Rv1264	Asp265Asn
1440869	G	A	SNP	Rv1287	Ser22Asn
1442118	C	T	SNP	Rv1288	silent (Phe257)
1464079	C	G	SNP	Rv1308 (atpA)	Ile284Met(s)
1479563	C	T	SNP	Rv1318c	Arg421Gln
1499293	C	T	SNP	Rv1330c (pncB1)	Gly423Arg
1502497	C	G	SNP	Rv1333	Thr300Ser
1503626	C	T	SNP	Rv1336 (cysM)	Thr78Ile
1545119	C	T	SNP	Rv1372	Pro99Ser
1550719	C	T	SNP	Rv1377c	Glu167Lys
1551982	G	T	SNP	Rv1378c	Thr225Lys
1553188	C	T	SNP	Rv1379 (pyrR)	Arg179Trp
1553777	G	A	SNP	Rv1380 (pyrB)	silent (Leu182)
1567809	G	A	SNP	Rv1392 (metK)	Val329Ile
1578111	C	T	SNP	Rv1402 (priA)	Arg167Cys
1582922	G	A	SNP	Rv1406 (fmt)	Ala253Thr
1586105	C	T	SNP	Rv1409 (ribG)	silent (Thr304)
1591805	G	T	SNP	Rv1416 (ribH)	silent (Gly45)
1600695	C	T	SNP	Rv1425	silent (His346)
1623629	CT	C	DEL	Rv1444c	
1638717	C	A	SNP	Rv1453	silent (Arg113)
1647830	G	A	SNP	Rv1461	Gly281Asp
1650458	G	T	SNP	Rv1462	silent (Ser311)
1676185	G	A	SNP	Rv1486c	silent (Val233)
1682247	C	T	SNP	Rv1492 (mutA)	Arg31Cys
1689369	T	C	SNP	Rv1498c	silent (Ser184)
1699939	A	T	SNP	Rv1508A	Tyr25Phe
1713934	G	A	SNP	Rv1521 (fadD25)	Val(s)545Met(s)
1717081	G	A	SNP	Rv1522c (mmpL12)	His178Tyr
1744223	C	A	SNP	Rv1541c (lprI)	Arg50Leu

1746151	G	A	SNP	Rv1544	Gly20Ser
1747068	C	T	SNP	Rv1545	silent (Gly50)
1747436	G	T	SNP	Rv1546	Gly81Val
1756616	G	A	SNP	Rv1551 (plsB1)	Gly391Asp
1760467	GCCGGGTAC	G	DEL	Rv1554 (frdC)	
1767371	C	G	SNP	Rv1563c (treY)	Ala688Pro
1769780	C	T	SNP	Rv1564c (treX)	Asp608Asn
1789795	A	G	SNP	Rv1588c	silent (Asp14)
1789798	A	G	SNP	Rv1588c	silent (Phe13)
1814135	A	G	SNP	Rv1614 (lgt)	Glu322Gly
1823729	G	A	SNP	Rv1622c (cydB)	silent (Gly224)
1824452	G	A	SNP	Rv1623c (cydA)	Ala479Val
1826257	G	A	SNP	Rv1624c	Ala110Val
1839306	A	G	SNP	Rv1634	Ile47Val
1843656	C	A	SNP	Rv1637c	Gly13Cys
1854045	A	G	SNP	Rv1644 (tsnR)	Tyr147Cys
1872761	G	A	SNP	Rv1659 (argH)	silent (Ala41)
1874514	G	T	SNP	Rv1660 (pks10)	Ala119Ser
1877611	G	T	SNP	Rv1661 (pks7)	Ala770Ser
1887313	C	T	SNP	Rv1663 (pks17)	Gln268STOP
1893604	C	A	SNP	Rv1667c	Trp209Cys
1896122	G	A	SNP	Rv1670	Met(s)Ile
1899200	G	A	SNP	Rv1673c	silent (His11)
1906161	G	T	SNP	Rv1681 (moeX)	silent (Pro304)
1924765	T	C	SNP	Rv1699 (pyrG)	silent (Leu313)
1939443	T	C	SNP	Rv1711	silent (Asn202)
1941639	A	T	SNP	Rv1713 (engA)	Asn451Ile
1943723	C	T	SNP	Rv1716	Leu50Leu(s)
1954109	C	T	SNP	Rv1728c	Gly176Ser
1977564	G	GGCC	INS	Rv1749c	
1989370	C	T	SNP	Rv1758 (cut1)	Pro110Leu
1993808	A	T	SNP	Rv1760	Glu219Val(s)
2057546	C	T	SNP	Rv1815	Arg7Cys
2063106	C	T	SNP	Rv1819c (bacA)	silent (Leu541)
2074222	A	G	SNP	Rv1829	Asn94Asp
2078024	G	A	SNP	Rv1832 (gcvB)	silent (Pro716)
2083610	G	C	SNP	Rv1836c	Leu343Val
2097394	C	T	SNP	Rv1848 (ureA)	Ala16Val
2102050	AC	A	DEL	Rv1854c (ndh)	
2111044	TACCGAGATC	T	DEL	Rv1863c	
2116395	T	C	SNP	Rv1867	Ile211Thr
2118897	C	T	SNP	Rv1868	silent (Ala517)
2120953	C	G	SNP	Rv1870c	Glu160Gln
2122826	G	A	SNP	Rv1872c (lldD2)	Thr109Ile
2146262	C	T	SNP	Rv1900c (lipJ)	Ala458Thr

2150534	C	T	SNP	Rv1903	silent (Ile57)
2180479	C	T	SNP	Rv1928c	Val(s)247Met(s)
2181094	C	G	SNP	Rv1928c	Ala42Pro
2197065	C	G	SNP	Rv1945	silent (Ala359)
2203102	A	G	SNP	Rv1957	
2209153	T	G	SNP	Rv1965 (yrbE3B)	Ile216Ser
2210158	G	A	SNP	Rv1966 (mce3A)	Ala278Thr
2217803	C	T	SNP	Rv1974	Pro49Ser
2221790	C	T	SNP	Rv1979c	Val459Ile
2223124	A	C	SNP	Rv1979c	Leu14Arg
2257112	G	A	SNP	Rv2008c	silent (Leu277)
2286182	A	G	SNP	Rv2040c	Ser117Pro
2300546	A	T	SNP	Rv2048c (pks12)	His2147Gln
2310666	C	T	SNP	Rv2051c (ppm1)	Val(s)30Val
2312341	C	T	SNP	Rv2052c	silent (Ala59)
2320729	A	G	SNP	Rv2062c (cobN)	Leu(s)9Leu
2340849	C	T	SNP	Rv2082	Ala714Val(s)
2341636	C	G	SNP	Rv2083	Leu256Val(s)
2342403	C	G	SNP	Rv2084	Ala199Gly
2348548	C	A	SNP	Rv2090	silent (Pro392)
2349634	C	T	SNP	Rv2092c (helY)	silent (Thr807)
2350001	C	A	SNP	Rv2092c (helY)	Arg685Leu
2353582	G	A	SNP	Rv2095c (pafC)	Ser245Leu(s)
2378682	C	A	SNP	Rv2119	silent (Thr99)
2390615	C	T	SNP	Rv2129c	Arg192His
2394537	C	T	SNP	Rv2133c	Val35Ile
2409026	G	A	SNP	Rv2150c (ftsZ)	Leu167Leu(s)
2418324	G	A	SNP	Rv2157c (murF)	silent (Ile227)
2421774	G	A	SNP	Rv2160A	
2439519	G	A	SNP	Rv2177c	silent (Arg143)
2455669	A	C	SNP	Rv2191	
2468471	G	T	SNP	Rv2203	Val81Leu
2471575	G	T	SNP	Rv2207 (cobT)	Glu55Asp
2477307	CA	C	DEL	Rv2212	
2485157	C	A	SNP	Rv2217 (lipB)	Arg192Ser
2485500	C	T	SNP	Rv2218 (lipA)	silent (Ile76)
2495787	G	A	SNP	Rv2224c (caeA)	Arg413Trp
2505506	G	A	SNP	Rv2231c (cobC)	Pro65Leu
2517610	G	A	SNP	Rv2243 (fabD)	Ser275Asn
2527766	C	G	SNP	Rv2252	Leu260Val
2541011	C	T	SNP	Rv2266 (cyp124)	Thr303Ile
2542899	C	T	SNP	Rv2268c (cyp128)	Glu460Lys
2573485	C	T	SNP	Rv2301 (cut2)	silent (Val157)
2587106	C	T	SNP	Rv2314c	Arg62Gln
2594051	A	G	SNP	Rv2320c (rocE)	Phe35Leu

2597827	C	T	SNP	Rv2325c	Gly11Arg
2607444	T	C	SNP	Rv2333c (stp)	Tyr293Cys
2609702	C	T	SNP	Rv2334 (cysK1)	Pro303Ser
2611214	CGCG	C	DEL	Rv2336	
2628244	C	G	SNP	Rv2349c (plcC)	Gly152Ala
2628577	G	A	SNP	Rv2349c (plcC)	Thr41Ile
2629781	CA	C	DEL	Rv2350c (plcB)	
2631583	G	A	SNP	Rv2351c (plcA)	Leu165Leu(s)
2631599	G	A	SNP	Rv2351c (plcA)	silent (Ile159)
2631620	A	G	SNP	Rv2351c (plcA)	silent (Gly152)
2631641	T	G	SNP	Rv2351c (plcA)	silent (Pro145)
2646542	G	A	SNP	Rv2364c (era)	silent (Ala44)
2665268	G	C	SNP	Rv2380c (mbtE)	silent (Ala616)
2668527	C	T	SNP	Rv2381c (mbtD)	Val(s)581Val
2677910	G	A	SNP	Rv2385 (mbtJ)	Gly61Glu
2683311	G	A	SNP	Rv2389c (rpfD)	silent (Leu134)
2717424	C	T	SNP	Rv2419c (gpgP)	Val(s)126Met(s)
2742456	A	C	SNP	Rv2444c (rne)	Asp843Glu
2742671	G	C	SNP	Rv2444c (rne)	Arg772Gly
2752078	G	C	SNP	Rv2450c (rpfE)	Pro35Ala
2755679	T	G	SNP	Rv2455c	silent (Gly342)
2772960	G	A	SNP	Rv2469c	Leu26Leu(s)
2774288	C	T	SNP	Rv2471 (aglA)	Pro242Leu
2779377	G	T	SNP	Rv2476c (gdh)	silent (Ala962)
2793810	C	T	SNP	Rv2485c (lipQ)	Arg60His
2798026	G	A	SNP	Rv2488c	Ala952Val
2807730	C	T	SNP	Rv2492	silent (Cys151)
2820874	G	A	SNP	Rv2505c (fadD35)	silent (Cys241)
2825636	A	C	SNP	Rv2510c	Val485Gly
2856298	G	A	SNP	Rv2531c	Ala495Val(s)
2866863	C	G	SNP	Rv2543 (lppA)	silent (Ala132)
2866876	A	G	SNP	Rv2543 (lppA)	Ile137Val
2866880	C	T	SNP	Rv2543 (lppA)	Ala138Val
2866882	G	A	SNP	Rv2543 (lppA)	Ala139Thr
2867207	C	G	SNP	Rv2544 (lppB)	silent (Ala28)
2867298	C	A	SNP	Rv2544 (lppB)	His59Asn
2867347	A	G	SNP	Rv2544 (lppB)	Gln75Arg
2884034	GA	G	DEL	Rv2564 (glnQ)	
2898226	C	G	SNP	Rv2573	His62Asp
2907840	T	G	SNP	Rv2583c (relA)	Thr787Pro
2927111	A	C	SNP	Rv2598	silent (Ala42)
2931798	G	A	SNP	Rv2604c (snoP)	silent (Val164)
2941540	G	T	SNP	Rv2614c (thrS)	silent (Ala576)
2989683	C	T	SNP	Rv2673 (aftC)	silent (Ala131)
3015750	C	T	SNP	Rv2700	Ala183Val

3019313	C	T	SNP	Rv2703 (sigA)	silent (Gly493)
3021283	G	A	SNP	Rv2707	silent (Arg237)
3028488	C	T	SNP	Rv2715	Leu131Leu(s)
3052746	G	A	SNP	Rv2739c	silent (Thr148)
3064149	T	C	SNP	Rv2751	Val(s)171Ala
3064632	G	A	SNP	Rv2752c	silent (Ala520)
3107030	A	G	SNP	Rv2797c	Leu93Pro
3116626	G	C	SNP	Rv2811	Gly163Ala
3118820	C	T	SNP	Rv2813	silent (Thr199)
3125431	G	A	SNP	Rv2818c	silent (Thr238)
3125949	T	C	SNP	Rv2818c	Thr66Ala
3128190	G	C	SNP	Rv2820c	Pro28Arg
3136773	G	T	SNP	Rv2829c (vapC22)	silent (Val80)
3153915	G	A	SNP	Rv2846c (efpA)	silent (Asp239)
3154120	G	A	SNP	Rv2846c (efpA)	Pro171Leu
3157954	C	T	SNP	Rv2849c (cobO)	Trp64STOP
3164938	ACG	A	DEL	Rv2854	
3169643	C	T	SNP	Rv2858c (aldC)	Val361Ile
3186588	ACGG	A	DEL	Rv2874 (dipZ)	
3191799	C	A	SNP	Rv2882c (frr)	Ala135Ser
3192655	G	A	SNP	Rv2883c (pyrH)	silent (Thr168)
3220545	C	T	SNP	Rv2913c	Trp385STOP
3221093	C	T	SNP	Rv2913c	silent (Glu202)
3242915	A	G	SNP	Rv2928 (tesA)	Asn240Asp
3255154	G	A	SNP	Rv2932 (ppsB)	Met(s)1361Ile
3260067	G	A	SNP	Rv2933 (ppsC)	silent (Leu1461)
3260430	C	T	SNP	Rv2933 (ppsC)	silent (Thr1582)
3263235	G	A	SNP	Rv2934 (ppsD)	Asp330Asn
3314243	G	A	SNP	Rv2962c	Gln294STOP
3329840	T	C	SNP	Rv2973c (recG)	Tyr36Cys
3330725	C	T	SNP	Rv2974c	Ala213Thr
3330952	T	G	SNP	Rv2974c	Gln137Pro
3342275	G	C	SNP	Rv2985 (mutT1)	Glu37Asp
3351757	CG	C	DEL	Rv2994	
3366662	G	A	SNP	Rv3008	Val7Ile
3371641	G	A	SNP	Rv3012c (gatC)	silent (Gly30)
3374122	G	T	SNP	Rv3014c (ligA)	Leu167Ile
3378828	C	A	SNP	Rv3019c (esxR)	Trp58Cys
3390605	C	G	SNP	Rv3031	silent (Gly228)
3392772	T	C	SNP	Rv3032	silent (Asp413)
3392874	G	A	SNP	Rv3032A	Met(s)21Ile
3396588	T	C	SNP	Rv3036c (TB22,2)	His185Arg
3397850	G	GT	INS	Rv3037c	
3411558	C	A	SNP	Rv3050c	Ala134Ser
3436367	G	C	SNP	Rv3073c	His107Asp

3442872	G	A	SNP	Rv3080c (pknK)	silent (Ala1039)
3448288	T	C	SNP	Rv3082c (virS)	Met(s)47Val(s)
3451002	A	G	SNP	Rv3085	Glu28Gly
3452121	G	A	SNP	Rv3086 (adhD)	Gly114Asp
3454410	C	G	SNP	Rv3088 (tgs4)	Ala24Gly
3455454	C	T	SNP	Rv3088 (tgs4)	Ala372Val
3472616	G	A	SNP	Rv3104c	Arg55Trp
3474342	G	A	SNP	Rv3106 (fprA)	Leu(s)112Leu
3479523	C	A	SNP	Rv3111 (moaC1)	Ala118Glu
3526785	C	G	SNP	Rv3158 (nuoN)	silent (Thr332)
3540745	A	G	SNP	Rv3171c (hpx)	Leu(s)1Leu
3543647	C	A	SNP	Rv3175	Pro263Gln
3543808	G	A	SNP	Rv3175	Asp317Asn
3545675	G	A	SNP	Rv3177	Gly77Ser
3546301	G	T	SNP	Rv3177	Glu285Asp
3595353	G	A	SNP	Rv3218	Gly296Ser
3614959	C	T	SNP	Rv3239c	Arg882Gln
3626741	G	A	SNP	Rv3246c (mtrA)	silent (Ala203)
3629776	A	G	SNP	Rv3249c	silent (Arg204)
3630446	T	C	SNP	Rv3250c (rubB)	Ser41Gly
3634161	G	A	SNP	Rv3254	Glu163Lys
3655249	G	C	SNP	Rv3273	Val(s)205Leu
3657710	C	G	SNP	Rv3274c (fadE25)	Gly127Ala
3667019	A	G	SNP	Rv3285 (accA3)	silent (Ala221)
3674210	G	T	SNP	Rv3293 (pcd)	Val(s)203Val
3674242	G	A	SNP	Rv3293 (pcd)	Gly214Asp
3683282	C	T	SNP	Rv3299c (atsB)	silent (Glu894)
3695969	T	C	SNP	Rv3308 (pmmB)	Leu369Pro
3718807	C	T	SNP	Rv3332 (nagA)	silent (Ala71)
3722825	A	G	SNP	Rv3336c (trpS)	silent (Tyr269)
3774077	T	A	SNP	Rv3362c	Thr27Ser
3777123	G	A	SNP	Rv3365c	Leu127Leu(s)
3791210	G	T	SNP	Rv3377c	silent (Arg382)
3813364	C	T	SNP	Rv3396c (guaA)	Ala239Thr
3815268	G	A	SNP	Rv3398c (idsA1)	Ser280Leu(s)
3823834	C	T	SNP	Rv3403c	Met(s)10Ile
3824416	G	GA	INS	Rv3404c	
3830353	G	A	SNP	Rv3411c (guaB2)	silent (Ala389)
3850633	C	T	SNP	Rv3432c (gadB)	silent (Pro374)
3871339	C	CG	INS	Rv3450c (eccB4)	
3882805	G	A	SNP	Rv3464 (rmlB)	silent (Glu323)
3884906	A	G	SNP	Rv3467	Lys315Glu
3898286	G	A	SNP	Rv3479	Gly823Ser
3898734	G	T	SNP	Rv3479	Arg972Leu
3899662	G	A	SNP	Rv3480c	silent (His247)

3913179	G	A	SNP	Rv3494c (mce4F)	Ala64Val(s)
3938875	T	C	SNP	Rv3510c	Tyr128Cys
3945572	G	A	SNP	Rv3513c (fadD18)	silent (Val59)
3951036	G	C	SNP	Rv3515c (fadD19)	Gln479Glu
3961802	A	G	SNP	Rv3525c	STOP175Gln
3967223	G	A	SNP	Rv3530c	His200Tyr
3976952	C	T	SNP	Rv3537 (kstD)	silent (Ala528)
3976953	C	T	SNP	Rv3537 (kstD)	Pro529Ser
3984184	C	T	SNP	Rv3545c (cyp125)	Trp421STOP
3984512	G	A	SNP	Rv3545c (cyp125)	Pro312Ser
3997129	G	A	SNP	Rv3557c	Ser168Leu(s)
3997351	G	A	SNP	Rv3557c	Ser94Leu(s)
4008243	C	T	SNP	Rv3566A	Arg64His
4009276	C	T	SNP	Rv3567c (hsaB)	Ala3Thr
4012072	G	A	SNP	Rv3570c (hsaA)	Leu67Leu(s)
4024967	C	G	SNP	Rv3582c (ispD)	Val(s)25Leu
4027739	G	A	SNP	Rv3585 (radA)	Val(s)432Val
4029482	G	A	SNP	Rv3587c	Thr94Met(s)
4044585	G	A	SNP	Rv3602c (panC)	Ala209Val(s)
4050730	G	A	SNP	Rv3610c (ftsH)	silent (Ser718)
4054364	C	T	SNP	Rv3614c (espD)	silent (Leu111)
4060201	G	A	SNP	Rv3619c (esxV)	Ser23Leu(s)
4060210	T	A	SNP	Rv3619c (esxV)	Gln20Leu
4060230	G	A	SNP	Rv3619c (esxV)	silent (His13)
4065263	G	A	SNP	Rv3626c	Thr214Ile
4108803	G	A	SNP	Rv3667 (acs)	Asp338Asn
4130284	G	A	SNP	Rv3688c	Ala25Val(s)
4137814	G	A	SNP	Rv3695	Met(s)203Ile
4158199	C	A	SNP	Rv3712	silent (Arg407)
4165222	T	C	SNP	Rv3721c (dnaZX)	Thr504Ala
4172095	C	T	SNP	Rv3726	silent (Ala225)
4173794	C	T	SNP	Rv3727	silent (Val280)
4177882	C	A	SNP	Rv3728	Leu1004Met(s)
4181662	G	A	SNP	Rv3730c	Pro20Leu
4182492	G	A	SNP	Rv3731 (ligC)	silent (Ala245)
4183433	C	T	SNP	Rv3732	Ala167Val(s)
4183442	C	T	SNP	Rv3732	Pro170Leu
4187350	G	A	SNP	Rv3736	silent (Leu239)
4187874	T	A	SNP	Rv3737	Leu(s)59STOP
4192185	C	T	SNP	Rv3741c	Trp223STOP
4201486	C	T	SNP	Rv3755c	Glu135Lys
4204921	G	A	SNP	Rv3759c (proX)	silent (Ala151)
4206006	G	C	SNP	Rv3761c (fadE36)	silent (Leu304)
4212886	G	GCCT	INS	Rv3766	
4218940	G	T	SNP	Rv3774 (echA21)	Gly31Val(s)

4222852	G	C	SNP	Rv3777	silent (Pro53)
4235028	G	A	SNP	Rv3788	silent (Ser83)
4243848	G	A	SNP	Rv3794 (embA)	Val(s)206Met(s)
4245655	A	C	SNP	Rv3794 (embA)	Asp808Ala
4247254	A	G	SNP	Rv3795 (embB)	silent (Ser247)
4257853	C	A	SNP	Rv3800c (pks13)	silent (Ala1098)
4265662	G	GC	INS	Rv3804c (fbpA)	
4285593	C	A	SNP	Rv3820c (papA2)	Arg78Leu
4286156	T	C	SNP	Rv3821	Leu(s)62Leu
4292038	C	A	SNP	Rv3824c (papA1)	silent (Pro379)
4298408	C	T	SNP	Rv3825c (pks2)	Asp400Asn
4298568	G	A	SNP	Rv3825c (pks2)	silent (Val346)
4299440	G	A	SNP	Rv3825c (pks2)	Leu56Leu(s)
4306367	C	T	SNP	Rv3832c	Ala149Thr
4314216	G	A	SNP	Rv3841 (bfrB)	silent (Ala13)
4316463	G	A	SNP	Rv3843c	Pro45Leu
4324292	C	T	SNP	Rv3850	Ser93Phe
4337820	C	CG	INS	Rv3860	
4338242	G	C	SNP	Rv3861	
4349390	C	T	SNP	Rv3871 (eccCb1)	silent (Tyr188)
4356864	C	CTG	INS	Rv3878 (espJ)	
4359177	T	TCCCCGGTGTG	INS	Rv3879c (espK)	
4362223	T	C	SNP	Rv3882c (eccE1)	Ile400Val
4369319	C	T	SNP	Rv3886c (mycP2)	Val(s)284Val
4369848	G	A	SNP	Rv3886c (mycP2)	Pro108Leu
4385467	CG	C	DEL	Rv3900c	
4386629	GGTCGTAGCC	G	DEL	Rv3901c	
4386702	G	C	SNP	Rv3901c	Ala38Gly
4387968	T	C	SNP	Rv3903c	Gln822Arg
4401201	T	C	SNP	Rv3912	Val111Ala
4404247	G	A	SNP	Rv3915	silent (Leu352)
4406998	G	T	SNP	Rv3918c (parA)	silent (Ala178)
4407873	C	A	SNP	Rv3919c (gid)	Val(s)110Val

Table S7: SNVs and InDels recovered for the clinical strain C1706098817.

Position	Reference	Sample	Type	Gene	AA Exchange
2370	G	A	SNP	Rv0002 (dnaN)	Val107Ile
4691	A	G	SNP	Rv0004	silent (Lys86)
10174	C	T	SNP	Rv0007	silent (Ser87)
13482	G	A	SNP	Rv0010c	Ala26Val(s)
20407	G	A	SNP	Rv0017c (rodA)	Leu412Leu(s)
22603	C	T	SNP	Rv0018c (pstP)	Leu(s)193Leu
22961	T	G	SNP	Rv0018c (pstP)	Asp74Ala
23174	C	A	SNP	Rv0018c (pstP)	Arg3Leu
26747	G	GC	INS	Rv0021c	
29287	C	T	SNP	Rv0025	Arg15Cys
32773	G	A	SNP	Rv0029	silent (Lys239)
37040	C	A	SNP	Rv0034	silent (Gly58)
49857	G	C	SNP	Rv0045c	Pro28Arg
50557	T	C	SNP	Rv0046c (ino1)	Arg190Gly
50593	A	C	SNP	Rv0046c (ino1)	Ser178Ala
55540	G	GCCGCCGCC T	INS	Rv0050 (ponA1)	
56531	T	C	SNP	Rv0051	Leu(s)279Ser
61842	T	C	SNP	Rv0058 (dnaB)	Leu(s)483Leu
64028	C	T	SNP	Rv0060	silent (Pro40)
65240	GT	G	DEL	Rv0061c	
77469	C	T	SNP	Rv0069c (sdaA)	Gly52Ser
78702	G	A	SNP	Rv0070c (glyA2)	silent (Tyr65)
88764	C	T	SNP	Rv0079	silent (Ala187)
103522	C	G	SNP	Rv0093c	Asp48His
103836	G	T	SNP	Rv0094c	Asn276Lys
103840	T	C	SNP	Rv0094c	His275Arg
103893	C	G	SNP	Rv0094c	silent (Leu257)
103896	C	G	SNP	Rv0094c	Glu256Asp
103968	G	A	SNP	Rv0094c	silent (Asp232)
103971	A	G	SNP	Rv0094c	silent (Cys231)
103974	G	A	SNP	Rv0094c	silent (Gly230)
104472	T	C	SNP	Rv0094c	silent (Leu64)
104475	C	G	SNP	Rv0094c	silent (Arg63)
104478	T	C	SNP	Rv0094c	silent (Ser62)
121245	G	A	SNP	Rv0103c (ctpB)	Ala310Val(s)
136749	A	G	SNP	Rv0112 (gca)	Tyr154Cys
154051	A	G	SNP	Rv0126 (treS)	silent (Gly576)
158688	A	G	SNP	Rv0131c (fadE1)	Phe324Ser
163956	T	A	SNP	Rv0136 (cyp138)	Tyr197STOP
164814	G	A	SNP	Rv0137c (msrA)	silent (Pro149)
165507	T	C	SNP	Rv0138	Ile62Thr

171476	GT	G	DEL	Rv0145	
172664	T	C	SNP	Rv0146	Ser152Pro
186325	A	C	SNP	Rv0157 (pntB)	Asp425Ala
203354	C	T	SNP	Rv0172 (mce1D)	silent (Pro293)
206481	C	G	SNP	Rv0174 (mce1F)	silent (Pro417)
206484	G	T	SNP	Rv0174 (mce1F)	silent (Gly418)
212206	C	T	SNP	Rv0180c	silent (Arg15)
227386	G	T	SNP	Rv0194	Gly170Val
229312	C	CG	INS	Rv0194	
234496	C	CGT	INS	Rv0197	
249522	T	C	SNP	Rv0209	Val(s)162Ala
253200	C	T	SNP	Rv0211 (pckA)	silent (Asn473)
284154	C	T	SNP	Rv0236c (aftD)	Ala900Thr
300776	C	T	SNP	Rv0248c	Asp10Asn
317047	C	T	SNP	Rv0265c	Gly153Ser
346205	C	T	SNP	Rv0284 (eccC3)	Arg191Cys
381030	A	G	SNP	Rv0312	Ser159Gly
392990	G	T	SNP	Rv0327c (cyp135A1)	His352Gln
397842	T	C	SNP	Rv0332	Val(s)134Ala
414182	C	T	SNP	Rv0343 (iniC)	Arg476Cys
441304	G	A	SNP	Rv0363c (fba)	silent (Cys332)
442064	G	A	SNP	Rv0363c (fba)	Thr79Ile
444284	A	G	SNP	Rv0366c	Trp178Arg
454802	A	G	SNP	Rv0377	Thr128Ala
469353	T	G	SNP	Rv0389 (purT)	Leu340Arg
483489	G	A	SNP	Rv0403c (mmpS1)	silent (Leu56)
486342	G	C	SNP	Rv0405 (pks6)	Glu204Asp
486511	T	C	SNP	Rv0405 (pks6)	Ser261Pro
497393	G	A	SNP	Rv0411c (glnH)	Thr303Ile
516324	A	ACAT	INS	Rv0427c (xthA)	
516447	T	C	SNP	Rv0427c (xthA)	Tyr149Cys
540126	C	T	SNP	Rv0450c (mmpL4)	Asp456Asn
549875	C	T	SNP	Rv0458	silent (His67)
551637	A	G	SNP	Rv0459	Asp147Gly
552361	G	A	SNP	Rv0461	silent (Leu112)
552895	G	A	SNP	Rv0462 (lpdC)	Val(s)94Val
553220	C	T	SNP	Rv0462 (lpdC)	Leu203Phe
570240	G	T	SNP	Rv0481c	silent (Gly91)
572834	G	A	SNP	Rv0483 (lprQ)	silent (Ala375)
596475	C	T	SNP	Rv0505c (serB1)	silent (Gln37)
597672	G	A	SNP	Rv0507 (mmpL2)	silent (Ala158)
617729	G	A	SNP	Rv0527 (ccdA)	silent (Gly79)
619642	G	A	SNP	Rv0528	Val(s)446Val
621015	C	T	SNP	Rv0530	Pro37Ser
626906	C	G	SNP	Rv0535 (pnp)	silent (Gly150)

634288	C	T	SNP	Rv0541c	Leu(s)39Leu
654355	C	T	SNP	Rv0563 (htpX)	silent (Thr159)
658985	G	C	SNP	Rv0567	Arg222Pro
661929	C	A	SNP	Rv0570 (nrdZ)	Ala212Asp
687613	GT	G	DEL	Rv0589 (mce2A)	
688834	C	A	SNP	Rv0590 (mce2B)	
693079	C	T	SNP	Rv0593 (lprL)	silent (Asp352)
707716	T	C	SNP	Rv0613c	silent (Arg600)
727440	C	T	SNP	Rv0631c (recC)	silent (Leu289)
729357	C	T	SNP	Rv0633c	silent (Gly270)
752209	G	A	SNP	Rv0655 (mkl)	silent (Pro231)
771326	C	T	SNP	Rv0671 (lppP)	Arg249Cys
772400	G	C	SNP	Rv0672 (fadE8)	Arg306Pro
784587	G	A	SNP	Rv0684 (fusA1)	silent (Glu701)
784588	T	C	SNP	Rv0684 (fusA1)	STOP702Arg
787745	T	G	SNP	Rv0687	Met(s)216Arg
790083	C	T	SNP	Rv0690c	Gly331Ser
814443	A	C	SNP	Rv0721 (rpsE)	Lys39Thr
821184	G	A	SNP	Rv0728c (serA2)	Pro98Leu
828422	T	G	SNP	Rv0736 (rslA)	Ser95Ala
832246	A	G	SNP	Rv0740	silent (Gln157)
834901	C	T	SNP	Rv0744c	Val16Ile
860512	C	T	SNP	Rv0767c	Ala67Thr
866827	T	C	SNP	Rv0773c (ggtA)	Asn188Ser
886348	A	G	SNP	Rv0792c	Ile100Thr
898832	T	C	SNP	Rv0805	Val(s)1Ala
905264	G	A	SNP	Rv0811c	silent (Ala359)
909921	G	A	SNP	Rv0816c (thiX)	Pro38Leu
933126	G	A	SNP	Rv0837c	silent (Asp302)
942811	C	A	SNP	Rv0846c	Val(s)462Leu(s)
952984	G	A	SNP	Rv0856	Gly54Ser
960826	G	A	SNP	Rv0862c	Ala596Val
964594	GTCGGCGGGCGCGGGTGGCG CCAGT	G	DEL	Rv0867c (rpfA)	
987817	A	AT	INS	Rv0888	
994091	G	A	SNP	Rv0892	Gly80Asp
1007361	T	C	SNP	Rv0904c (accD3)	Thr274Ala
1010228	A	G	SNP	Rv0907	silent (Ala31)
1010435	G	C	SNP	Rv0907	Val(s)100Val
1018811	G	A	SNP	Rv0914c	silent (Asn385)
1033573	A	G	SNP	Rv0926c	Cys72Arg
1034571	C	G	SNP	Rv0927c	Gly21Arg
1049161	C	A	SNP	Rv0939	silent (Thr250)
1066020	C	A	SNP	Rv0954	silent (Pro298)
1072628	G	A	SNP	Rv0959	silent (Ala458)

1074628	C	A	SNP	Rv0962c (lprP)	Val163Phe
1084749	G	A	SNP	Rv0973c (accA2)	silent (Ala334)
1100900	G	A	SNP	Rv0984 (moaB2)	silent (Leu147)
1104499	AT	A	DEL	Rv0987	
1121071	G	A	SNP	Rv1004c	Leu360Leu(s)
1157583	G	A	SNP	Rv1032c (trcS)	Pro125Ser
1160770	T	A	SNP	Rv1037c (esxI)	Gln20Leu
1165114	C	T	SNP	Rv1041c	
1188232	G	A	SNP	Rv1066	Val79Ile
1214118	A	G	SNP	Rv1087A	Thr27Ala
1228067	G	A	SNP	Rv1099c (glpX)	silent (Thr206)
1239857	G	A	SNP	Rv1114 (vapC32)	Gly83Asp
1265126	G	T	SNP	Rv1137c	silent (Thr110)
1278278	G	A	SNP	Rv1149	Gly129Glu
1279709	G	C	SNP	Rv1152	Asp19His
1279900	C	T	SNP	Rv1152	silent (Arg82)
1284572	C	T	SNP	Rv1158c	silent (Ala97)
1287639	C	T	SNP	Rv1161 (narG)	silent (Pro104)
1319911	A	G	SNP	Rv1181 (pks4)	Ile1560Val
1324918	C	G	SNP	Rv1184c	Asp232His
1341007	T	C	SNP	Rv1198 (esxL)	Met(s)1Thr
1359953	C	T	SNP	Rv1216c	Arg65His
1363330	C	G	SNP	Rv1219c	Arg11Thr
1365430	G	C	SNP	Rv1222 (rseA)	silent (Pro29)
1370066	C	T	SNP	Rv1226c	Arg77His
1396550	A	C	SNP	Rv1251c	silent (Leu897)
1403496	C	G	SNP	Rv1256c (cyp130)	Glu370Gln
1404574	C	T	SNP	Rv1256c (cyp130)	silent (Gln10)
1414621	C	A	SNP	Rv1266c (pknH)	Gly407Val
1414629	T	A	SNP	Rv1266c (pknH)	Leu404Phe
1414653	C	T	SNP	Rv1266c (pknH)	silent (Pro396)
1415097	C	G	SNP	Rv1266c (pknH)	silent (Ala248)
1416222	A	G	SNP	Rv1267c (embR)	Phe376Leu
1416232	A	G	SNP	Rv1267c (embR)	silent (Cys372)
1416234	A	C	SNP	Rv1267c (embR)	Cys372Gly
1420133	A	G	SNP	Rv1271c	Val(s)57Ala
1423699	T	C	SNP	Rv1273c	Ser118Gly
1442962	C	T	SNP	Rv1289	Pro66Ser
1445598	C	G	SNP	Rv1291c	Lys79Asn
1457588	G	A	SNP	Rv1301	Glu11Lys
1468420	G	A	SNP	Rv1313c	silent (Arg362)
1481971	C	T	SNP	Rv1319c	Val(s)177Val
1486965	C	T	SNP	Rv1323 (fadA4)	silent (Gly368)
1492049	C	T	SNP	Rv1326c (glgB)	silent (Leu88)
1494268	T	G	SNP	Rv1327c (glgE)	His53Pro

1516541	A	G	SNP	Rv1349 (irtB)	Ile307Val
1537796	A	C	SNP	Rv1365c (rsfA)	Leu125Arg
1545609	A	G	SNP	Rv1372	Asp262Gly
1556886	G	A	SNP	Rv1383 (carA)	Ala306Thr
1564586	C	T	SNP	Rv1389 (gmk)	silent (Gly62)
1565951	G	A	SNP	Rv1391 (dfp)	Glu171Lys
1599387	C	T	SNP	Rv1424c	Asp90Asn
1619841	G	A	SNP	Rv1442 (bisC)	Val(s)17Val
1647830	G	A	SNP	Rv1461	Gly281Asp
1667374	T	C	SNP	Rv1477 (ripA)	Ser129Pro
1672808	G	A	SNP	Rv1482c	silent (Ala164)
1677267	G	A	SNP	Rv1487	silent (Gln109)
1687744	C	A	SNP	Rv1496	silent (Arg287)
1699088	C	T	SNP	Rv1508c	silent (Ser269)
1713460	C	G	SNP	Rv1521 (fadD25)	Leu387Val(s)
1736653	G	T	SNP	Rv1536 (ileS)	Glu45Asp
1747966	C	T	SNP	Rv1547 (dnaE1)	silent (Asp91)
1749192	C	T	SNP	Rv1547 (dnaE1)	Thr500Ile
1767123	C	A	SNP	Rv1562c (treZ)	Trp7Leu(s)
1779370	G	C	SNP	Rv1573	silent (Thr19)
1780586	C	CG	INS	Rv1575	
1780712	C	G	SNP	Rv1576c	Trp451Cys
1780800	C	A	SNP	Rv1576c	Gly422Val
1788570	G	T	SNP	Rv1587c	Asn198Lys
1788574	T	C	SNP	Rv1587c	His197Arg
1789446	C	T	SNP	Rv1588c	Val131Ile
1789516	A	G	SNP	Rv1588c	silent (Gly107)
1789564	C	T	SNP	Rv1588c	silent (Arg91)
1789565	C	A	SNP	Rv1588c	Arg91Leu
1789671	C	T	SNP	Rv1588c	Ala56Thr
1789675	A	C	SNP	Rv1588c	silent (Gly54)
1789678	C	G	SNP	Rv1588c	Val(s)53Val
1802745	G	C	SNP	Rv1602 (hisH)	Ala28Pro
1805690	G	A	SNP	Rv1606 (hisI)	Arg13His
1822769	C	T	SNP	Rv1621c (cydD)	Ala169Thr
1827322	C	T	SNP	Rv1625c (cya)	silent (Ala208)
1829837	C	T	SNP	Rv1627c	Val(s)79Val
1831289	G	T	SNP	Rv1629 (polA)	Gly209Trp
1834012	G	A	SNP	Rv1630 (rpsA)	silent (Arg157)
1849034	T	C	SNP	Rv1640c (lysX)	Asp1001Gly
1855037	G	T	SNP	Rv1645c	Gln140Lys
1860990	T	G	SNP	Rv1650 (pheT)	Cys411Trp
1861520	C	T	SNP	Rv1650 (pheT)	Ala588Val
1885772	G	A	SNP	Rv1662 (pks8)	Ala1357Thr
1886263	C	G	SNP	Rv1662 (pks8)	His1520Gln

1890236	G	T	SNP	Rv1664 (pks9)	silent (Pro737)
1911661	G	GAA	INS	Rv1686c	
1917754	C	T	SNP	Rv1692	Gln353STOP
1928493	G	T	SNP	Rv1702c	Pro28His
1930545	T	G	SNP	Rv1704c (cycA)	silent (Ala304)
1930898	A	G	SNP	Rv1704c (cycA)	Ser187Pro
1952161	G	T	SNP	Rv1726	Gly104Trp
1955002	G	A	SNP	Rv1729c	Leu190Phe
1956381	C	T	SNP	Rv1730c	Asp289Asn
1959775	C	T	SNP	Rv1732c	Ser6Asn
1971093	T	C	SNP	Rv1744c	Thr100Ala
1971673	G	A	SNP	Rv1745c (idi)	Leu107Leu(s)
1977405	G	C	SNP	Rv1749c	Leu161Val
1980556	C	T	SNP	Rv1751	silent (Asp312)
1989370	C	T	SNP	Rv1758 (cut1)	Pro110Leu
1990256	T	G	SNP	Rv1759c (wag22)	silent (Ser774)
1992323	G	GC	INS	Rv1759c (wag22)	
1993808	A	T	SNP	Rv1760	Glu219Val(s)
2018966	T	C	SNP	Rv1782 (eccB5)	silent (Asp409)
2047861	C	T	SNP	Rv1805c	silent (Arg58)
2047874	G	A	SNP	Rv1805c	Thr54Met(s)
2053701	G	A	SNP	Rv1811 (mgtC)	Val87Ile
2066828	G	A	SNP	Rv1821 (secA2)	silent (Gln124)
2086468	C	T	SNP	Rv1837c (glcB)	Ala172Thr
2116648	TC	T	DEL	Rv1867	
2119694	C	T	SNP	Rv1869c	Met(s)334Ile
2123145	C	T	SNP	Rv1872c (lldD2)	Val3Ile
2124756	C	T	SNP	Rv1875	Arg126Trp
2127504	T	C	SNP	Rv1877	Ile534Thr
2127760	C	T	SNP	Rv1877	silent (Ser619)
2145662	G	A	SNP	Rv1899c (lppD)	Ala195Val(s)
2149716	G	T	SNP	Rv1902c (nanT)	silent (Arg187)
2151551	A	G	SNP	Rv1905c (aao)	Val(s)282Ala
2191428	C	T	SNP	Rv1938 (ephB)	silent (Arg134)
2197065	C	G	SNP	Rv1945	silent (Ala359)
2211684	TCGC	T	DEL	Rv1968 (mce3C)	
2215204	G	A	SNP	Rv1970 (lprM)	Gly361Asp
2223553	G	T	SNP	Rv1980c (mpt64)	Phe159Leu
2241208	A	C	SNP	Rv1997 (ctpF)	silent (Thr350)
2242238	G	A	SNP	Rv1997 (ctpF)	Val694Ile
2245117	G	A	SNP	Rv1999c	Arg8Cys
2252600	C	T	SNP	Rv2006 (otsB1)	Pro200Leu
2255533	A	C	SNP	Rv2006 (otsB1)	Thr1178Pro
2277571	C	T	SNP	Rv2030c	Ala306Thr
2282058	C	T	SNP	Rv2035	silent (Leu149)

2284848	G	A	SNP	Rv2039c	Ala265Val
2287549	T	C	SNP	Rv2041c	Thr100Ala
2288237	G	A	SNP	Rv2042c	Leu149Leu(s)
2293872	G	T	SNP	Rv2047c	Leu219Ile
2297974	T	C	SNP	Rv2048c (pks12)	Thr3005Ala
2300546	A	T	SNP	Rv2048c (pks12)	His2147Gln
2301782	T	C	SNP	Rv2048c (pks12)	Val1735Val(s)
2312634	C	T	SNP	Rv2053c (fxsA)	Gly139Asp
2327819	AT	A	DEL	Rv2070c (cobK)	
2330343	C	A	SNP	Rv2073c	silent (Arg207)
2332153	G	A	SNP	Rv2075c	Arg243Trp
2341636	C	G	SNP	Rv2083	Leu256Val(s)
2342050	G	A	SNP	Rv2084	silent (Glu81)
2352231	C	A	SNP	Rv2093c (tatC)	Ala267Ser
2354550	T	G	SNP	Rv2096c (pafB)	Gln254Pro
2355326	C	T	SNP	Rv2097c (pafA)	Ser451Asn
2355363	G	T	SNP	Rv2097c (pafA)	silent (Arg439)
2364420	G	A	SNP	Rv2103c (vapC37)	Ala34Val
2377178	C	T	SNP	Rv2117	Leu111Leu(s)
2396140	G	A	SNP	Rv2136c	silent (Leu233)
2404853	G	A	SNP	Rv2145c (wag31)	silent (Ala182)
2413274	A	C	SNP	Rv2153c (murG)	silent (Ser26)
2420173	A	C	SNP	Rv2158c (murE)	Leu(s)146Val(s)
2438449	C	G	SNP	Rv2176 (pknL)	Ala170Gly
2439519	G	A	SNP	Rv2177c	silent (Arg143)
2439572	C	T	SNP	Rv2177c	Glu126Lys
2450043	G	A	SNP	Rv2188c (pimB)	Leu370Leu(s)
2461113	C	T	SNP	Rv2196 (qcrB)	Pro479Leu
2492496	A	C	SNP	Rv2222c (glnA2)	Val416Gly
2496334	G	A	SNP	Rv2224c (caeA)	silent (Gly230)
2501007	C	T	SNP	Rv2227	Thr26Ile
2514699	C	T	SNP	Rv2241 (aceE)	Arg721Cys
2518657	G	A	SNP	Rv2245 (kasA)	silent (Ala181)
2519800	C	T	SNP	Rv2246 (kasB)	silent (Gly135)
2543923	T	G	SNP	Rv2268c (cyp128)	silent (Arg118)
2554796	T	G	SNP	Rv2281 (pitB)	Ser542Ala
2574774	T	C	SNP	Rv2303c	silent (Gly82)
2577881	G	C	SNP	Rv2306B	
2604156	TCAGTGCCAA	T	DEL	Rv2330c (lppP)	
2616790	A	G	SNP	Rv2339 (mmpL9)	Lys700Glu
2623635	G	T	SNP	Rv2344c (dgt)	silent (Arg40)
2626105	A	G	SNP	Rv2346c (esxO)	Leu(s)23Ser
2626108	C	G	SNP	Rv2346c (esxO)	Gly22Ala
2626348	C	T	SNP	Rv2347c (esxP)	Ala58Thr
2631556	C	G	SNP	Rv2351c (plcA)	Gly174Arg

2631565	T	C	SNP	Rv2351c (plcA)	Ile171Val
2631574	T	C	SNP	Rv2351c (plcA)	Thr168Ala
2631583	G	A	SNP	Rv2351c (plcA)	Leu165Leu(s)
2631599	G	A	SNP	Rv2351c (plcA)	silent (Ile159)
2631620	A	G	SNP	Rv2351c (plcA)	silent (Gly152)
2631641	T	G	SNP	Rv2351c (plcA)	silent (Pro145)
2631962	T	G	SNP	Rv2351c (plcA)	silent (Gly38)
2631967	G	A	SNP	Rv2351c (plcA)	Pro37Ser
2631968	A	G	SNP	Rv2351c (plcA)	silent (Cys36)
2631971	A	G	SNP	Rv2351c (plcA)	silent (Pro35)
2631977	G	C	SNP	Rv2351c (plcA)	silent (Ala33)
2643431	A	C	SNP	Rv2361c	Phe13Cys
2647357	C	T	SNP	Rv2366c	silent (Pro337)
2649610	C	T	SNP	Rv2368c (phoH1)	Arg122Gln
2650228	G	T	SNP	Rv2369c	Asp7Glu
2672823	G	A	SNP	Rv2383c (mbtB)	silent (Leu1005)
2678553	G	A	SNP	Rv2385 (mbtJ)	Val(s)275Val
2681514	G	A	SNP	Rv2387	silent (Gly250)
2682240	T	C	SNP	Rv2388c (hemN)	Val301Val(s)
2697236	T	A	SNP	Rv2400c (subI)	Asp160Val
2711204	G	T	SNP	Rv2413c	Pro33Gln
2711432	CACTGCGCA	C	DEL	Rv2414c	
2741711	G	A	SNP	Rv2443 (dctA)	Asp335Asn
2743259	T	C	SNP	Rv2444c (rne)	Thr576Ala
2751502	G	T	SNP	Rv2449c	Ala24Asp
2763624	G	A	SNP	Rv2461c (clpP1)	Leu51Leu(s)
2767313	T	C	SNP	Rv2464c	Glu118Gly
2812034	T	G	SNP	Rv2497c (bkdA)	Gln21His
2812639	C	T	SNP	Rv2498c (citE)	Ala180Thr
2819673	T	C	SNP	Rv2504c (scoA)	silent (Gln66)
2823316	G	A	SNP	Rv2508c	silent (Leu426)
2828757	T	G	SNP	Rv2512c	silent (Arg349)
2847680	A	G	SNP	Rv2524c (fas)	silent (Ile551)
2853507	C	T	SNP	Rv2529	silent (Arg211)
2853633	C	G	SNP	Rv2529	silent (Arg253)
2866551	C	G	SNP	Rv2543 (lppA)	silent (Ala28)
2866569	C	A	SNP	Rv2543 (lppA)	silent (Thr34)
2866578	C	A	SNP	Rv2543 (lppA)	His37Gln
2866580	A	G	SNP	Rv2543 (lppA)	Asn38Ser
2866607	G	A	SNP	Rv2543 (lppA)	Gly47Asp
2866647	G	A	SNP	Rv2543 (lppA)	silent (Lys60)
2866671	G	A	SNP	Rv2543 (lppA)	silent (Glu68)
2866677	A	C	SNP	Rv2543 (lppA)	silent (Leu70)
2866863	C	G	SNP	Rv2543 (lppA)	silent (Ala132)
2866876	A	G	SNP	Rv2543 (lppA)	Ile137Val

2866880	C	T	SNP	Rv2543 (lppA)	Ala138Val
2866882	G	A	SNP	Rv2543 (lppA)	Ala139Thr
2867207	C	G	SNP	Rv2544 (lppB)	silent (Ala28)
2867333	C	A	SNP	Rv2544 (lppB)	silent (Leu70)
2887046	T	G	SNP	Rv2566	Leu225Arg
2898597	C	A	SNP	Rv2573	silent (Arg185)
2902874	C	T	SNP	Rv2578c	Gly220Ser
2911609	G	A	SNP	Rv2585c	Leu357Leu(s)
2932770	G	GC	INS	Rv2605c (tesB2)	
2953871	C	A	SNP	Rv2627c	Gly293Val
2956270	C	T	SNP	Rv2629	silent (Thr168)
2957418	A	G	SNP	Rv2630	Thr176Ala
2971122	T	C	SNP	Rv2646	Ile191Thr
2974933	A	G	SNP	Rv2650c	Ile101Thr
2975227	T	G	SNP	Rv2650c	Asn3Thr
2976616	G	C	SNP	Rv2653c	His98Gln
2976638	T	A	SNP	Rv2653c	Lys91Met(s)
2976799	G	A	SNP	Rv2653c	silent (Ala37)
2977410	C	G	SNP	Rv2655c	Glu417Gln
2983613	G	A	SNP	Rv2666	silent (Gly181)
2995816	C	T	SNP	Rv2679 (echA15)	silent (Ala234)
3001053	T	C	SNP	Rv2684 (arsA)	Ile147Thr
3016943	G	C	SNP	Rv2702 (ppgK)	Gly29Ala
3020446	GC	G	DEL	Rv2706c	
3020449	A	G	SNP	Rv2706c	silent (Val3)
3049806	C	T	SNP	Rv2737c (recA)	Arg540Gln
3052353	G	A	SNP	Rv2739c	silent (Ala279)
3061362	T	C	SNP	Rv2748c (ftsK)	Asp382Gly
3105332	G	A	SNP	Rv2796c (lppV)	silent (Thr96)
3112985	A	G	SNP	Rv2804c	
3116538	G	A	SNP	Rv2811	Val134Ile
3133016	C	G	SNP	Rv2825c	Arg175Thr
3135950	C	G	SNP	Rv2828c	silent (Ser128)
3135951	G	C	SNP	Rv2828c	Ser128Trp
3147316	G	A	SNP	Rv2839c (infB)	silent (Gly186)
3155245	G	T	SNP	Rv2847c (cysG)	silent (Val209)
3183210	A	G	SNP	Rv2871 (vapB43)	Thr25Ala
3189154	T	C	SNP	Rv2878c (mpt53)	Ser82Gly
3189890	C	T	SNP	Rv2880c	silent (Pro263)
3190125	T	C	SNP	Rv2880c	Gln185Arg
3265772	C	T	SNP	Rv2934 (ppsD)	silent (Asn1175)
3266997	G	C	SNP	Rv2934 (ppsD)	Ala1584Pro
3277985	C	T	SNP	Rv2940c (mas)	silent (Ser1577)
3286017	G	A	SNP	Rv2942 (mmpL7)	silent (Leu316)
3311453	C	T	SNP	Rv2958c	Arg183His

3314986	A	C	SNP	Rv2962c	Leu46Arg
3352192	G	A	SNP	Rv2994	silent (Leu308)
3354809	G	T	SNP	Rv2996c (serA1)	silent (Arg87)
3383295	CCCG	C	DEL	Rv3024c (trmU)	
3391178	A	C	SNP	Rv3031	Glu419Asp
3429876	G	C	SNP	Rv3064c	Phe125Leu(s)
3445929	T	G	SNP	Rv3080c (pknK)	Glu20Asp
3448274	C	T	SNP	Rv3082c (virS)	silent (Gly51)
3458422	C	A	SNP	Rv3090	Pro71His
3470324	T	C	SNP	Rv3101c (ftsX)	Lys119Arg
3470377	C	T	SNP	Rv3101c (ftsX)	silent (Gln101)
3472390	C	CG	INS	Rv3104c	
3472579	C	T	SNP	Rv3104c	Ser67Asn
3487695	T	G	SNP	Rv3121 (cyp141)	Val396Gly
3517413	C	T	SNP	Rv3151 (nuoG)	Ala223Val
3534263	G	C	SNP	Rv3165c	Arg45Gly
3542535	T	G	SNP	Rv3174	Leu133Arg
3543422	G	T	SNP	Rv3175	Arg188Met(s)
3544118	G	A	SNP	Rv3175	Arg420His
3549269	G	A	SNP	Rv3180c	silent (Ala140)
3549908	C	T	SNP	Rv3181c	Trp79STOP
3587471	G	A	SNP	Rv3210c	silent (Pro23)
3587944	C	A	SNP	Rv3211 (rhlE)	Asp49Glu
3610614	G	A	SNP	Rv3234c (tgs3)	silent (Gly192)
3626467	C	T	SNP	Rv3245c (mtrB)	silent (Leu49)
3646074	G	A	SNP	Rv3265c (wbbL1)	Arg271Trp
3657771	G	A	SNP	Rv3274c (fadE25)	Leu107Leu(s)
3677203	G	A	SNP	Rv3296 (lhr)	Val(s)143Val
3680944	G	A	SNP	Rv3296 (lhr)	silent (Ala1390)
3690137	C	T	SNP	Rv3303c (lpdA)	Gly268Ser
3691767	G	T	SNP	Rv3305c (amiA1)	Leu348Met(s)
3693428	G	T	SNP	Rv3306c (amiB1)	Leu188Ile
3696316	G	T	SNP	Rv3308 (pmmB)	Val485Phe
3703264	C	G	SNP	Rv3314c (deoA)	silent (Leu68)
3712372	A	G	SNP	Rv3327	silent (Leu208)
3720181	G	A	SNP	Rv3333c	Pro201Leu
3728965	C	A	SNP	Rv3342	silent (Pro114)
3771585	G	A	SNP	Rv3359	Arg81His
3808977	G	A	SNP	Rv3393 (iunH)	Val(s)173Met(s)
3814737	C	A	SNP	Rv3397c (phyA)	Ala88Ser
3824077	CCTCG	C	DEL	Rv3404c	
3824167	G	C	SNP	Rv3404c	Arg140Gly
3828524	G	A	SNP	Rv3409c (choD)	silent (Ile68)
3832146	CTAG	C	DEL	Rv3413c	

3832701	C	T	SNP	Rv3413c	Leu(s)115Leu
3833798	C	G	SNP	Rv3415c	Gly242Arg
3866470	G	C	SNP	Rv3447c (eccC4)	Thr590Ser
3880475	G	A	SNP	Rv3462c (infA)	Pro60Leu
3883683	G	C	SNP	Rv3466	Val(s)53Val
3883686	T	G	SNP	Rv3466	silent (Gly54)
3883690	G	A	SNP	Rv3466	Ala56Thr
3883796	G	T	SNP	Rv3466	Arg91Leu
3883797	G	A	SNP	Rv3466	silent (Arg91)
3883845	T	C	SNP	Rv3466	silent (Gly107)
3883915	G	A	SNP	Rv3466	Val131Ile
3884787	A	G	SNP	Rv3467	His275Arg
3884791	C	A	SNP	Rv3467	Asn276Lys
3884906	A	G	SNP	Rv3467	Lys315Glu
3890148	C	T	SNP	Rv3473c (bpoA)	Asp196Asn
3895863	C	T	SNP	Rv3479	Ser15Leu
3912156	G	A	SNP	Rv3494c (mce4F)	Pro405Leu
3922779	G	C	SNP	Rv3504 (fadE26)	Met(s)103Ile
3951036	G	C	SNP	Rv3515c (fadD19)	Gln479Glu
3962794	C	T	SNP	Rv3526 (kshA)	Thr119Ile
3967966	C	T	SNP	Rv3531c	Glu327Lys
3975375	G	A	SNP	Rv3537 (kstD)	Val(s)3Met(s)
3977829	G	A	SNP	Rv3538	Val(s)256Val
3985572	A	G	SNP	Rv3546 (fadA5)	Ile6Val
4002212	G	A	SNP	Rv3561 (fadD3)	silent (Arg192)
4007279	T	G	SNP	Rv3565 (aspB)	silent (Gly360)
4051189	C	A	SNP	Rv3610c (ftsH)	silent (Ala565)
4052488	G	A	SNP	Rv3610c (ftsH)	silent (Phe132)
4052770	G	C	SNP	Rv3610c (ftsH)	silent (Thr38)
4060201	G	A	SNP	Rv3619c (esxV)	Ser23Leu(s)
4060210	T	A	SNP	Rv3619c (esxV)	Gln20Leu
4060230	G	A	SNP	Rv3619c (esxV)	silent (His13)
4069686	A	C	SNP	Rv3630	Gln171Pro
4077915	TG	T	DEL	Rv3639c	
4096967	T	G	SNP	Rv3659c	His343Pro
4098829	G	A	SNP	Rv3660c	Ser107Leu(s)
4102866	C	T	SNP	Rv3663c (dppD)	silent (Arg271)
4111073	T	G	SNP	Rv3669	Phe83Val
4117307	G	A	SNP	Rv3677c	Ala249Val(s)
4121388	G	A	SNP	Rv3681c (whiB4)	Ala56Val(s)
4134091	C	T	SNP	Rv3692 (moxR2)	silent (Asn192)
4148174	C	T	SNP	Rv3704c (gshA)	Ala5Thr
4148809	C	T	SNP	Rv3705c	Gly52Arg
4155266	C	G	SNP	Rv3710 (leuA)	silent (Gly509)
4159405	G	T	SNP	Rv3714c	silent (Arg139)

4162072	A	C	SNP	Rv3718c	Ser63Ala
4163589	C	T	SNP	Rv3719	silent (Ser428)
4167341	C	T	SNP	Rv3722c	Gly263Asp
4176694	G	A	SNP	Rv3728	Ala608Thr
4196855	G	A	SNP	Rv3747	Leu(s)44Leu
4200993	T	G	SNP	Rv3754 (tyrA)	silent (Ala191)
4219011	G	A	SNP	Rv3774 (echA21)	Val55Ile
4230556	T	A	SNP	Rv3784	Tyr101Asn
4232002	G	A	SNP	Rv3785	Arg228His
4238120	G	A	SNP	Rv3792 (aftA)	silent (Gln63)
4251796	G	A	SNP	Rv3797 (fadE35)	Ala238Thr
4253290	C	G	SNP	Rv3798	Pro100Ala
4254078	C	T	SNP	Rv3798	silent (Arg362)
4255634	G	A	SNP	Rv3799c (accD4)	silent (Val105)
4285318	C	T	SNP	Rv3820c (papA2)	Asp170Asn
4289444	G	A	SNP	Rv3823c (mmpL8)	Pro696Ser
4292602	G	C	SNP	Rv3824c (papA1)	silent (Thr191)
4297109	C	T	SNP	Rv3825c (pks2)	Ala833Thr
4298440	A	C	SNP	Rv3825c (pks2)	Val389Gly
4299514	C	T	SNP	Rv3825c (pks2)	Gly31Asp
4304644	G	A	SNP	Rv3829c	Ala122Val(s)
4305071	G	T	SNP	Rv3830c	silent (Leu205)
4306637	G	GC	INS	Rv3832c	
4313152	A	G	SNP	Rv3839	Thr130Ala
4313156	G	A	SNP	Rv3839	Arg131Gln
4326148	C	A	SNP	Rv3854c (ethA)	silent (Ser442)
4326439	G	T	SNP	Rv3854c (ethA)	Asn345Lys
4338203	G	A	SNP	Rv3861	
4356477	G	A	SNP	Rv3877 (eccD1)	Ala491Thr
4360524	G	C	SNP	Rv3880c (espL)	Pro8Arg
4362120	A	G	SNP	Rv3882c (eccE1)	Val(s)434Ala
4371665	A	G	SNP	Rv3887c (eccD2)	Val7Ala
4372440	TTGCCGACGGATA	T	DEL	Rv3888c	
4377097	G	T	SNP	Rv3894c (eccC2)	Ala1119Asp
4381299	G	A	SNP	Rv3895c (eccB2)	silent (Ser214)
4383908	C	T	SNP	Rv3898c	silent (Gln26)
4385821	A	G	SNP	Rv3900c	Leu163Pro
4386108	A	G	SNP	Rv3900c	silent (Ile67)
4386142	A	G	SNP	Rv3900c	Leu(s)56Ser
4386288	C	T	SNP	Rv3900c	silent (Pro7)
4386562	G	A	SNP	Rv3901c	Leu85Leu(s)
4386563	C	T	SNP	Rv3901c	silent (Lys84)
4386629	GGTCGTAGCC	G	DEL	Rv3901c	
4386702	G	C	SNP	Rv3901c	Ala38Gly
4396073	G	A	SNP	Rv3909	Ala628Thr

4399104	G	A	SNP	Rv3910	silent (Arg836)
4402412	C	G	SNP	Rv3913 (trxB2)	Arg229Gly
4407873	C	A	SNP	Rv3919c (gid)	Val(s)110Val

Table S8: SNVs and InDels recovered for the clinical strain C171111720.

Position	Reference	Sample	Type	Gene	AA Exchange
13158	C	T	SNP	Rv0010c	Gly134Asp
13275	T	C	SNP	Rv0010c	Tyr95Cys
13482	G	A	SNP	Rv0010c	Ala26Val(s)
22961	T	G	SNP	Rv0018c (pstP)	Asp74Ala
23174	C	A	SNP	Rv0018c (pstP)	Arg3Leu
38013	T	A	SNP	Rv0035 (fadD34)	Leu(s)252STOP
38332	G	T	SNP	Rv0035 (fadD34)	Glu358Asp
50557	T	C	SNP	Rv0046c (ino1)	Arg190Gly
54785	G	A	SNP	Rv0050 (ponA1)	Gly375Ser
55069	G	C	SNP	Rv0050 (ponA1)	Leu(s)469Phe
55540	G	GCCGCCGCCT	INS	Rv0050 (ponA1)	
64028	C	T	SNP	Rv0060	silent (Pro40)
64061	A	G	SNP	Rv0060	silent (Lys51)
75412	G	A	SNP	Rv0068	Gly38Ser
78868	G	A	SNP	Rv0070c (glyA2)	Ala10Val
79504	T	TCGGTGGACC	INS	Rv0071	
82897	C	T	SNP	Rv0074	silent (Gly50)
84528	T	G	SNP	Rv0075	Phe178Cys
86084	T	C	SNP	Rv0077c	His128Arg
97767	C	T	SNP	Rv0089	Pro4Ser
102166	C	T	SNP	Rv0092 (ctpA)	silent (Ser528)
102650	A	C	SNP	Rv0092 (ctpA)	Thr690Pro
103840	T	C	SNP	Rv0094c	His275Arg
103893	C	G	SNP	Rv0094c	silent (Leu257)
103896	C	G	SNP	Rv0094c	Glu256Asp
104472	T	C	SNP	Rv0094c	silent (Leu64)
104475	C	G	SNP	Rv0094c	silent (Arg63)
104478	T	C	SNP	Rv0094c	silent (Ser62)
104856	C	T	SNP	Rv0095c	silent (Leu120)
104858	G	A	SNP	Rv0095c	Leu120Leu(s)
105007	C	G	SNP	Rv0095c	Ser70Thr
105011	G	A	SNP	Rv0095c	Leu69Leu(s)
114821	C	T	SNP	Rv0101 (nrp)	silent (Asp1607)
117295	G	A	SNP	Rv0101 (nrp)	Ser2432Asn
140857	C	T	SNP	Rv0116c (ldtA)	Val(s)56Met(s)
152602	C	T	SNP	Rv0126 (treS)	silent (Asp93)
165741	C	T	SNP	Rv0138	Ala140Val(s)
166188	C	T	SNP	Rv0139	Ala121Val(s)
170642	T	G	SNP	Rv0144	Leu120Arg
181779	A	G	SNP	Rv0153c (ptbB)	silent (Val69)
191445	A	G	SNP	Rv0161	Asp280Gly
192924	C	A	SNP	Rv0162c (adhE1)	Arg71Leu

194037	A	T	SNP	Rv0164 (TB18.5)	Met(s)138Leu(s)
196391	G	A	SNP	Rv0166 (fadD5)	Glu467Lys
206481	C	G	SNP	Rv0174 (mce1F)	silent (Pro417)
206484	G	T	SNP	Rv0174 (mce1F)	silent (Gly418)
226929	C	T	SNP	Rv0194	Arg18Cys
234496	C	CGT	INS	Rv0197	
249522	T	C	SNP	Rv0209	Val(s)162Ala
250952	G	A	SNP	Rv0210	Arg278Gln
264976	C	T	SNP	Rv0221	Arg304Cys
278189	T	C	SNP	Rv0232	silent (Asp97)
280605	C	G	SNP	Rv0234c (gabD1)	Gly179Ala
281208	C	T	SNP	Rv0235c	silent (Pro469)
287052	G	C	SNP	Rv0236A	Pro7Arg
289300	C	T	SNP	Rv0239 (vapB24)	Ser66Phe
303315	C	T	SNP	Rv0252 (nirB)	silent (Ala150)
309756	C	T	SNP	Rv0257	Arg20Cys
311167	T	C	SNP	Rv0259c	silent (Ser117)
312138	C	A	SNP	Rv0260c	Val(s)174Val
313425	G	T	SNP	Rv0261c (narK3)	silent (Ile248)
314505	C	T	SNP	Rv0262c (aac)	Ser117Asn
352572	C	T	SNP	Rv0289 (espG3)	Arg142Trp
379029	G	A	SNP	Rv0310c	silent (Thr40)
381030	A	G	SNP	Rv0312	Ser159Gly
381760	C	T	SNP	Rv0312	Pro402Leu
394803	G	A	SNP	Rv0329c	Pro173Leu
406389	G	A	SNP	Rv0339c	Ala687Val(s)
423334	G	A	SNP	Rv0352 (dnaJ1)	Asp295Asn
436382	C	A	SNP	Rv0357c (purA)	Gly130Cys
457437	C	T	SNP	Rv0381c	silent (Leu129)
464914	G	A	SNP	Rv0386	Glu502Lys
466372	G	A	SNP	Rv0386	Glu988Lys
485631	C	T	SNP	Rv0404 (fadD30)	Pro552Leu
520400	T	G	SNP	Rv0433	Phe26Cys
529363	C	T	SNP	Rv0440 (groEL2)	silent (Val252)
549747	G	A	SNP	Rv0458	Gly25Arg
590463	G	A	SNP	Rv0500 (proC)	silent (Pro127)
608777	A	C	SNP	Rv0517	Gln11Pro
636783	C	T	SNP	Rv0545c (pitA)	Val(s)227Val
641416	C	T	SNP	Rv0551c (fadD8)	Val(s)466Met(s)
641642	G	A	SNP	Rv0551c (fadD8)	silent (Val390)
643666	T	C	SNP	Rv0552	Cys260Arg
659165	C	T	SNP	Rv0567	Ala282Val(s)
660465	C	T	SNP	Rv0568 (cyp135B1)	Ala339Val
667468	C	T	SNP	Rv0574c	silent (Leu309)
701867	C	T	SNP	Rv0605	silent (Asp154)

705570	C	T	SNP	Rv0610c	Val114Ile
725900	G	C	SNP	Rv0631c (recC)	Leu803Val
745876	C	G	SNP	Rv0648	Ala1053Gly
754321	G	T	SNP	Rv0658c	Ala30Asp
754974	C	T	SNP	Rv0659c (mazF2)	Trp7STOP
765171	C	T	SNP	Rv0668 (rpoC)	Pro601Leu
771950	C	T	SNP	Rv0672 (fadE8)	Thr156Ile
784450	C	T	SNP	Rv0684 (fusA1)	Leu656Leu(s)
788354	C	A	SNP	Rv0688	silent (Arg139)
808435	C	T	SNP	Rv0711 (atsA)	His701Tyr
816151	G	A	SNP	Rv0724 (sppA)	silent (Ser163)
818061	C	T	SNP	Rv0725c	silent (Glu128)
819110	C	T	SNP	Rv0726c	silent (Ala177)
825925	A	G	SNP	Rv0732 (secY)	Ile376Val
832246	A	G	SNP	Rv0740	silent (Gln157)
842111	C	G	SNP	Rv0750	Leu27Val(s)
842176	C	T	SNP	Rv0750	silent (Asp48)
842221	A	G	SNP	Rv0750	silent (Gln63)
861091	G	A	SNP	Rv0768 (aldA)	silent (Ser60)
867296	C	T	SNP	Rv0773c (ggtA)	Asp32Asn
869123	A	C	SNP	Rv0776c	Val(s)214Gly
870112	C	T	SNP	Rv0777 (purB)	silent (Ala35)
872113	C	T	SNP	Rv0778 (cyp126)	Ala228Val
880482	C	T	SNP	Rv0785	silent (Arg381)
891404	C	T	SNP	Rv0797	silent (His339)
892650	G	A	SNP	Rv0799c	silent (Asp208)
899590	G	C	SNP	Rv0805	Val254Leu
902521	C	T	SNP	Rv0808 (purF)	silent (Asn137)
903183	A	G	SNP	Rv0808 (purF)	Gln358Arg
912824	G	A	SNP	Rv0820 (phoT)	silent (Thr33)
913431	A	C	SNP	Rv0820 (phoT)	Ser236Arg
939068	C	T	SNP	Rv0842	silent (Arg319)
953002	T	G	SNP	Rv0856	Trp60Gly
972653	G	A	SNP	Rv0874c	Pro352Ser
983864	T	C	SNP	Rv0886 (fprB)	Val(s)21Ala
988157	G	A	SNP	Rv0888	Glu309Lys
1016131	C	A	SNP	Rv0911	Pro245Gln
1019099	G	A	SNP	Rv0914c	silent (Asp289)
1035797	T	G	SNP	Rv0928 (pstS3)	Phe299Val
1039981	T	C	SNP	Rv0932c (pstS2)	silent (Lys356)
1040706	A	C	SNP	Rv0932c (pstS2)	Ser115Ala
1045945	C	G	SNP	Rv0937c (mku)	Asp26His
1046801	G	A	SNP	Rv0938 (ligD)	silent (Gly222)
1075618	G	A	SNP	Rv0963c	silent (Ser160)
1082433	G	A	SNP	Rv0971c (echA7)	Ala51Val(s)

1103995	C	T	SNP	Rv0987	Thr485Ile
1120052	A	G	SNP	Rv1003	Thr11Ala
1121071	G	A	SNP	Rv1004c	Leu360Leu(s)
1151163	A	C	SNP	Rv1028c (kdpD)	Val175Gly
1153635	C	T	SNP	Rv1029 (kdpA)	Leu542Leu(s)
1156144	G	T	SNP	Rv1031 (kdpC)	Val98Phe
1160770	T	A	SNP	Rv1037c (esxI)	Gln20Leu
1170422	T	TGG	INS	Rv1047	
1207038	G	A	SNP	Rv1082 (mca)	silent (Lys173)
1214292	G	T	SNP	Rv1087A	Gly85Trp
1239434	G	A	SNP	Rv1113 (vapB32)	Val7Ile
1244477	G	A	SNP	Rv1121 (zwf1)	silent (Lys257)
1247003	G	GC	INS	Rv1123c (bpoB)	
1247753	GC	G	DEL	Rv1124 (ephC)	
1252538	G	A	SNP	Rv1128c	silent (Asp145)
1261056	C	T	SNP	Rv1133c (metE)	silent (Gly97)
1298540	G	A	SNP	Rv1167c	silent (Gly51)
1301086	C	A	SNP	Rv1170 (mshB)	Asn261Lys
1342468	C	T	SNP	Rv1199c	silent (Gly46)
1357881	G	A	SNP	Rv1215c	Pro522Ser
1366473	G	A	SNP	Rv1223 (htrA)	Arg200His
1399129	C	T	SNP	Rv1251c	Ala38Thr
1412686	G	A	SNP	Rv1264	Asp265Asn
1414564	A	T	SNP	Rv1266c (pknH)	Ile426Asn
1414653	C	T	SNP	Rv1266c (pknH)	silent (Pro396)
1415097	C	G	SNP	Rv1266c (pknH)	silent (Ala248)
1416222	A	G	SNP	Rv1267c (embR)	Phe376Leu
1416232	A	G	SNP	Rv1267c (embR)	silent (Cys372)
1416234	A	C	SNP	Rv1267c (embR)	Cys372Gly
1420533	T	C	SNP	Rv1272c	silent (Arg591)
1438115	G	A	SNP	Rv1285 (cysD)	silent (Gly69)
1443606	G	C	SNP	Rv1290c	Ala481Gly
1452825	A	G	SNP	Rv1296 (thrB)	Ser277Gly
1465502	G	A	SNP	Rv1309 (atpG)	Val(s)207Met(s)
1468389	C	T	SNP	Rv1313c	Ala373Thr
1468420	G	A	SNP	Rv1313c	silent (Arg362)
1474709	G	T	SNP	Rvnr02	rRNA
1499293	C	T	SNP	Rv1330c (pncB1)	Gly423Arg
1500728	T	C	SNP	Rv1331	Val(s)23Ala
1527802	C	T	SNP	Rv1358	silent (Arg397)
1545119	C	T	SNP	Rv1372	Pro99Ser
1545195	C	T	SNP	Rv1372	Ala124Val
1550719	C	T	SNP	Rv1377c	Glu167Lys
1571938	G	T	SNP	Rv1395	Val(s)298Leu(s)
1586534	C	A	SNP	Rv1410c	silent (Ala411)

1608286	G	A	SNP	Rv1431	silent (Leu68)
1610076	C	T	SNP	Rv1432	silent (Tyr76)
1612579	C	A	SNP	Rv1435c	silent (Pro124)
1612582	T	G	SNP	Rv1435c	silent (Ile123)
1612621	C	A	SNP	Rv1435c	silent (Pro110)
1612648	T	C	SNP	Rv1435c	silent (Pro101)
1647830	G	A	SNP	Rv1461	Gly281Asp
1658830	C	T	SNP	Rv1469 (ctpD)	Pro623Leu
1700415	C	CGGG	INS	Rv1509	
1710356	C	A	SNP	Rv1518	Thr238Lys
1712967	G	A	SNP	Rv1521 (fadD25)	silent (Pro222)
1748854	C	T	SNP	Rv1547 (dnaE1)	silent (Gly387)
1750150	C	T	SNP	Rv1547 (dnaE1)	silent (Asp819)
1769780	C	T	SNP	Rv1564c (treX)	Asp608Asn
1778243	G	T	SNP	Rv1570 (bioD)	Val129Phe
1789446	C	T	SNP	Rv1588c	Val131Ile
1789516	A	G	SNP	Rv1588c	silent (Gly107)
1789564	C	T	SNP	Rv1588c	silent (Arg91)
1789565	C	A	SNP	Rv1588c	Arg91Leu
1789573	G	T	SNP	Rv1588c	Asp88Glu
1789697	A	G	SNP	Rv1588c	Val(s)47Ala
1789756	A	G	SNP	Rv1588c	silent (Ser27)
1789795	A	G	SNP	Rv1588c	silent (Asp14)
1789798	A	G	SNP	Rv1588c	silent (Phe13)
1790620	G	A	SNP	Rv1589 (bioB)	Val113Ile
1790832	C	T	SNP	Rv1589 (bioB)	silent (Asn183)
1802084	G	A	SNP	Rv1601 (hisB)	Arg17Gln
1814135	A	G	SNP	Rv1614 (lgt)	Glu322Gly
1820542	C	T	SNP	Rv1620c (cydC)	silent (Leu384)
1823768	C	G	SNP	Rv1622c (cydB)	silent (Leu211)
1832495	C	T	SNP	Rv1629 (polA)	Arg611Trp
1832738	C	T	SNP	Rv1629 (polA)	Leu692Leu(s)
1834319	G	A	SNP	Rv1630 (rpsA)	Val260Ile
1839306	A	G	SNP	Rv1634	Ile47Val
1854045	A	G	SNP	Rv1644 (tsnR)	Tyr147Cys
1874710	G	A	SNP	Rv1660 (pks10)	Gly184Asp
1885772	G	A	SNP	Rv1662 (pks8)	Ala1357Thr
1886263	C	G	SNP	Rv1662 (pks8)	His1520Gln
1887313	C	T	SNP	Rv1663 (pks17)	Gln268STOP
1890565	A	G	SNP	Rv1664 (pks9)	Asp847Gly
1919945	C	T	SNP	Rv1696 (recN)	Ser88Leu(s)
1924765	T	C	SNP	Rv1699 (pyrG)	silent (Leu313)
1924874	G	C	SNP	Rv1699 (pyrG)	Ser349Thr
1943535	G	T	SNP	Rv1715 (fadB3)	Ala293Ser
1943723	C	T	SNP	Rv1716	Leu50Leu(s)

1947176	G	A	SNP	Rv1720c (vapC12)	Arg82Cys
1947370	G	T	SNP	Rv1720c (vapC12)	Pro17Gln
1950651	T	C	SNP	Rv1724c	Asp134Gly
1989370	C	T	SNP	Rv1758 (cut1)	Pro110Leu
1990256	T	G	SNP	Rv1759c (wag22)	silent (Ser774)
1992323	GC	G	DEL	Rv1759c (wag22)	
1993808	A	T	SNP	Rv1760	Glu219Val(s)
1995579	A	G	SNP	Rv1762c	silent (Asp88)
2004981	C	T	SNP	Rv1770	silent (Asn368)
2005532	C	A	SNP	Rv1771	silent (Thr124)
2015767	C	T	SNP	Rv1781c (malQ)	silent (Glu570)
2037321	G	A	SNP	Rv1798 (eccA5)	Glu208Lys
2058160	T	A	SNP	Rv1815	silent (Val211)
2063106	C	T	SNP	Rv1819c (bacA)	silent (Leu541)
2073192	G	A	SNP	Rv1828	Ala38Thr
2078024	G	A	SNP	Rv1832 (gcvB)	silent (Pro716)
2083610	G	C	SNP	Rv1836c	Leu343Val
2085142	C	A	SNP	Rv1837c (glcB)	Asp614Tyr
2086411	T	C	SNP	Rv1837c (glcB)	Thr191Ala
2091783	C	G	SNP	Rv1842c	silent (Arg101)
2110526	G	A	SNP	Rv1862 (adhA)	Arg328His
2114734	G	A	SNP	Rv1866	Arg532Gln
2116651	G	A	SNP	Rv1867	silent (Arg296)
2118897	C	T	SNP	Rv1868	silent (Ala517)
2120953	C	G	SNP	Rv1870c	Glu160Gln
2122826	G	A	SNP	Rv1872c (lldD2)	Thr109Ile
2124766	C	T	SNP	Rv1875	Ala129Val(s)
2131605	C	T	SNP	Rv1880c (cyp140)	Glu85Lys
2132666	G	A	SNP	Rv1882c	Pro180Ser
2139149	A	C	SNP	Rv1890c	Leu180Arg
2157925	CAGCGCCACTACG	C	DEL	Rv1911c (lppC)	
2160943	C	T	SNP	Rv1915 (aceAa)	Gln161STOP
2179068	G	T	SNP	Rv1926c (mpt63)	silent (Ile123)
2183221	G	A	SNP	Rv1931c	Pro7Ser
2195727	C	T	SNP	Rv1944c	Gly70Ser
2197065	C	G	SNP	Rv1945	silent (Ala359)
2202939	A	C	SNP	Rv1957	Asp119Ala
2215500	C	T	SNP	Rv1971 (mce3F)	Gln82STOP
2221558	C	G	SNP	Rv1978	silent (Gly217)
2224862	G	A	SNP	Rv1981c (nrdF1)	silent (Ser109)
2237466	C	T	SNP	Rv1993c	Arg37His
2251818	G	A	SNP	Rv2005c	silent (Ala22)
2257079	C	T	SNP	Rv2008c	silent (Gln288)
2272743	G	A	SNP	Rv2026c	Ser2Phe
2323114	G	A	SNP	Rv2065 (cobH)	Gly188Asp

2341636	C	G	SNP	Rv2083	Leu256Val(s)
2342403	C	G	SNP	Rv2084	Ala199Gly
2343595	G	A	SNP	Rv2086	silent (Arg95)
2344950	G	A	SNP	Rv2088 (pknJ)	Leu(s)180Leu
2349634	C	T	SNP	Rv2092c (helY)	silent (Thr807)
2351735	A	G	SNP	Rv2092c (helY)	Met(s)107Thr
2373280	C	T	SNP	Rv2113	silent (Ala217)
2388650	G	T	SNP	Rv2127 (ansP1)	Gly12Val
2390900	G	A	SNP	Rv2129c	Ser97Phe
2393567	G	A	SNP	Rv2132	Asp53Asn
2439519	G	A	SNP	Rv2177c	silent (Arg143)
2468471	G	T	SNP	Rv2203	Val81Leu
2472294	T	G	SNP	Rv2207 (cobT)	Leu295Arg
2478018	G	A	SNP	Rv2212	Val277Ile
2517610	G	A	SNP	Rv2243 (fabD)	Ser275Asn
2521690	G	T	SNP	Rv2247 (accD6)	silent (Pro316)
2522084	G	A	SNP	Rv2247 (accD6)	Ala448Thr
2535073	C	T	SNP	Rv2262c	silent (Ala160)
2536626	G	A	SNP	Rv2264c	silent (Pro575)
2542820	C	CG	INS	Rv2268c (cyp128)	
2551569	A	C	SNP	Rv2280	Met(s)4Leu
2574591	A	C	SNP	Rv2303c	silent (Arg143)
2576255	G	A	SNP	Rv2305	silent (Glu149)
2584179	A	C	SNP	Rv2311	Asp99Ala
2586613	G	A	SNP	Rv2314c	silent (Ile226)
2593192	G	A	SNP	Rv2320c (rocE)	Ala321Val(s)
2597869	C	T	SNP	Rv2326c	silent (Ala693)
2608240	C	A	SNP	Rv2333c (stp)	Val(s)28Leu(s)
2630158	C	G	SNP	Rv2350c (plcB)	silent (Arg54)
2630161	A	G	SNP	Rv2350c (plcB)	silent (Asn53)
2630173	C	G	SNP	Rv2350c (plcB)	Leu(s)49Phe
2630176	C	G	SNP	Rv2350c (plcB)	Leu(s)48Phe
2630182	G	A	SNP	Rv2350c (plcB)	silent (Ile46)
2630184	T	A	SNP	Rv2350c (plcB)	Ile46Phe
2630188	C	T	SNP	Rv2350c (plcB)	silent (Glu44)
2631565	T	C	SNP	Rv2351c (plcA)	Ile171Val
2631574	T	C	SNP	Rv2351c (plcA)	Thr168Ala
2631583	G	A	SNP	Rv2351c (plcA)	Leu165Leu(s)
2631599	G	A	SNP	Rv2351c (plcA)	silent (Ile159)
2631620	A	G	SNP	Rv2351c (plcA)	silent (Gly152)
2631641	T	G	SNP	Rv2351c (plcA)	silent (Pro145)
2631971	A	G	SNP	Rv2351c (plcA)	silent (Pro35)
2641300	G	A	SNP	Rv2358 (smtB)	Glu19Lys
2647429	G	A	SNP	Rv2366c	silent (Val313)
2651132	A	G	SNP	Rv2370c	Phe143Leu

2660237	T	C	SNP	Rv2379c (mbtF)	Ile617Val
2677910	G	A	SNP	Rv2385 (mbtJ)	Gly61Glu
2717684	A	G	SNP	Rv2419c (gpgP)	Val39Ala
2721114	G	A	SNP	Rv2424c	His222Tyr
2724547	G	A	SNP	Rv2427c (proA)	Leu311Leu(s)
2730008	G	T	SNP	Rv2434c	Pro185Thr
2731403	T	G	SNP	Rv2435c	silent (Thr449)
2741980	G	A	SNP	Rv2443 (dctA)	silent (Leu424)
2751072	G	T	SNP	Rv2449c	silent (Thr167)
2772689	C	A	SNP	Rv2469c	Arg116Leu
2772960	G	A	SNP	Rv2469c	Leu26Leu(s)
2774932	G	A	SNP	Rv2471 (aglA)	Ala457Thr
2801019	C	T	SNP	Rv2489c	Asp43Asn
2818619	C	T	SNP	Rv2503c (scoB)	Cys170Tyr
2829779	T	C	SNP	Rv2512c	Thr9Ala
2866551	C	G	SNP	Rv2543 (lppA)	silent (Ala28)
2866569	C	A	SNP	Rv2543 (lppA)	silent (Thr34)
2866578	C	A	SNP	Rv2543 (lppA)	His37Gln
2866580	A	G	SNP	Rv2543 (lppA)	Asn38Ser
2866607	G	A	SNP	Rv2543 (lppA)	Gly47Asp
2866647	G	A	SNP	Rv2543 (lppA)	silent (Lys60)
2866671	G	A	SNP	Rv2543 (lppA)	silent (Glu68)
2866677	A	C	SNP	Rv2543 (lppA)	silent (Leu70)
2866863	C	G	SNP	Rv2543 (lppA)	silent (Ala132)
2866876	A	G	SNP	Rv2543 (lppA)	Ile137Val
2866880	C	T	SNP	Rv2543 (lppA)	Ala138Val
2866882	G	A	SNP	Rv2543 (lppA)	Ala139Thr
2867207	C	G	SNP	Rv2544 (lppB)	silent (Ala28)
2867230	G	A	SNP	Rv2544 (lppB)	Gly36Asp
2867231	C	T	SNP	Rv2544 (lppB)	silent (Gly36)
2867236	A	G	SNP	Rv2544 (lppB)	Asn38Ser
2867240	C	T	SNP	Rv2544 (lppB)	silent (Pro39)
2867245	A	C	SNP	Rv2544 (lppB)	Lys41Thr
2867298	C	A	SNP	Rv2544 (lppB)	His59Asn
2867347	A	G	SNP	Rv2544 (lppB)	Gln75Arg
2873093	G	GCCA	INS	Rv2553c	
2899018	C	CG	INS	Rv2574	
2907840	T	G	SNP	Rv2583c (relA)	Thr787Pro
2913880	G	A	SNP	Rv2586c (secF)	silent (His44)
2925594	G	A	SNP	Rv2595 (vapB40)	Asp35Asn
2983095	A	G	SNP	Rv2666	Thr9Ala
2989683	C	T	SNP	Rv2673 (aftC)	silent (Ala131)
3021283	G	A	SNP	Rv2707	silent (Arg237)
3023936	C	T	SNP	Rv2711 (ideR)	silent (Thr124)
3026249	G	A	SNP	Rv2713 (sthA)	Arg270His

3030146	G	A	SNP	Rv2717c	silent (Arg72)
3040078	C	T	SNP	Rv2727c (miaA)	Arg231His
3041822	C	G	SNP	Rv2729c	Gln218His
3043341	C	T	SNP	Rv2731	Arg106Trp
3064632	G	A	SNP	Rv2752c	silent (Ala520)
3068518	G	C	SNP	Rv2756c (hsdM)	Phe522Leu(s)
3091467	G	C	SNP	Rv2783c (gpsI)	silent (Gly377)
3097924	C	A	SNP	Rv2789c (fadE21)	Ala339Ser
3135912	G	C	SNP	Rv2828c	Thr141Arg
3137815	C	G	SNP	Rv2831 (echA16)	Ala182Gly
3138245	G	A	SNP	Rv2832c (ugpC)	Gln313STOP
3148146	C	A	SNP	Rv2840c	Ser38Ile
3154090	G	C	SNP	Rv2846c (efpA)	Ala181Gly
3166206	C	A	SNP	Rv2855 (mtr)	silent (Thr334)
3207495	C	A	SNP	Rv2897c	Val(s)150Leu(s)
3220545	C	T	SNP	Rv2913c	Trp385STOP
3221093	C	T	SNP	Rv2913c	silent (Glu202)
3237674	C	T	SNP	Rv2922c (smc)	Ala45Thr
3260430	C	T	SNP	Rv2933 (ppsC)	silent (Thr1582)
3260844	C	T	SNP	Rv2933 (ppsC)	silent (Leu1720)
3265787	A	G	SNP	Rv2934 (ppsD)	Ile1180Met(s)
3266874	C	T	SNP	Rv2934 (ppsD)	Arg1543Trp
3297797	T	G	SNP	Rv2947c (pks15)	Gln15Pro
3314243	G	A	SNP	Rv2962c	Gln294STOP
3327780	C	T	SNP	Rv2973c (recG)	Ala723Thr
3330725	C	T	SNP	Rv2974c	Ala213Thr
3330952	T	G	SNP	Rv2974c	Gln137Pro
3333609	G	A	SNP	Rv2977c (thiL)	silent (Asp60)
3346309	G	C	SNP	Rv2989	Gly55Arg
3347293	C	T	SNP	Rv2990c	Glu143Lys
3350883	C	G	SNP	Rv2993c	Val(s)37Val
3351757	CG	C	DEL	Rv2994	
3353493	T	C	SNP	Rv2996c (serA1)	Asp526Gly
3378828	C	A	SNP	Rv3019c (esxR)	Trp58Cys
3385542	C	G	SNP	Rv3026c	Arg179Pro
3392523	G	A	SNP	Rv3032	silent (Ala330)
3397850	G	GT	INS	Rv3037c	
3403250	C	T	SNP	Rv3043c (ctaD)	Ala558Thr
3417922	C	T	SNP	Rv3057c	silent (Leu247)
3451002	A	G	SNP	Rv3085	Glu28Gly
3459853	C	A	SNP	Rv3091	silent (Ile246)
3471796	G	A	SNP	Rv3103c	Arg19Cys
3477663	G	A	SNP	Rv3109 (moaA1)	silent (Thr5)
3481663	T	C	SNP	Rv3115	silent (Arg71)
3496264	C	T	SNP	Rv3130c (tgs1)	Ala35Thr

3497863	G	A	SNP	Rv3132c (devS)	Ala468Val
3505170	G	A	SNP	Rv3138 (pflA)	Glu326Lys
3507700	A	C	SNP	Rv3140 (fadE23)	Glu304Ala
3562702	G	A	SNP	Rv3193c	silent (Leu157)
3577327	C	T	SNP	Rv3202c	silent (Gln958)
3578983	A	C	SNP	Rv3202c	silent (Ala406)
3614840	G	A	SNP	Rv3239c	Pro922Ser
3615362	TGGC	T	DEL	Rv3239c	
3617763	ACCGGCCGGCACT	A	DEL	Rv3240c (secA1)	
3622969	C	T	SNP	Rv3243c	silent (Ala41)
3629776	A	G	SNP	Rv3249c	silent (Arg204)
3639650	C	A	SNP	Rv3259	silent (Arg76)
3650996	T	C	SNP	Rv3270 (ctpC)	silent (Asp157)
3656101	G	A	SNP	Rv3273	Ala489Thr
3657710	C	G	SNP	Rv3274c (fadE25)	Gly127Ala
3683282	C	T	SNP	Rv3299c (atsB)	silent (Glu894)
3718871	C	G	SNP	Rv3332 (nagA)	Leu93Val(s)
3724392	G	A	SNP	Rv3338	silent (Arg163)
3769709	A	G	SNP	Rv3355c	silent (Ala33)
3769710	G	A	SNP	Rv3355c	Ala33Val
3774077	T	A	SNP	Rv3362c	Thr27Ser
3784710	G	A	SNP	Rv3370c (dnaE2)	His11Tyr
3789276	C	A	SNP	Rv3375 (amiD)	Ala219Glu
3801091	C	T	SNP	Rv3387	silent (Pro102)
3811007	C	A	SNP	Rv3394c	Val(s)7Leu(s)
3813364	C	T	SNP	Rv3396c (guaA)	Ala239Thr
3815268	G	A	SNP	Rv3398c (idsA1)	Ser280Leu(s)
3839512	T	C	SNP	Rv3421c	silent (Thr61)
3883605	T	C	SNP	Rv3466	silent (Ser27)
3883664	T	C	SNP	Rv3466	Val(s)47Ala
3883788	C	A	SNP	Rv3466	Asp88Glu
3883796	G	T	SNP	Rv3466	Arg91Leu
3883797	G	A	SNP	Rv3466	silent (Arg91)
3883845	T	C	SNP	Rv3466	silent (Gly107)
3883915	G	A	SNP	Rv3466	Val131Ile
3889041	G	A	SNP	Rv3471c	Gln101STOP
3889517	G	A	SNP	Rv3472	silent (Gly52)
3902763	G	A	SNP	Rv3483c	Ser17Phe
3938875	T	C	SNP	Rv3510c	Tyr128Cys
3951036	G	C	SNP	Rv3515c (fadD19)	Gln479Glu
3961802	A	G	SNP	Rv3525c	STOP175Gln
3962090	T	C	SNP	Rv3525c	Thr79Ala
3967223	G	A	SNP	Rv3530c	His200Tyr
3982711	C	T	SNP	Rv3543c (fadE29)	Asp144Asn
3994624	G	A	SNP	Rv3554 (fdxB)	Gly647Asp

4004698	C	T	SNP	Rv3563 (fadE32)	silent (Ala136)
4024967	C	G	SNP	Rv3582c (ispD)	Val(s)25Leu
4027506	T	G	SNP	Rv3585 (radA)	Tyr355Asp
4054364	C	T	SNP	Rv3614c (espD)	silent (Leu111)
4055803	G	A	SNP	Rv3616c (espA)	silent (Gly191)
4059715	G	A	SNP	Rv3618	Glu340Lys
4060201	G	A	SNP	Rv3619c (esxV)	Ser23Leu(s)
4060210	T	A	SNP	Rv3619c (esxV)	Gln20Leu
4060230	G	A	SNP	Rv3619c (esxV)	silent (His13)
4072697	G	A	SNP	Rv3634c (galE1)	silent (Val305)
4108131	G	A	SNP	Rv3667 (acs)	Ala114Thr
4130537	G	T	SNP	Rv3689	Ala61Ser
4134588	G	A	SNP	Rv3692 (moxR2)	Arg358His
4155266	C	G	SNP	Rv3710 (leuA)	silent (Gly509)
4176775	C	T	SNP	Rv3728	Leu635Phe
4177882	C	A	SNP	Rv3728	Leu1004Met(s)
4182492	G	A	SNP	Rv3731 (ligC)	silent (Ala245)
4183957	G	A	SNP	Rv3732	Val342Ile
4184811	C	T	SNP	Rv3734c (tgs2)	silent (Ala360)
4185020	C	T	SNP	Rv3734c (tgs2)	Val(s)291Met(s)
4193625	G	A	SNP	Rv3743c (ctpJ)	silent (Thr583)
4195004	C	A	SNP	Rv3743c (ctpJ)	Val124Leu
4216522	G	C	SNP	Rv3771c	Ala70Gly
4218940	G	T	SNP	Rv3774 (echA21)	Gly31Val(s)
4222852	G	C	SNP	Rv3777	silent (Pro53)
4224444	T	G	SNP	Rv3778c	Glu151Ala
4225363	A	G	SNP	Rv3779	Ile127Val
4230025	G	A	SNP	Rv3783 (rfbD)	Val(s)256Val
4234844	T	C	SNP	Rv3788	Leu(s)22Ser
4243848	G	A	SNP	Rv3794 (embA)	Val(s)206Met(s)
4244096	C	T	SNP	Rv3794 (embA)	silent (Gly288)
4254078	C	T	SNP	Rv3798	silent (Arg362)
4254265	A	G	SNP	Rv3798	Thr425Ala
4255571	C	T	SNP	Rv3799c (accD4)	silent (Pro126)
4256860	G	C	SNP	Rv3800c (pks13)	Asp1429Glu
4260952	T	G	SNP	Rv3800c (pks13)	silent (Ile65)
4261908	C	T	SNP	Rv3801c (fadD32)	Ala387Thr
4275218	G	A	SNP	Rv3811	Gly141Arg
4281959	T	G	SNP	Rv3817	Trp105Gly
4286156	T	C	SNP	Rv3821	Leu(s)62Leu
4300694	A	G	SNP	Rv3826 (fadD23)	Thr295Ala
4301940	G	A	SNP	Rv3827c	Leu284Leu(s)
4303318	G	A	SNP	Rv3828c	Ala27Val(s)
4312034	G	T	SNP	Rv3838c (pheA)	silent (Pro212)
4314216	G	A	SNP	Rv3841 (bfrB)	silent (Ala13)

4333222	G	A	SNP	Rv3859c (gltB)	His954Tyr
4338242	G	C	SNP	Rv3861	
4345427	T	C	SNP	Rv3869 (eccB1)	Ile130Thr
4355917	T	C	SNP	Rv3877 (eccD1)	Val304Ala
4356054	G	A	SNP	Rv3877 (eccD1)	Val(s)350Met(s)
4356864	C	CTG	INS	Rv3878 (espJ)	
4359177	T	TCCCCGGTGTG	INS	Rv3879c (espK)	
4364138	A	G	SNP	Rv3883c (mycP1)	Val(s)207Ala
4364375	A	C	SNP	Rv3883c (mycP1)	Ile128Ser
4369848	G	A	SNP	Rv3886c (mycP2)	Pro108Leu
4372653	G	A	SNP	Rv3888c	silent (Arg18)
4379919	C	T	SNP	Rv3894c (eccC2)	silent (Pro178)
4386034	T	C	SNP	Rv3900c	Asn92Ser
4386108	A	G	SNP	Rv3900c	silent (Ile67)
4386142	A	G	SNP	Rv3900c	Leu(s)56Ser
4386288	C	T	SNP	Rv3900c	silent (Pro7)
4386562	G	A	SNP	Rv3901c	Leu85Leu(s)
4386563	C	T	SNP	Rv3901c	silent (Lys84)
4386629	GGTCGTAGCC	G	DEL	Rv3901c	
4386702	G	C	SNP	Rv3901c	Ala38Gly
4404247	G	A	SNP	Rv3915	silent (Leu352)
4407106	C	T	SNP	Rv3918c (parA)	silent (Ser142)
4407873	C	A	SNP	Rv3919c (gid)	Val(s)110Val
4409660	C	A	SNP	Rv3921c	Gly137Val
4409880	G	A	SNP	Rv3921c	Arg64Cys
4410487	G	A	SNP	Rv3923c (mpA)	silent (Val101)

Table S9: SNVs and InDels recovered for the clinical strain C2105082467.

Position	Reference	Sample	Type	Region	AA Exchange
9260	G	C	SNP	Rv0006 (gyrA)	silent (Leu653)
13175	A	G	SNP	Rv0010c	silent (Asp128)
15088	C	T	SNP	Rv0013 (trpG)	Pro59Ser
16526	C	T	SNP	Rv0014c (pknB)	silent (Gln315)
22961	T	G	SNP	Rv0018c (pstP)	Asp74Ala
23174	C	A	SNP	Rv0018c (pstP)	Arg3Leu
27199	G	A	SNP	Rv0022c (whiB5)	Gln82STOP
28910	T	C	SNP	Rv0024	silent (Arg183)
34926	A	AGGCAAAGG	INS	Rv0032 (bioF2)	
39623	C	G	SNP	Rv0036c	Met(s)69Ile
41151	C	A	SNP	Rv0037c	Ala18Ser
46588	C	T	SNP	Rv0042c	Arg207Gln
46735	G	A	SNP	Rv0042c	Ala158Val
47524	C	T	SNP	Rv0043c	Ala193Thr
55540	G	GCCGCCGCCT	INS	Rv0050 (ponA1)	
59896	AT	A	DEL	Rv0057	
64028	C	T	SNP	Rv0060	silent (Pro40)
76013	TG	T	DEL	Rv0068	
83343	C	T	SNP	Rv0074	Pro199Leu
86777	T	G	SNP	Rv0078	Ser84Ala
103836	G	T	SNP	Rv0094c	Asn276Lys
103840	T	C	SNP	Rv0094c	His275Arg
104472	T	C	SNP	Rv0094c	silent (Leu64)
104475	C	G	SNP	Rv0094c	silent (Arg63)
104478	T	C	SNP	Rv0094c	silent (Ser62)
126853	G	A	SNP	Rv0107c (ctpI)	Ala1230Val(s)
137673	G	A	SNP	Rv0113 (gmhA)	Ala119Thr
141007	G	T	SNP	Rv0116c (ldtA)	Arg6Ser
144433	C	G	SNP	Rv0119 (fadD7)	Pro129Ala
144434	C	T	SNP	Rv0119 (fadD7)	Pro129Leu
147970	C	T	SNP	Rv0121c	Val125Ile
170523	TC	T	DEL	Rv0144	
173053	G	A	SNP	Rv0146	silent (Glu281)
194040	C	A	SNP	Rv0164 (TB18.5)	Leu139Met(s)
200379	C	T	SNP	Rv0170 (mce1B)	Ala162Val
206481	C	G	SNP	Rv0174 (mce1F)	silent (Pro417)
206484	G	T	SNP	Rv0174 (mce1F)	silent (Gly418)
225315	G	A	SNP	Rv0193c	silent (Pro419)
234496	C	CGT	INS	Rv0197	
235681	G	A	SNP	Rv0198c (zmp1)	Ala276Val(s)
242268	C	G	SNP	Rv0204c	Gly316Ala
257301	CCGTCGGCGA	C	DEL	Rv0214 (fadD4)	
263057	T	G	SNP	Rv0220 (lipC)	silent (Arg82)
271707	T	G	SNP	Rv0227c	Glu378Ala
273568	G	T	SNP	Rv0228	Ala172Ser
281454	C	A	SNP	Rv0235c	silent (Arg387)
282604	A	T	SNP	Rv0235c	Phe4Tyr
291977	G	A	SNP	Rv0242c (fabG4)	Pro18Leu

294170	G	A	SNP	Rv0244c (fadE5)	silent (Gly488)
297396	G	A	SNP	Rv0246	silent (Ser196)
303414	C	T	SNP	Rv0252 (nirB)	silent (Phe183)
351875	G	A	SNP	Rv0288 (esxH)	Ala10Thr
381030	A	G	SNP	Rv0312	Ser159Gly
382822	G	A	SNP	Rv0313	silent (Leu111)
406023	G	C	SNP	Rv0339c	Ser809Cys
406599	G	A	SNP	Rv0339c	Ser617Leu(s)
416475	C	CA	INS	Rv0346c (ansP2)	
440510	G	T	SNP	Rv0362 (mgtE)	Val214Phe
442988	G	A	SNP	Rv0364	silent (Leu198)
445400	C	T	SNP	Rv0368c	Ala376Thr
446747	C	T	SNP	Rv0369c	Val(s)100Val
449434	G	A	SNP	Rv0373c	silent (Ala790)
451029	C	A	SNP	Rv0373c	Asp259Tyr
453659	C	A	SNP	Rv0376c	silent (Thr238)
456487	C	A	SNP	Rv0380c	silent (Pro111)
456546	C	T	SNP	Rv0380c	Gly92Arg
460206	G	A	SNP	Rv0384c (clpB)	silent (Pro599)
466848	TGGCAGCCGG	T	DEL	Rv0387c	
495198	A	G	SNP	Rv0410c (pknG)	Phe706Ser
508392	A	G	SNP	Rv0422c (thiD)	Val55Ala
508435	C	T	SNP	Rv0422c (thiD)	Val41Ile
527050	G	A	SNP	Rv0438c (moeA2)	Thr104Ile
528781	G	A	SNP	Rv0440 (groEL2)	silent (Glu58)
534864	G	T	SNP	Rv0446c	Leu118Met(s)
562497	C	T	SNP	Rv0471c	Glu73Lys
567065	C	G	SNP	Rv0477	Ala97Gly
575368	T	C	SNP	Rv0486 (mshA)	silent (Asp7)
580008	A	G	SNP	Rv0490 (senX3)	silent (Leu220)
592584	A	G	SNP	Rv0501 (galE2)	Met(s)311Val(s)
599274	G	C	SNP	Rv0507 (mmpL2)	silent (Arg692)
629329	C	A	SNP	Rv0537c	Gly135Cys
638558	A	C	SNP	Rv0547c	Ile120Ser
639835	C	T	SNP	Rv0548c (menB)	Arg41His
641791	G	T	SNP	Rv0551c (fadD8)	Leu341Ile
643449	C	T	SNP	Rv0552	silent (Ala187)
646163	C	A	SNP	Rv0554 (bpoC)	Gln233Lys
651669	G	A	SNP	Rv0561c	Arg363Cys
654996	C	T	SNP	Rv0564c (gpdA1)	silent (Ser318)
686066	A	G	SNP	Rv0588 (yrbE2B)	Ile47Val
687602	C	A	SNP	Rv0589 (mce2A)	Thr261Asn
703945	A	T	SNP	Rv0609A	Asp39Val
717537	C	T	SNP	Rv0625c	silent (Leu119)
718984	G	A	SNP	Rv0628c	Ala310Val(s)
720337	C	G	SNP	Rv0629c (recD)	Val466Leu
722604	C	T	SNP	Rv0630c (recB)	Asp804Asn
727020	G	T	SNP	Rv0631c (recC)	silent (Leu429)
740281	C	A	SNP	Rv0646c (lipG)	Asp287Tyr

761155	C	T	SNP	Rv0667 (rpoB)	Ser450Leu(s)
763531	G	C	SNP	Rv0668 (rpoC)	silent (Pro54)
770657	G	A	SNP	Rv0671 (lpqP)	Ala26Thr
772089	C	T	SNP	Rv0672 (fadE8)	silent (Ser202)
773449	G	A	SNP	Rv0673 (echA4)	silent (Pro109)
793702	C	T	SNP	Rv0694 (lldD1)	Pro123Leu
821537	G	A	SNP	Rv0729 (xylB)	Asp11Asn
824429	C	T	SNP	Rv0731c	Glu71Lys
832246	A	G	SNP	Rv0740	silent (Gln157)
835526	G	A	SNP	Rv0745	Ala125Thr
864166	C	T	SNP	Rv0771	silent (Gly9)
877005	GC	G	DEL	Rv0783c (emrB)	
884134	C	G	SNP	Rv0790c	Ala223Pro
891404	C	T	SNP	Rv0797	silent (His339)
898477	A	G	SNP	Rv0804	Ile133Val
913906	C	T	SNP	Rv0821c (phoY2)	silent (Leu98)
923267	G	A	SNP	Rv0831c	Thr148Met(s)
940486	G	A	SNP	Rv0844c (narL)	silent (Ala207)
941503	G	T	SNP	Rv0845	Gly105Val
945972	C	T	SNP	Rv0848 (cysK2)	silent (Asp345)
947176	C	G	SNP	Rv0849	Ala374Gly
959346	C	T	SNP	Rv0861c (ercc3)	Arg269His
967599	C	CGCG	INS	Rv0870c	
980730	C	T	SNP	Rv0883c	Ala180Thr
990383	G	A	SNP	Rv0890c	silent (Gly738)
990521	G	A	SNP	Rv0890c	silent (Arg692)
997143	C	CG	INS	Rv0894	
1001471	T	C	SNP	Rv0897c	silent (Ala315)
1011286	T	C	SNP	Rv0907	Ile384Thr
1024313	C	T	SNP	Rv0918	Leu35Leu(s)
1032241	G	T	SNP	Rv0925c	silent (Ala131)
1036484	G	A	SNP	Rv0929 (pstC2)	Ala153Thr
1038500	T	G	SNP	Rv0931c (pknD)	Gln472Pro
1040706	A	C	SNP	Rv0932c (pstS2)	Ser115Ala
1047051	G	A	SNP	Rv0938 (ligD)	Ala306Thr
1055126	C	T	SNP	Rv0946c (pgi)	silent (Leu520)
1065742	G	A	SNP	Rv0954	Gly206Ser
1070381	A	G	SNP	Rv0958	Thr167Ala
1078398	G	A	SNP	Rv0968	Trp3STOP
1085623	A	G	SNP	Rv0973c (accA2)	Val43Ala
1104634	C	T	SNP	Rv0987	Ala698Val(s)
1121074	C	T	SNP	Rv1004c	Ala359Thr
1121078	A	C	SNP	Rv1004c	silent (Pro357)
1128814	G	A	SNP	Rv1009 (rpfB)	Glu242Lys
1136017	A	G	SNP	Rv1017c (prsA)	silent (Gly155)
1154174	G	A	SNP	Rv1030 (kdpB)	Val151Ile
1159850	G	A	SNP	Rv1035c	Thr71Ile
1160770	T	A	SNP	Rv1037c (essI)	Gln20Leu
1168323	A	G	SNP	Rv1045	silent (Gly217)
1169605	C	T	SNP	Rv1047	silent (Asn61)
1198603	A	G	SNP	Rv1074c (fadA3)	silent (Asn257)
1201291	A	G	SNP	Rv1076 (lipU)	silent (Glu175)

1225126	G	A	SNP	Rv1096	Val248Ile
1244768	G	A	SNP	Rv1121 (zwf1)	silent (Leu354)
1246231	T	TTCGAC	INS	Rv1123c (bpoB)	
1257032	G	A	SNP	Rv1131 (prpC)	Val(s)301Met(s)
1257343	C	G	SNP	Rv1132	Arg7Gly
1258324	A	G	SNP	Rv1132	Ile334Val
1259841	C	T	SNP	Rv1133c (metE)	silent (Glu502)
1266565	C	T	SNP	Rv1139c	Ala141Thr
1281515	G	A	SNP	Rv1155	silent (Gly29)
1297397	G	A	SNP	Rv1166 (lpqW)	Gly416Ser
1315746	G	A	SNP	Rv1181 (pks4)	Val(s)171Val
1316480	G	C	SNP	Rv1181 (pks4)	Gly416Ala
1325304	G	C	SNP	Rv1184c	Pro103Arg
1342468	C	T	SNP	Rv1199c	silent (Gly46)
1351222	GTTCAACACCGCCGCGTTA GCCGGCCA	G	DEL	Rv1207 (folP2)	
1363194	G	A	SNP	Rv1219c	silent (Ala56)
1368610	G	A	SNP	Rv1225c	His38Tyr
1393208	G	A	SNP	Rv1249c	Arg259Trp
1401206	G	A	SNP	Rv1253 (deaD)	Glu413Lys
1406312	A	G	SNP	Rv1258c	silent (His343)
1414621	C	A	SNP	Rv1266c (pknH)	Gly407Val
1414629	T	A	SNP	Rv1266c (pknH)	Leu404Phe
1414653	C	T	SNP	Rv1266c (pknH)	silent (Pro396)
1419602	T	C	SNP	Rv1270c (lprA)	silent (Leu49)
1436608	G	A	SNP	Rv1283c (oppB)	silent (Thr170)
1443899	T	C	SNP	Rv1290c	silent (Ala383)
1451009	G	A	SNP	Rv1295 (thrC)	Ala105Thr
1453996	C	G	SNP	Rv1297 (rho)	Arg265Gly
1460907	T	C	SNP	Rv1304 (atpB)	Phe222Leu
1465698	T	G	SNP	Rv1309 (atpG)	Ile272Ser
1468420	G	A	SNP	Rv1313c	silent (Arg362)
1472751	A	G	SNP	Rvnr01	rRNA
1478222	C	G	SNP	Rv1317c (alkA)	silent (Leu299)
1502226	C	T	SNP	Rv1333	Pro210Ser
1533999	G	C	SNP	Rv1362c	silent (Thr204)
1541129	C	T	SNP	Rv1368 (lprF)	Ala37Val(s)
1553855	C	T	SNP	Rv1380 (pyrB)	silent (Thr208)
1567985	A	G	SNP	Rv1392 (metK)	silent (Glu387)
1569878	G	T	SNP	Rv1394c (cyp132)	silent (Ile364)
1578829	T	G	SNP	Rv1402 (priA)	Leu406Arg
1580283	A	G	SNP	Rv1403c	Ile47Thr
1580613	C	T	SNP	Rv1404	Ala8Val(s)
1590094	G	A	SNP	Rv1414	silent (Ala68)
1593158	G	A	SNP	Rv1418 (lprH)	Asp174Asn
1599329	G	A	SNP	Rv1424c	Pro109Leu
1600164	C	T	SNP	Rv1425	silent (Gly169)
1613927	C	A	SNP	Rv1436 (gap)	silent (Ala207)
1623789	C	T	SNP	Rv1445c (devB)	silent (Pro223)
1624110	C	T	SNP	Rv1445c (devB)	silent (Leu116)
1657843	G	A	SNP	Rv1469 (ctpD)	Arg294His
1668914	C	G	SNP	Rv1478	Leu166Val(s)

1674162	C	T	SNP	Rv1483 (fabG1)	silent (Gly241)
1676308	T	C	SNP	Rv1486c	silent (Gly192)
1676662	C	G	SNP	Rv1486c	silent (Arg74)
1677765	C	T	SNP	Rv1488	silent (Arg123)
1679833	C	A	SNP	Rv1490	Thr171Asn
1693262	GA	G	DEL	Rv1502	
1697633	T	C	SNP	Rv1507A	Leu93Pro
1712671	G	A	SNP	Rv1521 (fadD25)	Val124Ile
1714837	C	T	SNP	Rv1522c (mmpL12)	Gly926Ser
1715799	C	A	SNP	Rv1522c (mmpL12)	Ser605Ile
1716649	C	T	SNP	Rv1522c (mmpL12)	Glu322Lys
1721428	GA	G	DEL	Rv1526c	
1747990	C	G	SNP	Rv1547 (dnaE1)	Val99Val(s)
1757029	GA	G	DEL	Rv1551 (plsB1)	
1774601	C	G	SNP	Rv1566c	Ser7Thr
1779370	G	C	SNP	Rv1573	silent (Thr19)
1780586	C	CG	INS	Rv1575	
1780800	C	A	SNP	Rv1576c	Gly422Val
1788570	G	T	SNP	Rv1587c	Asn198Lys
1788574	T	C	SNP	Rv1587c	His197Arg
1788613	C	T	SNP	Rv1587c	Gly184Asp
1788627	C	G	SNP	Rv1587c	silent (Leu179)
1788630	C	G	SNP	Rv1587c	Glu178Asp
1788821	G	A	SNP	Rv1587c	Gln115STOP
1789446	C	T	SNP	Rv1588c	Val131Ile
1789516	A	G	SNP	Rv1588c	silent (Gly107)
1789564	C	T	SNP	Rv1588c	silent (Arg91)
1789565	C	A	SNP	Rv1588c	Arg91Leu
1789650	C	T	SNP	Rv1588c	Ala63Thr
1789654	A	G	SNP	Rv1588c	silent (Leu61)
1789671	C	T	SNP	Rv1588c	Ala56Thr
1789675	A	C	SNP	Rv1588c	silent (Gly54)
1789678	C	G	SNP	Rv1588c	Val(s)53Val
1832293	G	C	SNP	Rv1629 (polA)	Glu543Asp
1841313	G	A	SNP	Rv1635c	silent (Gly310)
1851048	A	C	SNP	Rv1640c (lysX)	Ser330Ala
1875881	TGGGC	T	DEL	Rv1661 (pks7)	
1875886	C	A	SNP	Rv1661 (pks7)	Leu195Met(s)
1885772	G	A	SNP	Rv1662 (pks8)	Ala1357Thr
1886263	C	G	SNP	Rv1662 (pks8)	His1520Gln
1886859	C	A	SNP	Rv1663 (pks17)	silent (Gly116)
1897938	G	A	SNP	Rv1672c	silent (Val90)
1903050	C	T	SNP	Rv1678	silent (Tyr218)
1927417	A	T	SNP	Rv1702c	Cys387Ser
1939044	G	T	SNP	Rv1711	Val(s)69Val
1943991	A	T	SNP	Rv1716	Tyr139Phe
1944723	G	T	SNP	Rv1717	Val(s)106Val
1945465	CCGAG	C	DEL	Rv1718	
1945836	G	A	SNP	Rv1719	Gly66Arg
1950206	T	G	SNP	Rv1723	Ser289Ala
1964837	G	A	SNP	Rv1737c (narK2)	silent (Ala178)

1964913	C	T	SNP	Rv1737c (narK2)	Arg153Gln
1965869	G	GA	INS	Rv1738	
1978901	C	T	SNP	Rv1750c (fadD1)	Ala223Thr
2005944	A	C	SNP	Rv1771	Ser262Arg
2011542	T	C	SNP	Rv1777 (cyp144)	Ile296Thr
2013872	A	C	SNP	Rv1779c	Val203Gly
2023976	C	T	SNP	Rv1785c (cyp143)	Ser218Asn
2080182	G	T	SNP	Rv1834 (lipZ)	Arg118Leu
2110804	G	A	SNP	Rv1863c	silent (Ser186)
2114265	G	A	SNP	Rv1866	Glu376Lys
2118162	GC	G	DEL	Rv1868	
2123987	G	A	SNP	Rv1874	Glu102Lys
2127267	T	G	SNP	Rv1877	Val(s)455Gly
2127523	G	A	SNP	Rv1877	silent (Leu540)
2155168	C	G	SNP	Rv1908c (katG)	Ser315Thr
2185741	C	T	SNP	Rv1934c (fadE17)	Asp150Asn
2197065	C	G	SNP	Rv1945	silent (Ala359)
2215712	G	A	SNP	Rv1971 (mce3F)	Leu(s)152Leu
2216973	A	G	SNP	Rv1972	Ser128Gly
2239160	G	C	SNP	Rv1996	Gly53Arg
2244336	G	A	SNP	Rv1999c	Ala268Val(s)
2261479	G	A	SNP	Rv2014	Gly128Ser
2270065	T	C	SNP	Rv2024c	Asp59Gly
2277350	C	T	SNP	Rv2030c	silent (Leu379)
2278507	G	A	SNP	Rv2031c (hspX)	silent (Ser142)
2282130	C	A	SNP	Rv2036	Ser11Tyr
2289524	G	A	SNP	Rv2044c	His26Tyr
2300546	A	T	SNP	Rv2048c (pks12)	His2147Gln
2315005	C	T	SNP	Rv2058c (rpmB2)	silent (Ser19)
2324087	C	A	SNP	Rv2066 (cobI)	silent (Arg305)
2341636	C	G	SNP	Rv2083	Leu256Val(s)
2342202	C	CT	INS	Rv2084	
2342203	G	C	SNP	Rv2084	silent (Ala132)
2348804	T	C	SNP	Rv2091c	silent (Gly163)
2362756	GGAGATCCTGGAA	G	DEL	Rv2101 (helZ)	
2372493	C	G	SNP	Rv2112c (dop)	Arg26Pro
2378040	G	A	SNP	Rv2118c	silent (Ile91)
2378976	C	T	SNP	Rv2119	silent (Thr197)
2394761	C	T	SNP	Rv2134c	silent (Pro159)
2397445	C	T	SNP	Rv2138 (lppL)	Pro39Leu
2399877	C	T	SNP	Rv2140c (TB18.6)	Ser151Asn
2414813	G	A	SNP	Rv2154c (ftsW)	Pro37Leu
2428081	G	A	SNP	Rv2164c	Ala53Val
2433579	T	C	SNP	Rv2171 (lppM)	Ile210Thr
2436838	G	A	SNP	Rv2174 (mptA)	silent (Arg310)
2439519	G	A	SNP	Rv2177c	silent (Arg143)
2439613	G	A	SNP	Rv2177c	Ala112Val
2451355	C	A	SNP	Rv2189c	silent (Leu222)
2456669	C	T	SNP	Rv2192c (trpD)	silent (Pro25)

2462700	C	A	SNP	Rv2198c (mmpS3)	silent (Ser116)
2462850	G	A	SNP	Rv2198c (mmpS3)	silent (Thr66)
2482469	T	C	SNP	Rv2215 (dlaT)	Ser169Pro
2486342	C	T	SNP	Rv2219	silent (Phe36)
2487829	T	G	SNP	Rv2220 (glnA1)	Leu72Arg
2519048	G	A	SNP	Rv2245 (kasA)	Gly312Ser
2520317	G	A	SNP	Rv2246 (kasB)	Ala308Thr
2528378	C	A	SNP	Rv2253	Thr132Lys
2560410	C	T	SNP	Rv2287 (yjcE)	silent (Leu236)
2571312	C	T	SNP	Rv2299c (htpG)	Glu231Lys
2587048	C	T	SNP	Rv2314c	silent (Leu81)
2590827	T	G	SNP	Rv2318 (uspC)	Phe104Val
2605507	T	C	SNP	Rv2332 (mez)	Leu(s)134Leu
2631641	T	G	SNP	Rv2351c (plcA)	silent (Pro145)
2639868	A	G	SNP	Rv2357c (glyS)	silent (Asp399)
2648592	A	C	SNP	Rv2367c	silent (Ala107)
2652529	G	A	SNP	Rv2372c	silent (Thr99)
2654696	G	A	SNP	Rv2374c (hrcA)	Ser133Leu(s)
2669162	C	A	SNP	Rv2381c (mbtD)	Ala370Ser
2672514	C	G	SNP	Rv2383c (mbtB)	silent (Leu1108)
2673701	C	T	SNP	Rv2383c (mbtB)	Asp713Asn
2674645	G	A	SNP	Rv2383c (mbtB)	Thr398Met(s)
2677499	G	T	SNP	Rv2384 (mbtA)	Ala522Ser
2679840	G	C	SNP	Rv2386c (mbtI)	Leu56Val(s)
2699058	C	G	SNP	Rv2402	Pro177Arg
2706890	G	C	SNP	Rv2409c	silent (Arg148)
2713402	G	A	SNP	Rv2415c	Pro128Leu
2720952	T	C	SNP	Rv2424c	Thr276Ala
2720954	G	A	SNP	Rv2424c	Thr275Ile
2723923	AT	A	DEL	Rv2426c	
2732591	C	G	SNP	Rv2435c	silent (Ala53)
2737201	A	C	SNP	Rv2439c (proB)	silent (Ser349)
2756606	G	A	SNP	Rv2455c	silent (Phe33)
2787177	C	T	SNP	Rv2482c (plsB2)	Ala703Thr
2840849	G	C	SNP	Rv2524c (fas)	silent (Gly2828)
2842043	C	G	SNP	Rv2524c (fas)	Trp2430Cys
2844546	C	A	SNP	Rv2524c (fas)	Gly1596Val(s)
2855317	CCGGCGTAGAAAGCCGACCG CATGTCACCGAAAGAGCTGG CGTCGTCGGGG	C	DEL	Rv2531c	
2867333	C	A	SNP	Rv2544 (lppB)	silent (Leu70)
2867547	G	A	SNP	Rv2544 (lppB)	Val(s)142Met(s)
2882331	A	ACG	INS	Rv2563	
2884634	C	T	SNP	Rv2565	silent (Pro8)
2912061	G	A	SNP	Rv2585c	Ala206Val(s)
2945490	G	A	SNP	Rv2616	Trp54STOP
2958570	G	A	SNP	Rv2631	silent (Thr333)
2959714	T	C	SNP	Rv2633c	Asp36Gly
2971122	T	C	SNP	Rv2646	Ile191Thr
2974933	A	G	SNP	Rv2650c	Ile101Thr

2975227	T	G	SNP	Rv2650c	Asn3Thr
2976616	G	C	SNP	Rv2653c	His98Gln
2976638	T	A	SNP	Rv2653c	Lys91Met(s)
2976799	G	A	SNP	Rv2653c	silent (Ala37)
2977410	C	G	SNP	Rv2655c	Glu417Gln
2983208	G	A	SNP	Rv2666	silent (Gly46)
2991647	A	AC	INS	Rv2675c	
3018654	C	T	SNP	Rv2703 (sigA)	Pro274Ser
3029969	G	A	SNP	Rv2717c	silent (Ser131)
3030025	CCG	C	DEL	Rv2717c	
3035533	G	A	SNP	Rv2723	Asp209Asn
3040582	T	C	SNP	Rv2727c (miaA)	His63Arg
3040639	C	T	SNP	Rv2727c (miaA)	Gly44Asp
3056658	G	T	SNP	Rv2743c	Ala192Glu
3069437	A	G	SNP	Rv2756c (hsdM)	Val(s)216Ala
3095130	G	A	SNP	Rv2787	Cys7Tyr
3100154	ACC	A	DEL	Rv2790c (ltp1)	
3129675	C	T	SNP	Rv2823c	Arg700His
3133016	C	G	SNP	Rv2825c	Arg175Thr
3135950	C	G	SNP	Rv2828c	silent (Ser128)
3135951	G	C	SNP	Rv2828c	Ser128Trp
3137343	C	A	SNP	Rv2831 (echA16)	Arg25Ser
3138129	G	C	SNP	Rv2832c (ugpC)	Phe351Leu(s)
3141349	A	G	SNP	Rv2835c (ugpA)	Tyr292His
3144835	G	A	SNP	Rv2838c (rbfA)	Leu113Leu(s)
3148984	C	T	SNP	Rv2841c (nusA)	Ala149Thr
3154414	A	G	SNP	Rv2846c (efpA)	Ile73Thr
3170496	A	T	SNP	Rv2858c (aldC)	His76Gln
3173446	G	C	SNP	Rv2861c (mapB)	Ala191Gly
3190556	G	A	SNP	Rv2880c	silent (Ala41)
3194569	G	A	SNP	Rv2885c	Pro327Leu
3196789	G	A	SNP	Rv2887	Arg120Lys
3204115	G	A	SNP	Rv2894c (xerC)	Thr59Met(s)
3217883	C	T	SNP	Rv2910c	Asp130Asn
3219194	G	A	SNP	Rv2911 (dacB2)	Ala286Thr
3244126	G	A	SNP	Rv2930 (fadD26)	Val144Ile
3276017	C	T	SNP	Rv2939 (papA5)	Pro357Ser
3276144	C	A	SNP	Rv2939 (papA5)	Pro399Gln
3285318	C	T	SNP	Rv2942 (mmpL7)	silent (Ala83)
3293592	G	A	SNP	Rv2946c (pks1)	Pro921Leu
3295639	C	CG	INS	Rv2946c (pks1)	
3296809	G	A	SNP	Rv2947c (pks15)	silent (Asp344)
3339417	A	G	SNP	Rv2983	silent (Glu100)
3346026	T	C	SNP	Rv2988c (leuC)	Asp17Gly
3352933	G	A	SNP	Rv2995c (leuB)	Thr179Met(s)
3382440	G	A	SNP	Rv3023c	silent (Asn61)
3398940	T	C	SNP	Rv3038c	Ile157Val
3400230	C	T	SNP	Rv3040c	Ala277Thr
3409007	G	A	SNP	Rv3048c (nrdF2)	silent (Asp124)
3417404	G	T	SNP	Rv3056 (dinP)	Gly234Cys
3422507	T	G	SNP	Rv3060c	Gln236Pro

3424156	G	A	SNP	Rv3061c (fadE22)	silent (Arg424)
3428088	G	A	SNP	Rv3063 (cstA)	silent (Ala282)
3442704	G	C	SNP	Rv3080c (pknK)	Cys1095Trp
3443994	A	G	SNP	Rv3080c (pknK)	silent (Arg665)
3451820	C	T	SNP	Rv3086 (adhD)	Pro14Ser
3461239	T	C	SNP	Rv3092c	Ile166Val
3465363	G	T	SNP	Rv3096	Ala273Ser
3479545	C	A	SNP	Rv3111 (moaC1)	silent (Ala125)
3480386	G	A	SNP	Rv3113	Ala105Thr
3481475	G	A	SNP	Rv3115	Ala9Thr
3483155	A	C	SNP	Rv3116 (moeB2)	Glu127Ala
3504418	C	T	SNP	Rv3138 (pflA)	Pro75Leu
3515936	C	T	SNP	Rv3150 (nuoF)	silent (His175)
3523304	G	A	SNP	Rv3156 (nuoL)	silent (Ala357)
3530023	C	T	SNP	Rv3161c	Met(s)372Ile
3556606	G	A	SNP	Rv3190c	Gln28STOP
3561229	C	A	SNP	Rv3193c	Val(s)648Val
3568488	GC	G	DEL	Rv3197A (whiB7)	
3581794	C	A	SNP	Rv3205c	Ala238Ser
3586698	T	G	SNP	Rv3209	Leu142Arg
3598321	C	T	SNP	Rv3221A (rshA)	silent (Ala12)
3605070	G	A	SNP	Rv3228	Val(s)115Val
3619854	A	G	SNP	Rv3240c (secA1)	silent (Gly226)
3629612	G	A	SNP	Rv3248c (sahH)	silent (Thr12)
3640557	T	C	SNP	Rv3261 (fbiA)	silent (Val5)
3642575	C	A	SNP	Rv3262 (fbiB)	silent (Val347)
3643582	T	C	SNP	Rv3263	Trp136Arg
3643611	C	T	SNP	Rv3263	silent (Leu145)
3669958	CG	C	DEL	Rv3288c (usfY)	
3675767	C	T	SNP	Rv3294c	Ala77Thr
3712372	A	G	SNP	Rv3327	silent (Leu208)
3791770	G	A	SNP	Rv3377c	Ser195Leu(s)
3809344	A	G	SNP	Rv3393 (iunH)	Asp295Gly
3816540	A	G	SNP	Rv3399	Thr138Ala
3850675	C	T	SNP	Rv3432c (gadB)	silent (Glu360)
3862181	C	T	SNP	Rv3443c (rplM)	silent (Gln70)
3863530	G	T	SNP	Rv3446c	silent (Ala334)
3871093	G	A	SNP	Rv3449 (mycP4)	
3871333	G	A	SNP	Rv3450c (eccB4)	silent (Tyr388)
3883845	T	C	SNP	Rv3466	silent (Gly107)
3883915	G	A	SNP	Rv3466	Val131Ile
3884906	A	G	SNP	Rv3467	Lys315Glu
3919764	G	A	SNP	Rv3500c (yrbE4B)	Thr100Ile
3968771	C	A	SNP	Rv3531c	Gln58His
3974868	G	A	SNP	Rv3536c (hsaE)	silent (Thr143)
4001765	C	T	SNP	Rv3561 (fadD3)	silent (Gly43)
4013388	G	A	SNP	Rv3571 (kshB)	Met(s)324Ile
4014376	C	A	SNP	Rv3573c (fadE34)	Asp613Tyr
4020169	C	A	SNP	Rv3578 (arsB2)	Leu10Ile
4024368	C	T	SNP	Rv3582c (ispD)	silent (Leu224)

4029034	GGGC	G	DEL	Rv3587c	
4029726	C	T	SNP	Rv3587c	Glu13Lys
4045670	G	A	SNP	Rv3603c	Thr150Ile
4049254	G	A	SNP	Rv3608c (folP1)	Leu243Leu(s)
4060201	G	A	SNP	Rv3619c (esxV)	Ser23Leu(s)
4060210	T	A	SNP	Rv3619c (esxV)	Gln20Leu
4060230	G	A	SNP	Rv3619c (esxV)	silent (His13)
4076639	CG	C	DEL	Rv3637	
4111891	G	A	SNP	Rv3670 (ephE)	silent (Pro182)
4113833	C	T	SNP	Rv3672c	silent (Pro170)
4115001	G	C	SNP	Rv3673c	Arg53Gly
4116758	C	T	SNP	Rv3676 (crp)	Thr94Ile
4118620	G	T	SNP	Rv3678A	Asp24Glu
4123325	C	T	SNP	Rv3682 (ponA2)	silent (Ala470)
4125663	A	G	SNP	Rv3684	silent (Ser75)
4150036	G	T	SNP	Rv3707c	Asp335Glu
4155266	C	G	SNP	Rv3710 (leuA)	silent (Gly509)
4155903	G	T	SNP	Rv3711c (dnaQ)	Ala276Glu
4163954	T	C	SNP	Rv3720	silent (Asp73)
4171454	G	A	SNP	Rv3726	Glu12Lys
4186953	C	T	SNP	Rv3736	Pro107Leu
4187523	A	G	SNP	Rv3736	His297Arg
4195938	G	A	SNP	Rv3745c	Ser54Leu(s)
4206563	C	G	SNP	Rv3761c (fadE36)	Ala119Pro
4231150	G	A	SNP	Rv3784	Gly299Ser
4231530	C	A	SNP	Rv3785	silent (Arg71)
4236844	G	A	SNP	Rv3790 (dprE1)	Ala356Thr
4237383	C	A	SNP	Rv3791 (dprE2)	silent (Thr73)
4243580	G	A	SNP	Rv3794 (embA)	Val(s)116Val
4244420	G	C	SNP	Rv3794 (embA)	Val(s)396Val
4247578	G	A	SNP	Rv3795 (embB)	silent (Leu355)
4250966	G	A	SNP	Rv3796	Met(s)363Ile
4254078	C	T	SNP	Rv3798	silent (Arg362)
4254265	A	G	SNP	Rv3798	Thr425Ala
4255679	C	T	SNP	Rv3799c (accD4)	silent (Pro90)
4258855	C	G	SNP	Rv3800c (pks13)	silent (Ala764)
4259217	A	T	SNP	Rv3800c (pks13)	Leu(s)644Met(s)
4269864	GC	G	DEL	Rv3807c	
4293107	G	A	SNP	Rv3824c (papA1)	Ser23Leu(s)
4301972	C	T	SNP	Rv3827c	Arg273His
4307021	C	T	SNP	Rv3833	Pro52Leu
4314705	T	G	SNP	Rv3841 (bfrB)	silent (Ala176)
4338361	C	T	SNP	Rv3862c (whiB6)	Arg54Gln
4345682	C	T	SNP	Rv3869 (eccB1)	Ser215Leu(s)
4348418	G	A	SNP	Rv3870 (eccCa1)	silent (Leu646)
4348589	G	A	SNP	Rv3870 (eccCa1)	silent (Gly703)
4354013	G	A	SNP	Rv3876 (espI)	Arg335His
4354404	AG	A	DEL	Rv3876 (espI)	
4354462	T	TA	INS	Rv3876 (espI)	
4359177	T	TCCCCGTGTG	INS	Rv3879c (espK)	

4361141	G	A	SNP	Rv3881c (espB)	Thr262Ile
4363243	A	C	SNP	Rv3882c (eccE1)	Trp60Gly
4363484	ACCAACG	A	DEL	Rv3883c (mycP1)	
4367090	G	A	SNP	Rv3885c (eccE2)	Arg478STOP
4385308	C	T	SNP	Rv3899c	silent (Ser24)
4385889	G	A	SNP	Rv3900c	silent (Cys140)
4386288	C	T	SNP	Rv3900c	silent (Pro7)
4386629	GGTCGTAGCC	G	DEL	Rv3901c	
4386702	G	C	SNP	Rv3901c	Ala38Gly
4399137	G	A	SNP	Rv3910	silent (Leu847)
4407851	GC	G	DEL	Rv3919c (gid)	
4407873	C	A	SNP	Rv3919c (gid)	Val(s)110Val

Table S10: SNVs found in all EAI strains of the NRC-MyRMA database removed from analysis.

Genomic position	Ref	Sample	Gene	Mutation
4013	T	C	Rv0003 (recF)	Ile245Thr
6112	G	C	Rv0005 (gyrB)	Met(s)291Ile
7362	G	C	Rv0006 (gyrA)	Glu21Gln
7585	G	C	Rv0006 (gyrA)	Ser95Thr
8452	C	T	Rv0006 (gyrA)	Ala384Val
9143	T	C	Rv0006 (gyrA)	silent (Ile614)
9304	G	A	Rv0006 (gyrA)	Gly668Asp
11879	A	G	Rv0008c	Ser145Pro
13298	G	C	Rv0010c	Ile87Met(s)
13460	A	G	Rv0010c	silent (Asp33)
14401	A	G	Rv0012	Lys105Glu
14785	T	C	Rv0012	Cys233Arg
15117	C	G	Rv0013 (trpG)	Ile68Met(s)
26347	C	G	Rv0021c	Asp179His
27996	T	C	Rv0023	silent (Tyr134)
36538	T	C	Rv0032 (bioF2)	silent (Ser748)
37031	C	G	Rv0034	silent (Ala55)
39758	A	G	Rv0036c	silent (His24)
42281	C	A	Rv0039c	Cys24Phe
42967	G	C	Rv0040c (mtc28)	silent (Pro133)
43945	A	G	Rv0041 (leuS)	Val128Val(s)
51949	A	G	Rv0048c	Val250Ala
54394	A	G	Rv0050 (ponA1)	silent (Ala244)
62049	A	G	Rv0058 (dnaB)	Arg552Gly
65159	G	A	Rv0061c	silent (Gly64)
65663	C	G	Rv0062 (celA1)	His38Asp
68174	T	C	Rv0063	Ser418Pro
69989	G	A	Rv0064	Gly457Asp
70267	G	T	Rv0064	Val550Phe
70816	A	G	Rv0064	Asn733Asp
74737	T	G	Rv0067c	Glu154Asp
75940	G	C	Rv0068	Val(s)214Leu
89200	G	T	Rv0080	Gly60Val(s)
89871	C	T	Rv0081	silent (Asp99)
92199	T	G	Rv0083	silent (Thr600)
98966	G	C	Rv0090	Ala163Pro
103600	A	G	Rv0093c	Cys22Arg
104824	C	A	Rv0095c	Ser131Ile
105045	G	C	Rv0095c	Asp57Glu
115499	T	G	Rv0101 (nrp)	silent (Arg1833)

116000	T	G	Rv0101 (nrp)	Val2000Val(s)
122109	A	G	Rv0103c (ctpB)	Leu(s)22Ser
123520	T	C	Rv0104	Tyr402His
126803	A	G	Rv0107c (ctpI)	Ser1247Pro
137233	C	T	Rv0112 (gca)	silent (Ala315)
143207	T	C	Rv0118c (oxcA)	Ser224Gly
144564	C	T	Rv0119 (fadD7)	silent (Ile172)
146087	T	C	Rv0120c (fusA2)	Asn562Ser
146788	G	A	Rv0120c (fusA2)	silent (Val328)
146872	C	T	Rv0120c (fusA2)	silent (Gln300)
154283	T	C	Rv0127 (mak)	Ser18Pro
160976	C	G	Rv0133	Asn36Lys
162226	G	A	Rv0134 (ephF)	Trp152STOP
168787	C	T	Rv0143c	Val466Ile
194681	G	C	Rv0165c (mce1R)	silent (Leu45)
195360	T	C	Rv0166 (fadD5)	Val123Ala
196642	C	T	Rv0166 (fadD5)	silent (Asn550)
196874	C	T	Rv0167 (yrbE1A)	Thr5Ile
199470	T	G	Rv0169 (mce1A)	Ser313Ala
206339	T	C	Rv0174 (mce1F)	Leu370Pro
208322	T	G	Rv0176	Ser291Ala
211993	C	A	Rv0180c	Lys86Asn
215238	C	T	Rv0184	silent (Asp90)
217201	T	C	Rv0186 (bglS)	silent (Asn311)
223942	T	C	Rv0192	Ser127Pro
225323	T	C	Rv0193c	Lys417Glu
225668	C	T	Rv0193c	Gly302Ser
227098	T	C	Rv0194	Met(s)74Thr
231114	C	G	Rv0195	silent (Ala72)
233358	A	C	Rv0197	silent (Val376)
233364	G	C	Rv0197	Arg378Ser
234477	T	G	Rv0197	Tyr749STOP
243598	A	G	Rv0205	His72Arg
244550	A	G	Rv0206c (mmpL3)	silent (Arg923)
251575	G	A	Rv0210	Ala486Thr
254903	C	A	Rv0213c	Gly350Cys
260282	G	T	Rv0217c (lipW)	Pro184Thr
261869	T	C	Rv0218	Cys316Arg
263149	A	C	Rv0220 (lipC)	Glu113Ala
264298	C	A	Rv0221	Gln78Lys
264984	C	G	Rv0221	silent (Thr306)
265554	A	C	Rv0222 (echA1)	silent (Val16)
272678	C	T	Rv0227c	silent (Ala54)
278681	C	G	Rv0233 (nrdB)	His33Asp
283614	T	C	Rv0236c (aftD)	Ser1080Gly

285772	A	C	Rv0236c (aftD)	silent (Pro360)
285871	A	G	Rv0236c (aftD)	silent (Val327)
290374	T	C	Rv0241c (htdX)	His94Arg
304923	A	G	Rv0252 (nirB)	silent (Lys686)
309765	C	T	Rv0257	Arg23STOP
310973	G	A	Rv0259c	Ala182Val(s)
311613	G	T	Rv0260c	silent (Val349)
320180	A	G	Rv0266c (oplA)	silent (Ile325)
325505	T	C	Rv0270 (fadD2)	silent (Val313)
326002	A	G	Rv0270 (fadD2)	Asp479Gly
331588	G	A	Rv0275c	Ser24Leu(s)
342146	A	C	Rv0282 (eccA3)	Glu6Ala
343281	G	C	Rv0282 (eccA3)	silent (Ala384)
344288	C	G	Rv0283 (eccB3)	silent (Ser89)
346275	C	G	Rv0284 (eccC3)	Pro214Arg
356528	A	G	Rv0292 (eccE3)	Asn217Asp
357582	G	A	Rv0293c	silent (His161)
376774	T	C	Rv0307c	silent (Ala94)
378357	T	G	Rv0309	Ser143Ala
378939	G	C	Rv0310c	silent (Arg70)
384380	A	C	Rv0315	Lys260Thr
386432	C	G	Rv0318c	Gly223Ala
390828	T	C	Rv0323c	Ser142Gly
391853	A	G	Rv0324	Thr168Ala
392261	T	C	Rv0325	STOP75Gln
393941	C	T	Rv0327c (cyp135A1)	Met(s)35Ile
396750	G	A	Rv0331	Val184Ile
403980	G	A	Rv0338c	Ala621Val
404326	T	C	Rv0338c	Arg506Gly
406274	T	C	Rv0339c	silent (Ala725)
412280	T	G	Rv0342 (iniA)	His481Gln
414486	C	T	Rv0344c (lpqJ)	silent (Glu152)
420008	A	G	Rv0350 (dnaK)	silent (Ala58)
420405	C	T	Rv0350 (dnaK)	Arg191Cys
438271	G	A	Rv0359	Ala252Thr
445780	C	T	Rv0368c	Arg249His
447442	C	T	Rv0370c	Gly201Glu
447525	G	C	Rv0370c	Ile173Met(s)
454295	T	C	Rv0376c	silent (Pro26)
455325	C	G	Rv0377	Pro302Arg
455329	T	C	Rv0377	silent (Gly303)
456511	G	A	Rv0380c	silent (Thr103)
457452	T	G	Rv0381c	silent (Thr124)
468357	A	G	Rv0389 (purT)	Glu8Gly
469042	C	T	Rv0389 (purT)	silent (Asn236)

471666	A	G	Rv0392c (ndhA)	Met(s)325Thr
475178	T	C	Rv0395	Val80Ala
485230	C	T	Rv0404 (fadD30)	silent (His418)
485785	T	G	Rv0405 (pks6)	Leu(s)19Val(s)
489935	G	C	Rv0405 (pks6)	
491742	T	C	Rv0407 (fgd1)	silent (Phe320)
492150	G	C	Rv0408 (pta)	Gly122Ala
492655	G	A	Rv0408 (pta)	silent (Ala290)
495473	C	T	Rv0410c (pknG)	silent (Ser614)
498531	A	G	Rv0412c	silent (Ala363)
498557	C	A	Rv0412c	Asp355Tyr
502589	C	G	Rv0417 (thiG)	Ser75Cys
505974	G	A	Rv0419 (lpqM)	Ala297Thr
513257	T	C	Rv0425c (ctpH)	Met(s)689Val(s)
514657	T	G	Rv0425c (ctpH)	Glu222Ala
517358	T	C	Rv0428c	Asp149Gly
517411	A	G	Rv0428c	silent (Arg131)
519185	T	G	Rv0431	Val38Gly
522081	A	G	Rv0434	Thr190Ala
524891	C	A	Rv0436c (pssA)	Gly167Val
527316	C	G	Rv0438c (moeA2)	Met(s)15Ile
541201	A	G	Rv0450c (mmpL4)	silent (Leu97)
546357	A	G	Rv0456c (echA2)	silent (Thr149)
549251	C	T	Rv0457c	Trp119STOP
551525	A	C	Rv0459	silent (Arg110)
555945	T	C	Rv0465c	Gln121Arg
555991	A	G	Rv0465c	Cys106Arg
556035	G	T	Rv0465c	Pro91Gln
560664	C	T	Rv0469 (umaA)	silent (Asn259)
560666	A	G	Rv0469 (umaA)	Lys260Arg
564723	C	T	Rv0473	Thr387Met(s)
565404	G	T	Rv0474	silent (Arg128)
568693	G	T	Rv0479c	Ala92Glu
573262	A	G	Rv0484c	silent (Gly180)
573384	T	G	Rv0484c	Ile140Leu
580336	C	A	Rv0490 (senX3)	silent (Arg330)
584171	T	C	Rv0493c	Ser174Gly
590436	T	C	Rv0500 (proC)	silent (Ala118)
590763	G	C	Rv0500 (proC)	Glu227Asp
591965	G	A	Rv0501 (galE2)	silent (Ala104)
595501	G	A	Rv0505c (serB1)	Ala362Val(s)
597816	A	G	Rv0507 (mmpL2)	silent (Ala206)
598076	T	A	Rv0507 (mmpL2)	Phe293Tyr
598079	A	G	Rv0507 (mmpL2)	His294Arg
598475	G	A	Rv0507 (mmpL2)	Arg426His

599868	A	G	Rv0507 (mmpL2)	silent (Arg890)
615938	G	A	Rv0524 (hemL)	silent (Glu368)
621390	G	A	Rv0530	Val162Ile
627350	C	G	Rv0536 (galE3)	Pro35Ala
630722	G	C	Rv0538	Arg228Pro
637319	G	A	Rv0545c (pitA)	Pro49Ser
643483	G	A	Rv0552	Gly199Ser
646531	A	T	Rv0555 (menD)	silent (Thr78)
648002	T	G	Rv0556	Leu15Arg
648856	T	C	Rv0557 (mgtA)	silent (Gly107)
649345	C	T	Rv0557 (mgtA)	silent (Ala270)
655707	G	A	Rv0564c (gpdA1)	silent (Val81)
657578	A	G	Rv0566c	silent (Asp154)
662911	T	C	Rv0570 (nrdZ)	silent (Ala539)
665293	A	G	Rv0572c	Phe31Leu
669398	T	C	Rv0575c	silent (Gln116)
670545	G	A	Rv0576	Arg233His
678440	C	T	Rv0583c (lpqN)	silent (Thr212)
685461	C	G	Rv0587 (yrbE2A)	silent (Ala111)
685608	T	C	Rv0587 (yrbE2A)	silent (Leu160)
685955	G	A	Rv0588 (yrbE2B)	Ala10Thr
686972	T	C	Rv0589 (mce2A)	Phe51Ser
690248	C	A	Rv0591 (mce2C)	Thr397Asn
690450	A	C	Rv0591 (mce2C)	silent (Ala464)
690465	T	G	Rv0591 (mce2C)	silent (Leu469)
700776	T	C	Rv0604 (lpqO)	Ser180Pro
704997	G	A	Rv0610c	Gln305STOP
705602	T	C	Rv0610c	Asn103Ser
713310	T	C	Rv0620 (galK)	Cys199Arg
715266	A	G	Rv0621	STOP355Trp
717588	A	G	Rv0625c	silent (Val102)
720863	G	T	Rv0629c (recD)	silent (Ala290)
722852	G	A	Rv0630c (recB)	Pro721Leu
726498	C	A	Rv0631c (recC)	silent (Leu603)
730087	G	A	Rv0633c	Ala27Val
734116	T	C	Rv0638 (secE1)	Met(s)127Thr
752046	C	T	Rv0655 (mkl)	Ala177Val
754186	A	G	Rv0658c	Leu75Pro
754387	G	A	Rv0658c	Thr8Ile
757182	A	G	Rv0663 (atsD)	Asp349Gly
763031	T	C	Rv0667 (rpoB)	silent (Ala1075)
763884	C	T	Rv0668 (rpoC)	Ala172Val
763886	C	A	Rv0668 (rpoC)	silent (Arg173)
775639	T	C	Rv0676c (mmpL5)	Ile948Val
776100	G	A	Rv0676c (mmpL5)	Thr794Ile

797597	C	T	Rv0697	Thr222Met(s)
810287	C	G	Rv0713	silent (Thr114)
811492	C	G	Rv0714 (rplN)	Val40Val(s)
812502	C	T	Rv0716 (rplE)	silent (Val148)
815236	T	C	Rv0723 (rplO)	Ile16Thr
815851	A	G	Rv0724 (sppA)	silent (Arg63)
817696	G	A	Rv0725c	Pro250Leu
819213	T	C	Rv0726c	Glu143Gly
820483	G	T	Rv0727c (fucA)	Ala6Asp
820752	C	T	Rv0728c (serA2)	Arg242His
821907	T	C	Rv0729 (xylB)	Leu134Pro
832201	C	T	Rv0740	silent (Asp142)
841494	C	G	Rv0749 (vapC31)	silent (Leu89)
841495	A	G	Rv0749 (vapC31)	Met(s)90Val(s)
841764	G	C	Rv0749A	silent (Thr37)
850985	A	G	Rv0756c	Ile161Thr
852910	C	T	Rv0758 (phoR)	Pro172Leu
857696	A	G	Rv0764c (cyp51)	silent (Ala114)
865761	C	T	Rv0772 (purD)	silent (His392)
871271	A	C	Rv0777 (purB)	Thr422Pro
880562	G	T	Rv0785	Cys408Phe
882257	T	C	Rv0787	Tyr267His
885689	G	T	Rv0791c	Thr51Lys
894888	T	C	Rv0801	silent (Ser86)
895082	A	G	Rv0802c	Phe183Leu
895120	C	T	Rv0802c	Arg170His
900221	T	C	Rv0806c (cpsY)	Val370Val(s)
903550	T	C	Rv0808 (purF)	silent (Ala480)
903913	T	C	Rv0809 (purM)	silent (Gly63)
906857	A	G	Rv0812	Ile145Met(s)
910015	C	A	Rv0816c (thiX)	Ala7Ser
911261	T	C	Rv0818	Leu97Pro
913274	C	G	Rv0820 (phoT)	silent (Ser183)
921813	C	G	Rv0829	Ala80Gly
931123	T	C	Rv0835 (lpqQ)	silent (Tyr57)
932280	T	C	Rv0836c	STOP218Trp
933699	G	T	Rv0837c	silent (Gly111)
938246	A	G	Rv0842	silent (Leu45)
941845	C	A	Rv0845	Ala219Glu
945214	G	A	Rv0848 (cysK2)	Gly93Ser
948294	T	C	Rv0851c	Ser59Gly
949535	T	C	Rv0853c (pdc)	silent (Ala528)
952597	C	T	Rv0855 (far)	silent (Ile322)
955524	A	G	Rv0859 (fadA)	Ser150Gly
957117	T	C	Rv0860 (fadB)	silent (Asp275)

960367	A	G	Rv0862c	Leu(s)749Ser
979704	G	C	Rv0881	Gly115Arg
987601	C	T	Rv0888	silent (Gly123)
990001	G	C	Rv0890c	Pro866Ala
993346	A	C	Rv0891c	Val37Gly
996219	G	A	Rv0893c	Ala26Val
1002342	T	C	Rv0897c	Tyr25Cys
1009490	C	T	Rv0906	Gln183STOP
1014815	T	G	Rv0909	His45Gln
1022613	G	A	Rv0917 (betP)	Arg176Gln
1024346	A	G	Rv0918	Ser46Gly
1025106	T	C	Rv0919	silent (Phe141)
1027727	G	C	Rv0922	Ala15Pro
1029997	A	G	Rv0923c	Val(s)194Ala
1032524	T	C	Rv0925c	Asp37Gly
1037012	T	C	Rv0930 (pstA1)	Met(s)5Thr
1037911	C	T	Rv0930 (pstA1)	Arg305STOP
1043136	C	T	Rv0934 (pstS1)	Thr341Ile
1047165	T	C	Rv0938 (ligD)	Cys344Arg
1048102	G	A	Rv0938 (ligD)	Arg656His
1054784	C	G	Rv0945	Arg180Gly
1061386	T	C	Rv0950c	Glu90Gly
1063765	G	A	Rv0952 (sucD)	Arg209Lys
1063922	C	T	Rv0952 (sucD)	silent (Gly261)
1066038	A	G	Rv0954	silent (STOP304)
1068151	T	C	Rv0956 (purN)	silent (His197)
1068432	A	G	Rv0957 (purH)	silent (Pro76)
1070702	T	C	Rv0958	Ser274Pro
1072342	A	G	Rv0959	Asp363Gly
1074558	G	A	Rv0962c (lprP)	Pro186Leu
1076309	G	T	Rv0964c	Pro124Thr
1077312	A	G	Rv0966c	Val(s)175Ala
1077754	C	T	Rv0966c	Ala28Thr
1079927	C	A	Rv0969 (ctpV)	silent (Thr395)
1080192	G	A	Rv0969 (ctpV)	Asp484Asn
1081681	T	C	Rv0970	silent (Val210)
1083755	A	G	Rv0973c (accA2)	Ser666Pro
1086648	C	A	Rv0974c (accD2)	Arg233Leu
1087193	G	C	Rv0974c (accD2)	Asn51Lys
1097023	G	A	Rv0981 (mprA)	Gly68Ser
1098523	T	A	Rv0982 (mprB)	Leu339His
1104690	T	G	Rv0987	Phe717Val
1105284	G	A	Rv0988	Val57Ile
1106422	T	C	Rv0989c (grcC2)	Ile321Val
1107940	A	C	Rv0990c	Ser54Ala

1109163	C	G	Rv0992c	Met(s)3Ile
1109975	A	G	Rv0993 (galU)	Gln235Arg
1110956	T	G	Rv0994 (moeA1)	Cys230Gly
1111518	T	C	Rv0994 (moeA1)	Val(s)417Ala
1113290	G	C	Rv0996	Glu303Gln
1117405	C	T	Rv1001 (arcA)	Thr74Ile
1119739	C	T	Rv1002c	silent (Leu67)
1123597	A	G	Rv1005c (pabB)	Leu(s)1Ser
1126889	G	C	Rv1007c (metS)	Arg39Gly
1127648	C	A	Rv1008 (tatD)	Thr187Asn
1131300	G	A	Rv1012	Ser58Asn
1139222	G	A	Rv1020 (mfd)	Ala86Thr
1143832	A	C	Rv1022 (lpqU)	Thr33Pro
1144585	A	G	Rv1023 (eno)	Arg8Gly
1149551	C	T	Rv1028c (kdpD)	silent (Glu712)
1150585	G	A	Rv1028c (kdpD)	Pro368Ser
1155700	C	T	Rv1030 (kdpB)	silent (Ile659)
1157771	G	C	Rv1032c (trcS)	Ser62Cys
1178116	T	C	Rv1056	silent (Thr163)
1184826	G	T	Rv1061	Arg271Leu
1192830	G	A	Rv1069c	Arg482Trp
1199019	T	C	Rv1074c (fadA3)	Thr119Ala
1203824	T	C	Rv1078 (pra)	Ile171Thr
1211369	A	C	Rv1086	Ser259Arg
1220680	T	C	Rv1093 (glyA1)	Val36Ala
1228116	A	G	Rv1099c (glpX)	Ile190Thr
1230778	G	A	Rv1102c (mazF3)	Thr65Ile
1235446	T	C	Rv1108c (xseA)	silent (Ser5)
1237403	G	A	Rv1111c	Pro264Ser
1248382	A	G	Rv1125	Ser101Gly
1248936	G	C	Rv1125	silent (Pro285)
1248978	T	C	Rv1125	silent (Ala299)
1250340	A	G	Rv1127c (ppdK)	silent (Ala355)
1250357	T	G	Rv1127c (ppdK)	Thr350Pro
1251199	C	T	Rv1127c (ppdK)	Gly69Glu
1252164	T	C	Rv1128c	Glu270Gly
1254562	A	G	Rv1130 (prpD)	Asp3Gly
1281118	T	C	Rv1154c	Thr123Ala
1292102	A	G	Rv1162 (narH)	silent (Pro346)
1306259	A	G	Rv1175c (fadH)	silent (Ala656)
1307598	C	G	Rv1175c (fadH)	Cys210Ser
1310316	C	T	Rv1178	Ala318Val
1314617	C	T	Rv1180 (pks3)	Ala298Val
1315191	A	C	Rv1180 (pks3)	STOP489Tyr
1315884	G	A	Rv1181 (pks4)	silent (Ala217)

1320508	G	A	Rv1182 (papA3)	Val(s)158Val
1320614	C	G	Rv1182 (papA3)	Leu194Val(s)
1327890	G	A	Rv1186c	silent (Asp472)
1328687	G	C	Rv1186c	Pro207Ala
1340775	C	T	Rv1197 (esxK)	silent (Asn39)
1341040	C	A	Rv1198 (esxL)	Ala12Asp
1341044	C	T	Rv1198 (esxL)	silent (His13)
1344857	C	T	Rv1201c (dapD)	Gly105Ser
1356648	C	T	Rv1213 (glgC)	silent (Asp271)
1358940	C	A	Rv1215c	Ala169Ser
1360209	T	C	Rv1217c	silent (Ala531)
1362006	T	C	Rv1218c	Gln243Arg
1367484	T	G	Rv1224 (tatB)	Trp8Gly
1368947	A	G	Rv1226c	Val(s)450Ala
1369389	C	T	Rv1226c	Gly303Ser
1369735	G	A	Rv1226c	silent (Tyr187)
1374065	T	C	Rv1230c	Ser45Gly
1374578	C	T	Rv1231c	Arg96His
1374639	T	A	Rv1231c	Asn76Tyr
1375724	A	C	Rv1232c	Cys149Gly
1382628	T	C	Rv1239c (corA)	Lys139Glu
1387211	G	A	Rv1244 (lpqZ)	Ala119Thr
1389866	C	T	Rv1248c	Gly1063Ser
1390763	C	T	Rv1248c	Val(s)764Met(s)
1393626	A	G	Rv1249c	silent (Leu119)
1395010	A	G	Rv1250	Arg278Gly
1396922	T	C	Rv1251c	silent (Thr773)
1397201	A	G	Rv1251c	silent (Asn680)
1397215	C	G	Rv1251c	Gly676Arg
1400396	A	G	Rv1253 (deaD)	Met(s)143Val(s)
1410062	G	C	Rv1262c	Pro104Arg
1411210	T	G	Rv1263 (amiB2)	Val260Val(s)
1414021	C	T	Rv1266c (pknH)	Arg607Gln
1417019	C	T	Rv1267c (embR)	Cys110Tyr
1417793	G	A	Rv1268c	silent (Thr188)
1424699	T	C	Rv1274 (lprB)	Leu168Pro
1426928	C	T	Rv1277	silent (Phe255)
1440469	C	G	Rv1286 (cysN)	silent (Pro521)
1443354	C	T	Rv1289	silent (Ala196)
1445781	A	G	Rv1291c	silent (Ala18)
1457144	C	T	Rv1300 (hemK)	Arg194Cys
1458144	C	A	Rv1301	Pro196Gln
1479085	T	C	Rv1317c (alkA)	Ile12Val
1480972	T	C	Rv1319c	silent (Glu510)
1481185	A	C	Rv1319c	Asp439Glu

1481602	T	G	Rv1319c	silent (Arg300)
1482627	T	C	Rv1320c	Thr531Ala
1484708	A	C	Rv1321	Ser144Arg
1490905	A	G	Rv1326c (glgB)	Ser470Pro
1490911	G	A	Rv1326c (glgB)	Pro468Ser
1492194	T	C	Rv1326c (glgB)	Asp40Gly
1496964	G	T	Rv1328 (glgP)	Ala801Ser
1499274	C	G	Rv1330c (pncB1)	Gly429Ala
1505194	T	C	Rv1338 (murl)	silent (Gly40)
1505973	G	A	Rv1339	silent (Arg19)
1514010	G	T	Rv1348 (irtA)	Val322Phe
1521526	T	C	Rv1354c	silent (Glu117)
1522862	C	T	Rv1355c (moeY)	Val391Ile
1523175	A	C	Rv1355c (moeY)	silent (Ala286)
1523791	A	G	Rv1355c (moeY)	Leu81Pro
1526819	C	A	Rv1358	silent (Arg70)
1534548	G	A	Rv1362c	silent (Ile21)
1536251	G	T	Rv1364c	Ala465Glu
1540141	T	C	Rv1367c	Ile169Val
1544255	C	T	Rv1371	silent (Arg299)
1546703	C	T	Rv1373	Pro231Leu
1547125	T	C	Rv1374c	Thr136Ala
1548087	G	A	Rv1375	Gly86Arg
1552547	G	A	Rv1378c	Arg37Trp
1559562	C	A	Rv1384 (carB)	Ala821Glu
1560912	G	A	Rv1385 (pyrF)	silent (Glu156)
1563717	C	T	Rv1388 (mihF)	silent (Val8)
1568178	C	T	Rv1393c	silent (Pro470)
1570566	C	A	Rv1394c (cyp132)	Arg135Leu
1574206	T	C	Rv1397c (vapC10)	Asp103Gly
1575793	A	G	Rv1399c (nlhH)	Val6Ala
1580181	G	A	Rv1403c	Pro81Leu
1581377	C	T	Rv1405c	Gly198Asp
1584379	A	C	Rv1407 (fmu)	Ile427Leu
1585283	A	C	Rv1409 (ribG)	Lys30Asn
1585404	G	A	Rv1409 (ribG)	Ala71Thr
1588899	G	T	Rv1412 (ribC)	silent (Ala111)
1589739	C	T	Rv1413	silent (Gly118)
1590555	C	T	Rv1415 (ribA2)	silent (Thr53)
1600685	C	T	Rv1425	Pro343Leu
1601528	C	T	Rv1426c (lipO)	Cys265Tyr
1604290	A	T	Rv1428c	Val157Asp
1608276	A	C	Rv1431	Asn65Thr
1609840	A	G	Rv1431	silent (Pro586)
1625259	A	C	Rv1446c (opcA)	Ile36Ser

1627351	T	C	Rv1448c (tal)	Thr244Ala
1630148	A	C	Rv1449c (tkf)	Tyr18Asp
1639418	A	G	Rv1453	silent (Leu346)
1639594	C	A	Rv1453	Pro405Gln
1639643	T	C	Rv1453	silent (Arg421)
1640442	C	T	Rv1454c (qor)	silent (Gly73)
1644250	G	C	Rv1458c	Ala4Gly
1645802	T	C	Rv1459c	Lys113Glu
1650072	A	G	Rv1462	Asn183Asp
1659902	T	C	Rv1472 (echA12)	Val47Ala
1659994	C	T	Rv1472 (echA12)	Pro78Ser
1676290	C	A	Rv1486c	Lys198Asn
1688300	T	C	Rv1497 (lipL)	silent (Phe120)
1689349	C	T	Rv1498c	Arg191His
1691520	T	G	Rv1500	Leu224Arg
1692141	A	C	Rv1501	silent (Ile84)
1693561	A	G	Rv1502	Tyr213Cys
1694547	A	C	Rv1504c	STOP200Glu
1695674	G	A	Rv1505c	silent (Tyr91)
1698911	G	A	Rv1508c	silent (Gly328)
1699849	G	A	Rv1508c	Pro16Ser
1706119	T	C	Rv1514c	silent (Ser159)
1706746	C	A	Rv1515c	Val261Phe
1709432	C	T	Rv1517	Leu188Phe
1713192	A	G	Rv1521 (fadD25)	Val297Val(s)
1716472	A	G	Rv1522c (mmpL12)	Ser381Pro
1718444	T	C	Rv1523	silent (Arg264)
1721490	C	G	Rv1526c	Ala191Pro
1726816	G	T	Rv1527c (pks5)	Pro532Thr
1731563	A	T	Rv1530 (adh)	His64Leu
1739390	A	G	Rv1536 (ileS)	Thr958Ala
1745446	T	A	Rv1543	Leu128His
1754299	A	C	Rv1550 (fadD11)	Glu195Ala
1754983	C	T	Rv1550 (fadD11)	Ala423Val(s)
1758790	C	T	Rv1552 (frdA)	silent (Pro370)
1759252	G	T	Rv1552 (frdA)	silent (Ser524)
1760292	A	G	Rv1554 (frdC)	Met(s)40Val(s)
1760923	T	C	Rv1555 (frdD)	silent (Thr124)
1778430	T	C	Rv1570 (bioD)	Met(s)191Thr
1791823	T	C	Rv1591	Leu(s)85Ser
1792777	T	C	Rv1592c	Ile322Val
1792778	T	C	Rv1592c	silent (Glu321)
1797577	A	G	Rv1596 (nadC)	Asn64Asp
1798355	G	A	Rv1597	Gly21Asp
1803265	G	A	Rv1602 (hisH)	Ser201Asn

1804409	C	A	Rv1604 (impA)	Pro124Gln
1817976	A	T	Rv1618 (tesB1)	His121Leu
1826054	T	C	Rv1624c	Thr178Ala
1826343	C	T	Rv1624c	silent (Arg81)
1826624	G	A	Rv1625c (cya)	Ala441Val
1827553	C	G	Rv1625c (cya)	Leu(s)131Phe
1829576	C	T	Rv1627c	silent (Glu166)
1832642	G	T	Rv1629 (polA)	Gly660Cys
1832643	G	C	Rv1629 (polA)	Gly660Ala
1839260	T	G	Rv1634	silent (Leu31)
1839329	G	A	Rv1634	silent (Arg54)
1839759	G	C	Rv1634	Gly198Arg
1847919	C	G	Rv1639c	silent (Thr180)
1848147	C	A	Rv1639c	Val(s)104Val
1849191	T	C	Rv1640c (lysX)	Ile949Val
1849609	T	C	Rv1640c (lysX)	silent (Arg809)
1853974	C	T	Rv1644 (tsnR)	silent (Gly123)
1854300	T	C	Rv1644 (tsnR)	Leu232Pro
1856777	G	C	Rv1647	Ala2Pro
1859559	C	A	Rv1649 (pheS)	Ala276Asp
1859989	C	T	Rv1650 (pheT)	Arg78Trp
1872959	A	G	Rv1659 (argH)	silent (Arg107)
1873954	G	T	Rv1659 (argH)	Arg439Leu
1876739	T	G	Rv1661 (pks7)	Val(s)479Gly
1887284	G	A	Rv1663 (pks17)	Arg258Gln
1889073	G	C	Rv1664 (pks9)	Ala350Pro
1894422	A	G	Rv1668c	silent (Asp307)
1897646	G	C	Rv1672c	Pro188Ala
1900800	A	G	Rv1675c (cmr)	Val59Ala
1901493	T	C	Rv1676	silent (Ser149)
1902156	G	A	Rv1677 (dsbF)	Gly137Arg
1907177	C	T	Rv1682	Arg259Trp
1907296	G	C	Rv1682	silent (Ala298)
1916137	A	G	Rv1691	silent (Leu63)
1917972	A	G	Rv1694 (tlyA)	silent (Leu11)
1920120	G	T	Rv1696 (recN)	silent (Pro146)
1923985	G	A	Rv1699 (pyrG)	Val53Ile
1924959	T	C	Rv1699 (pyrG)	silent (Gly377)
1931179	C	A	Rv1704c (cycA)	Arg93Leu
1935695	T	G	Rv1707	Ser272Ala
1936525	G	A	Rv1708	Ala56Thr
1940307	G	T	Rv1713 (engA)	Trp7Leu(s)
1944107	A	G	Rv1716	Ser178Gly
1944402	T	C	Rv1716	Val276Ala
1950767	T	C	Rv1724c	silent (Lys95)

1952160	T	C	Rv1726	silent (Thr103)
1956930	T	G	Rv1730c	Thr106Pro
1960284	C	A	Rv1733c	Gln68His
1963383	G	A	Rv1736c (narX)	silent (Tyr268)
1963957	T	C	Rv1736c (narX)	Asp77Gly
1967237	C	A	Rv1739c	Arg134Leu
1971725	G	C	Rv1745c (idi)	silent (Arg89)
1978807	G	T	Rv1750c (fadD1)	Ala254Asp
1979026	C	T	Rv1750c (fadD1)	Ser181Asn
2013943	G	C	Rv1779c	Asp179Glu
2017291	T	C	Rv1781c (malQ)	silent (Arg62)
2019236	T	G	Rv1782 (eccB5)	silent (Pro499)
2022868	T	C	Rv1783 (eccC5)	silent (Ser1204)
2023211	G	T	Rv1783 (eccC5)	Val1319Phe
2035937	G	A	Rv1797 (eccE5)	Arg152His
2055271	A	G	Rv1812c	Leu30Pro
2057774	A	T	Rv1815	Ile83Phe
2062922	T	C	Rv1819c (bacA)	Ile603Val
2066471	T	C	Rv1821 (secA2)	silent (Gly5)
2072190	A	C	Rv1826 (gcvH)	Glu80Ala
2083124	T	C	Rv1836c	Ser505Gly
2090306	G	A	Rv1841c	Pro138Leu
2092391	G	T	Rv1843c (guaB1)	silent (Ile436)
2092970	C	T	Rv1843c (guaB1)	silent (Leu243)
2096094	C	T	Rv1845c (blaR)	silent (Thr25)
2096186	A	G	Rv1846c (blaI)	silent (Thr138)
2096430	A	C	Rv1846c (blaI)	Leu57Arg
2097144	G	C	Rv1847	Val(s)90Leu
2104779	C	T	Rv1856c	silent (Gly15)
2110365	A	C	Rv1862 (adhA)	silent (Thr274)
2116903	C	T	Rv1867	silent (Gly380)
2120796	T	A	Rv1870c	STOP212Leu
2122625	A	G	Rv1872c (lldD2)	Val176Ala
2122976	C	G	Rv1872c (lldD2)	Gly59Ala
2128372	A	G	Rv1878 (glnA3)	silent (Thr117)
2128870	A	G	Rv1878 (glnA3)	silent (Leu283)
2129281	C	A	Rv1878 (glnA3)	silent (Ala420)
2138767	G	C	Rv1889c	Ala84Gly
2143328	G	C	Rv1895	Val(s)270Leu
2145878	A	G	Rv1899c (lppD)	Leu123Pro
2147022	A	C	Rv1900c (lipJ)	Ile204Met(s)
2151678	G	T	Rv1905c (ao)	Pro240Thr
2154724	C	A	Rv1908c (katG)	Arg463Leu
2156868	G	T	Rv1910c	silent (Gly144)
2158109	T	C	Rv1912c (fadB5)	Asp328Gly

2160998	G	A	Rv1915 (aceAa)	Gly179Asp
2177968	G	T	Rv1925 (fadD31)	silent (Ala294)
2185358	G	A	Rv1934c (fadE17)	silent (Thr277)
2199052	C	G	Rv1948c	Gly5Arg
2209465	G	A	Rv1966 (mce3A)	Ala47Thr
2211826	A	G	Rv1968 (mce3C)	silent (Lys67)
2216370	G	C	Rv1971 (mce3F)	Gly372Arg
2216443	C	A	Rv1971 (mce3F)	Ala396Glu
2218012	A	G	Rv1974	silent (Ala118)
2218488	G	C	Rv1975	Ser146Thr
2220512	T	G	Rv1977	silent (Ser253)
2222308	T	C	Rv1979c	Asp286Gly
2229801	C	G	Rv1985c	silent (Pro34)
2237497	G	C	Rv1993c	Leu27Val(s)
2239055	C	T	Rv1996	Pro18Ser
2241646	C	T	Rv1997 (ctpF)	silent (Ala496)
2241742	A	G	Rv1997 (ctpF)	silent (Pro528)
2242808	G	A	Rv1997 (ctpF)	Ala884Thr
2243034	T	G	Rv1998c	Ser230Arg
2246960	G	C	Rv2001	Val(s)43Val
2247677	A	C	Rv2002 (fabG3)	silent (Ile6)
2249035	A	G	Rv2003c	Met(s)129Thr
2255942	G	T	Rv2006 (otsB1)	Arg1314Leu
2264782	C	A	Rv2017	Ala262Glu
2269780	T	C	Rv2024c	Asp154Gly
2270102	A	G	Rv2024c	Trp47Arg
2282376	C	T	Rv2036	Ala93Val
2282377	C	T	Rv2036	silent (Ala93)
2282787	C	T	Rv2037c	Cys312Tyr
2285251	C	A	Rv2039c	Val131Phe
2287121	A	G	Rv2041c	silent (Asp242)
2296042	G	C	Rv2048c (pks12)	Pro3649Ala
2297766	G	A	Rv2048c (pks12)	Ala3074Val
2300237	A	G	Rv2048c (pks12)	silent (Ala2250)
2300552	T	G	Rv2048c (pks12)	silent (Pro2145)
2300555	A	G	Rv2048c (pks12)	silent (Asp2144)
2301089	T	C	Rv2048c (pks12)	silent (Leu1966)
2309356	G	A	Rv2051c (ppm1)	Thr467Ile
2311099	C	G	Rv2052c	silent (Pro473)
2321358	G	C	Rv2063A (mazF7)	Arg101Pro
2328543	T	C	Rv2071c (cobM)	Ile145Met(s)
2329533	A	G	Rv2072c (cobL)	Leu205Pro
2331255	C	T	Rv2074	Ala88Val(s)
2331620	A	C	Rv2075c	silent (Gly420)
2331789	G	T	Rv2075c	Pro364Gln

2334007	A	G	Rv2077c	silent (Ala96)
2335075	A	G	Rv2078	Glu6Gly
2335494	A	G	Rv2079	Tyr47Cys
2335500	C	T	Rv2079	Ala49Val
2339255	A	G	Rv2082	Thr183Ala
2340621	C	G	Rv2082	Pro638Arg
2341030	G	A	Rv2083	Ala54Thr
2345037	C	A	Rv2088 (pknJ)	silent (Leu209)
2348446	C	G	Rv2090	Phe358Leu(s)
2348482	G	T	Rv2090	Glu370Asp
2350186	A	G	Rv2092c (helY)	silent (Arg623)
2361604	C	G	Rv2101 (helZ)	Val455Val(s)
2362041	C	A	Rv2101 (helZ)	Pro601Gln
2369186	G	C	Rv2109c (prcA)	Arg182Gly
2369326	C	G	Rv2109c (prcA)	Arg135Pro
2374442	G	A	Rv2114	silent (Ser203)
2386389	G	A	Rv2125	Gly33Ser
2388641	G	A	Rv2127 (ansP1)	Gly9Asp
2397760	C	G	Rv2138 (lppL)	Ala144Gly
2400031	G	A	Rv2140c (TB18.6)	Arg100Cys
2413246	C	A	Rv2153c (murG)	Val(s)36Leu(s)
2415656	G	C	Rv2155c (murD)	Arg247Gly
2421816	A	G	Rv2160A	
2425097	A	C	Rv2163c (pbpB)	Val664Gly
2425471	T	C	Rv2163c (pbpB)	silent (Arg539)
2437259	G	T	Rv2174 (mptA)	Ala451Ser
2440926	G	T	Rv2178c (aroG)	Asp265Glu
2448288	G	A	Rv2187 (fadD15)	Trp43STOP
2448458	C	T	Rv2187 (fadD15)	Thr100Ile
2449295	G	A	Rv2187 (fadD15)	Gly379Glu
2450045	G	A	Rv2188c (pimB)	Thr369Met(s)
2451081	C	G	Rv2188c (pimB)	Glu24Gln
2462871	G	A	Rv2198c (mmpS3)	silent (Ala59)
2472956	T	C	Rv2208 (cobS)	Leu(s)155Ser
2495500	T	C	Rv2224c (caeA)	Leu508Leu(s)
2499726	G	A	Rv2226	Asp299Asn
2501148	T	C	Rv2227	Val(s)73Ala
2503549	C	A	Rv2230c	Ala354Ser
2508395	G	A	Rv2235	silent (Pro253)
2509140	G	C	Rv2236c (cobD)	Ser79Cys
2509181	C	G	Rv2236c (cobD)	Val(s)65Val
2509722	A	G	Rv2237	silent (Pro78)
2511712	G	T	Rv2240c	Thr190Lys
2518132	C	T	Rv2245 (kasA)	silent (Thr6)
2521342	T	C	Rv2247 (accD6)	silent (Asp200)

2526974	T	C	Rv2251	silent (Pro470)
2528931	G	A	Rv2254c	silent (Asn15)
2529680	A	G	Rv2256c	silent (Thr65)
2530434	G	T	Rv2257c	Pro130His
2531742	A	G	Rv2258c	silent (Ala52)
2538793	G	A	Rv2265	Gly32Ser
2544979	T	A	Rv2270 (lppN)	His94Gln
2547274	A	G	Rv2275	Asp131Gly
2553682	C	T	Rv2281 (pitB)	silent (Tyr170)
2562783	T	C	Rv2290 (lppO)	Val(s)62Ala
2563958	A	C	Rv2291 (sseB)	Glu262Ala
2569593	A	G	Rv2298	His171Arg
2573434	G	T	Rv2301 (cut2)	Trp140Cys
2574598	C	T	Rv2303c	Ser141Asn
2577246	A	G	Rv2306A	Ile47Val
2578626	A	G	Rv2307c	Met(s)24Thr
2581109	C	A	Rv2308	silent (Arg231)
2586127	A	G	Rv2314c	silent (Gly388)
2589216	G	C	Rv2316 (uspA)	Val(s)127Leu
2598400	A	G	Rv2326c	silent (Asn516)
2602575	G	A	Rv2329c (narK1)	Pro296Leu
2605293	G	T	Rv2332 (mez)	Glu62Asp
2608117	C	A	Rv2333c (stp)	Asp69Tyr
2611704	A	C	Rv2336	silent (Arg290)
2622508	C	T	Rv2344c (dgt)	Leu(s)415Leu
2641840	A	G	Rv2359 (zur)	His64Arg
2642383	C	T	Rv2360c	Ala66Thr
2643653	G	A	Rv2362c (recO)	silent (Gly202)
2652908	C	G	Rv2373c (dnaJ2)	Glu360Asp
2656225	A	G	Rv2377c (mbtH)	Val69Ala
2660319	C	A	Rv2379c (mbtF)	Glu589Asp
2663210	G	A	Rv2380c (mbtE)	silent (Ala1302)
2688225	G	C	Rv2394 (ggtB)	Met(s)72Ile
2691713	T	C	Rv2395	Ser548Pro
2695378	C	G	Rv2398c (cysW)	Gly141Ala
2696977	G	C	Rv2400c (subI)	silent (Ala246)
2704291	G	A	Rv2406c	silent (Ile49)
2709795	A	G	Rv2411c	silent (Ala57)
2712913	C	A	Rv2415c	Arg291Leu
2721562	C	G	Rv2424c	silent (Ala72)
2723506	T	C	Rv2426c	Leu226Leu(s)
2727037	A	T	Rv2429 (ahpD)	Met(s)78Leu(s)
2731741	G	A	Rv2435c	Leu337Leu(s)
2737572	C	A	Rv2439c (proB)	Ala226Ser
2745839	G	A	Rv2446c	silent (Ala100)

2751804	C	T	Rv2450c (rpfE)	Arg126Gln
2755112	G	A	Rv2455c	silent (Ile531)
2760152	A	G	Rv2458 (mmuM)	Tyr125Cys
2764206	A	G	Rv2462c (tig)	silent (Asp362)
2764939	G	A	Rv2462c (tig)	Pro118Leu
2773955	G	C	Rv2471 (aglA)	Ser131Thr
2779136	T	C	Rv2476c (gdh)	Ser1043Gly
2786952	A	G	Rv2482c (plsB2)	Cys778Arg
2790458	A	C	Rv2483c (plsC)	Cys189Gly
2791098	C	T	Rv2484c	Gly466Asp
2791257	A	T	Rv2484c	Ile413Asn
2791475	A	G	Rv2484c	silent (Ala340)
2807486	C	A	Rv2492	Ala70Asp
2809621	T	C	Rv2495c (bkdC)	Thr107Ala
2809895	G	A	Rv2495c (bkdC)	silent (Leu15)
2817158	C	A	Rv2502c (accD1)	Met(s)439Ile
2818837	A	G	Rv2503c (scoB)	silent (Gly97)
2821342	C	T	Rv2505c (fadD35)	silent (Ala85)
2824432	G	A	Rv2508c	silent (Thr54)
2825466	G	A	Rv2509	silent (Lys263)
2830525	C	A	Rv2513	Thr122Lys
2841022	A	G	Rv2524c (fas)	Cys2771Arg
2847281	A	G	Rv2524c (fas)	silent (Asp684)
2855259	A	G	Rv2531c	silent (Ala841)
2858669	G	T	Rv2533c (nusB)	Ala19Asp
2865760	A	G	Rv2542	Thr211Ala
2865882	T	C	Rv2542	silent (Val251)
2878980	C	T	Rv2559c	Gly317Asp
2880702	G	C	Rv2560	Val210Leu
2886570	A	G	Rv2566	silent (Glu66)
2888201	T	C	Rv2566	Leu610Pro
2889633	T	C	Rv2566	silent (Ala1087)
2891267	C	T	Rv2567	silent (Gly491)
2891728	A	G	Rv2567	Gln645Arg
2894208	G	A	Rv2569c	silent (Ser67)
2894594	G	A	Rv2570	Gly28Asp
2894642	A	G	Rv2570	Glu44Gly
2897528	G	A	Rv2572c (aspS)	silent (Ala92)
2899890	G	T	Rv2575	Gln184His
2910461	G	T	Rv2584c (apt)	Ala147Glu
2911293	C	G	Rv2585c	Cys462Ser
2912294	T	G	Rv2585c	silent (Ala128)
2923391	T	C	Rv2592c (ruvB)	silent (Pro281)
2925683	G	A	Rv2595 (vapB40)	silent (Leu64)
2925962	T	C	Rv2596 (vapC40)	Cys77Arg

2926882	C	T	Rv2597	silent (Arg176)
2927511	G	T	Rv2599	Ser12Ile
2939373	G	C	Rv2611c	Ser197Cys
2939657	T	C	Rv2611c	Ile102Met(s)
2940608	C	T	Rv2612c (pgsA1)	Ser2Asn
2948650	T	C	Rv2622	silent (Arg5)
2954439	T	C	Rv2627c	Arg104Gly
2955233	C	T	Rv2628	Ser59Leu(s)
2984740	A	G	Rv2668	His3Arg
2985216	G	A	Rv2668	Glu162Lys
2987918	G	A	Rv2672	silent (Arg79)
2988630	C	G	Rv2672	His317Asp
2992564	G	A	Rv2676c	Ser22Leu(s)
2994187	T	C	Rv2678c (hemE)	Leu292Leu(s)
3000362	T	C	Rv2683	Leu84Ser
3003115	C	G	Rv2685 (arsB1)	Ala378Gly
3005185	G	T	Rv2688c	Pro156Thr
3006898	G	A	Rv2689c	silent (Tyr55)
3007238	A	G	Rv2690c	STOP658Arg
3009692	A	G	Rv2691 (ceoB)	Thr117Ala
3010420	A	G	Rv2692 (ceoC)	Ile133Val
3015379	G	A	Rv2700	silent (Pro59)
3017465	T	C	Rv2702 (ppgK)	Ile203Thr
3027606	C	G	Rv2714	Ser181Trp
3027798	T	C	Rv2714	Val(s)245Ala
3031168	A	G	Rv2719c	Tyr124His
3031285	A	T	Rv2719c	Leu(s)85Met(s)
3041871	G	T	Rv2729c	Ala202Glu
3069167	A	G	Rv2756c (hsdM)	Leu306Pro
3069805	G	C	Rv2756c (hsdM)	Val93Val(s)
3074830	C	T	Rv2765	silent (Tyr65)
3080795	A	G	Rv2771c	Leu80Pro
3086261	T	C	Rv2779c	Gln165Arg
3088625	A	G	Rv2781c	silent (Val120)
3097349	C	T	Rv2788 (sirR)	Gln131STOP
3103682	T	C	Rv2794c (pptT)	Met(s)87Val(s)
3104189	A	G	Rv2795c	silent (Cys241)
3105144	C	A	Rv2796c (lppV)	Cys159Phe
3112877	G	A	Rv2804c	
3113872	A	T	Rv2807	Glu72Val(s)
3118000	A	G	Rv2812	Arg395Gly
3118449	A	G	Rv2813	Ile76Val
3132963	A	G	Rv2825c	Leu(s)193Leu
3132965	G	T	Rv2825c	Thr192Lys
3132966	T	G	Rv2825c	Thr192Pro

3132975	C	G	Rv2825c	Val(s)189Leu
3133054	C	G	Rv2825c	silent (Ser162)
3133055	G	C	Rv2825c	Ser162Trp
3133536	T	C	Rv2825c	Lys2Glu
3137058	G	A	Rv2830c (vapB22)	Ala56Val(s)
3137681	G	A	Rv2831 (echA16)	Val(s)137Val
3169993	A	G	Rv2858c (aldC)	Leu244Pro
3174496	A	G	Rv2862c	Cys50Arg
3177884	C	A	Rv2866 (relG)	silent (Arg21)
3180988	C	A	Rv2869c (rip)	Val259Phe
3186860	T	G	Rv2874 (dipZ)	Tyr672Asp
3188428	C	T	Rv2877c	silent (Pro148)
3188769	A	G	Rv2877c	Tyr35His
3189242	A	G	Rv2878c (mpt53)	silent (Ala52)
3190342	G	A	Rv2880c	Pro113Ser
3194392	T	A	Rv2885c	Lys386Ile
3197917	G	A	Rv2888c (amiC)	silent (Gly123)
3200304	A	G	Rv2891	Val13Val(s)
3202629	C	T	Rv2893	silent (His70)
3226181	A	C	Rv2916c (ffh)	silent (Arg35)
3228143	G	T	Rv2917	Arg594Leu
3229692	G	A	Rv2918c (glnD)	Ala330Val
3233605	G	A	Rv2921c (ftsY)	Leu179Leu(s)
3241244	G	A	Rv2927c	Thr239Ile
3244414	A	G	Rv2930 (fadD26)	Met(s)240Val(s)
3248075	C	T	Rv2931 (ppsA)	silent (Arg877)
3254758	A	C	Rv2932 (ppsB)	silent (Pro1229)
3254880	G	T	Rv2932 (ppsB)	Arg1270Leu
3256494	A	G	Rv2933 (ppsC)	silent (Gly270)
3266030	A	G	Rv2934 (ppsD)	silent (Ser1261)
3271037	A	G	Rv2935 (ppsE)	Asn1101Asp
3273138	C	G	Rv2936 (drrA)	His309Asp
3274545	G	A	Rv2938 (drrC)	silent (Leu158)
3280132	G	A	Rv2940c (mas)	Arg862Trp
3293423	A	G	Rv2946c (pks1)	silent (Asp977)
3293601	T	C	Rv2946c (pks1)	Gln918Arg
3295124	C	T	Rv2946c (pks1)	silent (Arg410)
3296721	C	G	Rv2947c (pks15)	Gly374Arg
3296843	A	G	Rv2947c (pks15)	Val(s)333Ala
3299413	G	A	Rv2948c (fadD22)	Ala181Val
3308446	T	C	Rv2955c	Thr34Ala
3311119	G	C	Rv2958c	Val294Val(s)
3314412	A	G	Rv2962c	silent (Ala237)
3326150	A	G	Rv2971	Asp17Gly
3326554	A	C	Rv2971	Asn152His

3328495	G	C	Rv2973c (recG)	silent (Arg484)
3335708	G	C	Rv2979c	Pro14Arg
3336825	T	C	Rv2981c (ddlA)	Thr365Ala
3338603	G	C	Rv2982c (gpdA2)	Pro133Ala
3352932	C	G	Rv2995c (leuB)	silent (Thr179)
3358235	A	T	Rv2999 (lppY)	Met(s)212Leu(s)
3365841	G	A	Rv3007c	Pro204Ser
3367765	G	A	Rv3009c (gatB)	silent (Gly343)
3371260	T	C	Rv3011c (gatA)	Ile59Val
3401850	G	A	Rv3041c	silent (Asp23)
3401871	A	G	Rv3041c	silent (Ala16)
3402816	C	T	Rv3042c (serB2)	Gly116Glu
3404376	C	G	Rv3043c (ctaD)	silent (Thr182)
3406798	G	A	Rv3045 (adhC)	Ala172Thr
3407028	C	T	Rv3045 (adhC)	silent (Asn248)
3420825	A	G	Rv3059 (cyp136)	Asp445Gly
3424462	C	T	Rv3061c (fadE22)	silent (Leu322)
3425854	C	T	Rv3062 (ligB)	Pro91Ser
3427632	C	T	Rv3063 (cstA)	silent (Ala130)
3428917	C	A	Rv3063 (cstA)	Arg559Ser
3440464	T	G	Rv3077	silent (Arg308)
3440468	G	C	Rv3077	Gly310Arg
3440542	A	G	Rv3077	silent (Gly334)
3442240	C	A	Rv3079c	Glu120STOP
3447480	A	C	Rv3082c (virS)	Leu316Arg
3448714	G	C	Rv3083	Asp71His
3450725	T	C	Rv3084 (lipR)	silent (Val243)
3453382	C	T	Rv3087	Ala153Val(s)
3454263	C	G	Rv3087	Leu447Val
3455686	G	C	Rv3088 (tgs4)	silent (Leu449)
3456666	A	G	Rv3089 (fadD13)	silent (Ala302)
3460765	G	C	Rv3091	silent (Pro550)
3462135	G	C	Rv3093c	Cys210Trp
3464629	A	G	Rv3096	Glu28Gly
3466919	C	G	Rv3097c (lipY)	Gly58Ala
3467465	C	G	Rv3098c	silent (Ala66)
3474597	C	A	Rv3106 (fprA)	silent (Val197)
3475159	A	G	Rv3106 (fprA)	Asn385Asp
3479561	G	A	Rv3111 (moaC1)	Asp131Asn
3480474	G	A	Rv3113	Gly134Glu
3480789	T	C	Rv3114	Ser11Pro
3486977	A	G	Rv3121 (cyp141)	Lys157Glu
3497586	C	G	Rv3132c (devS)	silent (Ala560)
3498418	A	G	Rv3132c (devS)	Ile283Thr
3503895	C	T	Rv3137	Pro168Leu

3505005	A	C	Rv3138 (pflA)	Thr271Pro
3518167	A	G	Rv3151 (nuoG)	Ile474Met(s)
3521044	A	G	Rv3153 (nuoI)	Thr180Ala
3526986	A	G	Rv3158 (nuoN)	silent (Ala399)
3530145	C	A	Rv3161c	Asp332Tyr
3530955	C	G	Rv3161c	Val62Leu
3533759	G	A	Rv3164c (moxR3)	silent (Pro49)
3536008	G	T	Rv3167c	Pro17Gln
3555699	A	G	Rv3190c	Val(s)330Ala
3556275	A	G	Rv3190c	Leu138Pro
3557634	G	A	Rv3191c	Pro238Ser
3560645	C	T	Rv3193c	Arg843Gln
3571834	T	G	Rv3199c (nudC)	Gln237Pro
3573636	T	C	Rv3200c	Asn12Asp
3577958	A	G	Rv3202c	Val748Ala
3581414	A	G	Rv3204	Thr34Ala
3591063	T	C	Rv3213c	Lys144Glu
3597682	C	T	Rv3221c (TB7.3)	Val29Ile
3614982	T	C	Rv3239c	silent (Leu874)
3622441	A	C	Rv3243c	Val217Val(s)
3624486	T	C	Rv3244c (lpqB)	Asp142Gly
3625065	T	G	Rv3245c (mtrB)	Met(s)517Leu
3638093	G	A	Rv3257c (pmmA)	Ser206Leu(s)
3647041	A	G	Rv3266c (rmlD)	Ser257Pro
3647591	A	G	Rv3266c (rmlD)	silent (Asn73)
3658266	C	G	Rv3275c (purE)	Gly125Arg
3661802	C	T	Rv3279c (birA)	Gly71Ser
3670040	C	T	Rv3289c	silent (Ala124)
3670118	G	T	Rv3289c	silent (Gly98)
3671532	G	C	Rv3290c (lat)	Ala88Gly
3672105	G	C	Rv3291c (lrpA)	His65Asp
3678091	G	A	Rv3296 (lhr)	silent (Pro439)
3679949	A	G	Rv3296 (lhr)	Lys1059Glu
3681548	A	C	Rv3297 (nei)	silent (Arg77)
3683237	G	T	Rv3299c (atsB)	silent (Ala909)
3683715	T	G	Rv3299c (atsB)	Gln750Pro
3687372	A	G	Rv3301c (phoY1)	Leu(s)69Ser
3689523	G	T	Rv3303c (lpdA)	Cys472STOP
3690016	A	G	Rv3303c (lpdA)	Leu(s)308Ser
3693681	A	C	Rv3306c (amiB1)	silent (Ala103)
3696181	A	G	Rv3308 (pmmB)	Ser440Gly
3697708	A	G	Rv3310 (sapM)	Thr171Ala
3704261	C	A	Rv3316 (sdhC)	Leu54Ile
3704596	G	C	Rv3317 (sdhD)	Val(s)54Leu
3714211	G	T	Rv3328c (sigJ)	Pro41Gln

3714757	A	C	Rv3329	Gln122His
3718357	C	T	Rv3331 (sugI)	Pro423Leu
3721806	G	C	Rv3335c	silent (Gly265)
3770325	C	T	Rv3356c (folD)	Ala109Thr
3771628	A	C	Rv3359	silent (Ile95)
3774506	G	A	Rv3364c	silent (Gly123)
3785946	A	G	Rv3371	Arg339Gly
3786033	A	G	Rv3371	Ile368Val
3788365	T	G	Rv3373 (echA18)	STOP214Gly
3793634	A	G	Rv3379c (dxs2)	Cys412Arg
3798095	A	C	Rv3383c (idsB)	Val132Gly
3808103	T	C	Rv3392c (cmaA1)	Asn112Ser
3811629	G	A	Rv3395c	Ala3Val(s)
3815477	G	T	Rv3398c (idsA1)	silent (Ala210)
3817117	C	A	Rv3399	Ala330Glu
3823159	A	T	Rv3403c	silent (Val235)
3826684	C	T	Rv3408 (vapC47)	Ser46Leu(s)
3829770	T	C	Rv3410c (guaB3)	silent (Pro47)
3838871	A	G	Rv3420c (rimI)	silent (Ala64)
3844992	T	A	Rv3428c	Ser327Cys
3845328	T	C	Rv3428c	Met(s)215Val(s)
3845695	C	T	Rv3428c	silent (Arg92)
3851084	A	G	Rv3432c (gadB)	Ile224Thr
3859893	C	T	Rv3440c	silent (Glu28)
3864041	G	A	Rv3446c	Ala164Val(s)
3864995	T	C	Rv3447c (eccC4)	Ser1082Gly
3868738	C	A	Rv3448 (eccD4)	silent (Ile129)
3871246	T	C	Rv3450c (eccB4)	silent (Gly417)
3876953	G	A	Rv3456c (rplQ)	silent (Val160)
3877421	A	G	Rv3456c (rplQ)	silent (Pro4)
3883626	A	G	Rv3466	silent (Pro34)
3885886	T	C	Rv3468c	Ile62Val
3892671	A	G	Rv3476c (kgtP)	silent (Val350)
3893480	G	A	Rv3476c (kgtP)	Leu81Phe
3896340	T	G	Rv3479	Leu174Arg
3898408	A	G	Rv3479	silent (Ala863)
3898869	C	A	Rv3479	Thr1017Asn
3899654	C	A	Rv3480c	Arg250Leu
3909235	G	C	Rv3490 (otsA)	Val(s)334Leu
3913737	G	A	Rv3495c (lprN)	silent (Ala266)
3920109	G	T	Rv3501c (yrbE4A)	silent (Ile251)
3921094	C	T	Rv3502c	Arg316His
3922836	T	C	Rv3504 (fadE26)	silent (Asp122)
3952800	G	A	Rv3516 (echA19)	Gly86Asp
3958007	C	T	Rv3521	His163Tyr

3958403	A	G	Rv3521	Asn295Asp
3959418	C	T	Rv3522 (ltp4)	Thr324Ile
3974142	G	A	Rv3535c (hsaG)	Pro120Leu
3984321	G	A	Rv3545c (cyp125)	silent (His375)
3984926	G	A	Rv3545c (cyp125)	Leu174Leu(s)
3989914	G	T	Rv3551	Ala7Ser
3994898	A	G	Rv3555c	Trp268Arg
4003645	C	T	Rv3562 (fadE31)	Ala162Val(s)
4005114	G	C	Rv3563 (fadE32)	Trp275Ser
4005607	T	C	Rv3564 (fadE33)	Leu(s)121Leu
4008747	A	G	Rv3567c (hsaB)	Ile179Thr
4012219	T	C	Rv3570c (hsaA)	Asn18Asp
4013076	G	A	Rv3571 (kshB)	silent (Gly220)
4014431	C	T	Rv3573c (fadE34)	silent (Pro594)
4022652	G	A	Rv3580c (cysS1)	silent (Ser384)
4024079	T	C	Rv3581c (ispF)	Gln90Arg
4024273	T	C	Rv3581c (ispF)	Val25Val(s)
4026800	G	C	Rv3585 (radA)	silent (Ala119)
4026899	G	A	Rv3585 (radA)	silent (Gln152)
4028752	A	G	Rv3586	Thr288Ala
4034827	C	T	Rv3593 (lpqF)	Ala159Val(s)
4040517	A	G	Rv3596c (clpC1)	Val63Ala
4054637	A	G	Rv3614c (espD)	silent (Gly20)
4055801	G	A	Rv3616c (espA)	Thr192Ile
4058711	T	C	Rv3618	Leu(s)5Ser
4060100	G	A	Rv3619c (esxV)	Leu57Leu(s)
4067152	G	A	Rv3627c	Ala45Val(s)
4069292	G	A	Rv3630	Ala40Thr
4069797	C	T	Rv3630	Ser208Leu(s)
4077177	G	A	Rv3638	Gly65Asp
4078863	C	T	Rv3640c	Gly296Glu
4081987	G	C	Rv3644c	silent (Ala245)
4081996	G	C	Rv3644c	silent (Pro242)
4083360	T	G	Rv3645	Ile185Ser
4085200	G	C	Rv3646c (topA)	Asp686Glu
4089058	T	C	Rv3649	Leu93Pro
4095295	T	C	Rv3655c	silent (Glu2)
4096190	G	A	Rv3658c	silent (Ala250)
4105757	C	T	Rv3666c (dppA)	Arg443Gln
4106154	C	T	Rv3666c (dppA)	Glu311Lys
4107074	T	C	Rv3666c (dppA)	Gln4Arg
4111303	G	C	Rv3669	Val(s)159Val
4112429	T	C	Rv3671c	Ile363Val
4115029	G	A	Rv3673c	silent (Asp43)
4116682	T	C	Rv3676 (crp)	silent (Leu69)

4119246	T	C	Rv3679	silent (Asp157)
4126087	T	G	Rv3684	Ser217Ala
4133907	G	A	Rv3692 (moxR2)	Arg131His
4138377	A	G	Rv3696c (glpK)	Val(s)460Ala
4142689	G	A	Rv3699	Glu216Lys
4145737	A	G	Rv3703c	silent (Tyr385)
4151855	A	G	Rv3708c (asd)	silent (Pro121)
4156099	C	A	Rv3711c (dnaQ)	Val(s)211Leu(s)
4156239	A	G	Rv3711c (dnaQ)	Val164Ala
4156503	C	T	Rv3711c (dnaQ)	Gly76Asp
4158361	A	G	Rv3713 (cobQ2)	silent (Pro45)
4159195	T	C	Rv3714c	silent (Pro209)
4162339	A	G	Rv3719	Thr12Ala
4163558	G	C	Rv3719	Ser418Thr
4169719	C	T	Rv3724B (cut5b)	silent (Ala38)
4179089	C	T	Rv3729	Pro269Ser
4182695	G	A	Rv3731 (ligC)	Arg313His
4187063	G	A	Rv3736	Gly144Arg
4187485	T	C	Rv3736	silent (Ala284)
4187817	A	G	Rv3737	Asp40Gly
4200220	A	G	Rv3753c	Met(s)1Thr
4201105	G	A	Rv3754 (tyrA)	Asp229Asn
4202383	A	C	Rv3756c (proZ)	Val77Val(s)
4204441	A	G	Rv3759c (proX)	silent (His311)
4205120	A	G	Rv3759c (proX)	Leu85Pro
4210274	A	G	Rv3764c (tcrY)	Cys246Arg
4210876	T	C	Rv3764c (tcrY)	His45Arg
4215484	G	C	Rv3770c	Pro98Ala
4216255	C	G	Rv3770B	silent (Arg5)
4217557	A	G	Rv3772 (hisC2)	Thr142Ala
4221490	C	G	Rv3776	silent (Leu134)
4222073	A	G	Rv3776	Met(s)329Val(s)
4222882	A	G	Rv3777	silent (Leu63)
4232327	A	G	Rv3785	silent (Arg336)
4240671	C	T	Rv3793 (embC)	Thr270Ile
4241042	A	G	Rv3793 (embC)	Asn394Asp
4242643	C	T	Rv3793 (embC)	silent (Arg927)
4245969	C	T	Rv3794 (embA)	Pro913Ser
4247646	A	C	Rv3795 (embB)	Glu378Ala
4251297	G	C	Rv3797 (fadE35)	silent (Gly71)
4255922	A	G	Rv3799c (accD4)	silent (His9)
4257220	A	G	Rv3800c (pks13)	silent (Arg1309)
4261499	G	A	Rv3801c (fadD32)	Ala523Val(s)
4269387	T	G	Rv3806c (ubiA)	Glu149Asp
4269606	A	G	Rv3806c (ubiA)	silent (Arg76)

4275935	A	G	Rv3811	Met(s)380Val(s)
4276306	C	T	Rv3811	silent (Gly503)
4280441	C	A	Rv3815c	silent (Pro116)
4281143	C	G	Rv3816c	Val(s)143Val
4281272	G	A	Rv3816c	silent (Tyr100)
4287164	A	G	Rv3822	silent (Gly148)
4287361	C	T	Rv3822	Ala214Val(s)
4289953	A	G	Rv3823c (mmpL8)	Val(s)526Ala
4290564	G	T	Rv3823c (mmpL8)	silent (Ala322)
4290827	C	G	Rv3823c (mmpL8)	Gly235Arg
4296015	G	A	Rv3825c (pks2)	silent (Asp1197)
4296381	G	T	Rv3825c (pks2)	silent (Thr1075)
4302036	T	C	Rv3827c	Thr252Ala
4303407	A	C	Rv3829c	Ser534Arg
4306155	C	T	Rv3831	silent (Ser133)
4306339	G	T	Rv3832c	Ala158Glu
4307179	G	A	Rv3833	Val105Ile
4307344	C	G	Rv3833	Leu160Val(s)
4313128	C	T	Rv3839	Pro122Ser
4314645	A	G	Rv3841 (bfrB)	silent (Leu156)
4314843	G	A	Rv3842c (glpQ1)	silent (Asp240)
4316566	C	G	Rv3843c	Gly11Arg
4323006	G	A	Rv3848	silent (Ala227)
4334425	G	C	Rv3859c (gltB)	Gln553Glu
4337574	A	G	Rv3860	silent (Glu266)
4344058	T	C	Rv3868 (eccA1)	Ser249Pro
4356110	G	C	Rv3877 (eccD1)	silent (Leu368)
4357597	C	G	Rv3879c (espK)	Cys729Ser
4357773	G	A	Rv3879c (espK)	silent (Thr670)
4357946	C	T	Rv3879c (espK)	Gly613Ser
4366195	T	C	Rv3884c (eccA2)	Glu215Gly
4366272	G	C	Rv3884c (eccA2)	silent (Ala189)
4367649	A	G	Rv3885c (eccE2)	silent (Tyr291)
4372353	G	C	Rv3888c	silent (Arg118)
4374228	T	C	Rv3891c (esxD)	Thr49Ala
4377033	G	C	Rv3894c (eccC2)	silent (Ser1140)
4379680	C	G	Rv3894c (eccC2)	Arg258Pro
4382054	T	C	Rv3896c	silent (Ala266)
4382275	G	T	Rv3896c	Gln193Lys
4383442	T	C	Rv3897c	Ile67Val
4385187	A	G	Rv3899c	Ser65Pro
4390380	A	G	Rv3903c	Val(s)18Ala
4394210	G	C	Rv3909	Gly7Arg
4395387	A	G	Rv3909	Asn399Ser
4398732	G	A	Rv3910	silent (Leu712)

4401400	A	G	Rv3912	silent (Pro177)
4407588	T	C	Rv3919c (gid)	silent (Ala205)
4410386	G	T	Rv3922c	silent (Arg10)

Table S11: Coll SNP-based lineage and sublineage, and MDR phenotypes of isolates from the CRyPTIC Consortium whose genomes were analyzed in this study.

Lineage and sublineage	FQ S		FQ R		p-value ^a
	n	%	n	%	
Lineage 1 (L1)	28	4,1	21	7,3	0.054
MDR (% among L1)	4	(14,2)	4	(19,0)	
lineage1.1.1	3		0		
lineage1.1.1.1	13		1		
lineage1.1.2	2		7		
lineage1.1.3	0		5		
lineage1.2.1	9		0		
lineage1.2.2	1		8		
Lineage 2 (L2)	296	43,0	131	45,8	0.091
MDR (% among L2)	178	(60,1)	93	(71,0)	0.32
Lineage 2	0		1		
lineage2.1	4		0		
lineage2.2	81		21		
lineage2.2.1	6		22		
lineage2.2.10	54		39		
lineage2.2.2	6		3		
lineage2.2.3	23		12		
lineage2.2.4	9		0		
lineage2.2.5	11		3		
lineage2.2.6	26		5		
lineage2.2.7	57		9		
lineage2.2.8	2		1		
lineage2.2.9	15		12		
lineage2.2.1/lineage2.2.5	1		0		
lineage2.2.1/lineage2.2.6	0		2		
lineage2.2.10/lineage2.2.9	0		1		
lineage2.1/lineage2.2.7	1		0		
Lineage 3 (L3)	24	3,5	26	9,1	0.0013
MDR (% among L3)	9	(37,5)	7	(26,9)	
lineage3	13		23		
lineage3.1.1	6		0		
lineage3.1.2	2		0		
lineage3.1.2.1	3		3		
Lineage 4	339	49,3	100	35,0	0.01
MDR (% among L4)	155	(45,7)	48	(48,0)	0.84
lineage4	3		1		
lineage4.1	0		1		
lineage4.1.1	16		3		
lineage4.1.1.1	7		0		
lineage4.1.1.2	2		0		
lineage4.1.1.3	9		3		
lineage4.1.2	13		0		
lineage4.1.2.1	56		13		
lineage4.10	38		11		
lineage4.2.1	6		9		
lineage4.2.2	9		7		
lineage4.2.2.1	1		1		
lineage4.3	9		1		
lineage4.3.2	15		4		
lineage4.3.2.1	10		4		
lineage4.3.3	54		19		
lineage4.3.4.1	8		0		
lineage4.3.4	0		2		
lineage4.3.4.2	16		6		

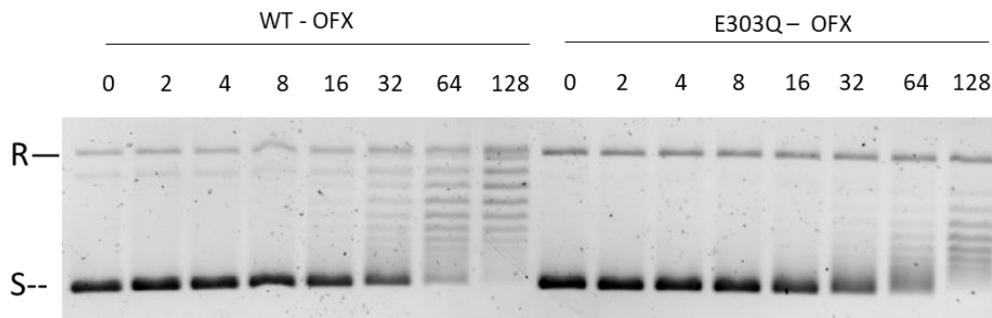
lineage4.3.4.2.1	8		0		
lineage4.4.1.1	7		1		
lineage4.4.1.2	1		1		
lineage4.4.2	14		4		
lineage4.5	30		6		
lineage4.6.2	2		1		
lineage4.6.2.2	3		1		
lineage4.8	0		1		
lineage4.2/lineage4.4.2	1		0		
lineage4.4.2/lineage4.5	1		0		
Mixed	1	0,1	8	2,8	-
MDR (% among mixed)	0	0	3	37,5	-
lineage1.1.1.1/lineage2.1	0		1		
lineage1.1.1.1/lineage2.2.7	1		0		
lineage2.2.3/lineage4.10	0		1		
lineage2.2.6/lineage4.1.1.1	0		1		
lineage2.2.6/lineage4.3.3	0		0		
lineage2.2.7/lineage3	0		1		
lineage2.2.7/lineage4	0		1		
lineage2.2.7/lineage4.2.1	0		1		
lineage2.2/lineage3	0		0		
lineage2.2/lineage4.1.1.1	0		0		
lineage2.2/lineage4.3.3	0		1		
lineage3.1.2/lineage4.1.1.1	0		0		
lineage3/lineage4.10	0		1		
lineage4.3.2.1/lineage4.3.3	0		0		
Total isolats	688		286		
Total MDR	347	50.4	155	54,2	0.55

^a. (Fisher's exact test)

Table S12: Mutations in *gyrA* and *gyrB* recovered from the two datasets of CRyPTIC isolates.

DNA Gyrase substitution	FQ S (n=688)		FQ R (n=286)	
	n	AF (%)	n	AF (%)
GyrA	5		46	
A90V	3	100	12	16-59
S91P	1	100	2	29-41
D94A			2	19-46
D94G			13	16-54
D94N	1	100	2	25-47
D94Y			2	19-27
A90V + D94A			1	31-42
A90V + D94G			5	19-58
A90V + D94H			3	25-32
S91P + D94G			1	36-54
D94G + D94H			1	46-50
D94G + D94N			2	19-53
GyrB	0		2	
D461H			1	39
T500N			1	47
GyrA + GyrB	0		3	
GyrA A90V + GyrB D461N			1	25-30
GyrA D94A + GyrB D461N			1	26-30
GyrA D94A + GyrB D461N			1	17-31
Total (% all isolates)	5 (0.7%)		51 (17.8%)	

Figure S1: Inhibitory activity of ofloxacin (OFX) on the supercoiling activity of *M. tuberculosis* WT DNA gyrase and with the substitution E303Q.



R: relaxed pBR322, S: supercoiled pBR322.

Figure S2: UPGMA dendrogram of EAI clinical strains collected at the NRC-MyRMA (n = 42). The branch length (number of SNVs by pairwise comparison) are indicated. The six FQ-R clinical strains without known FQ-R mutations in the DNA gyrase are represented in blue. The three strains for which the MfpB: T27S substitution was observed are marked by an asterisk.

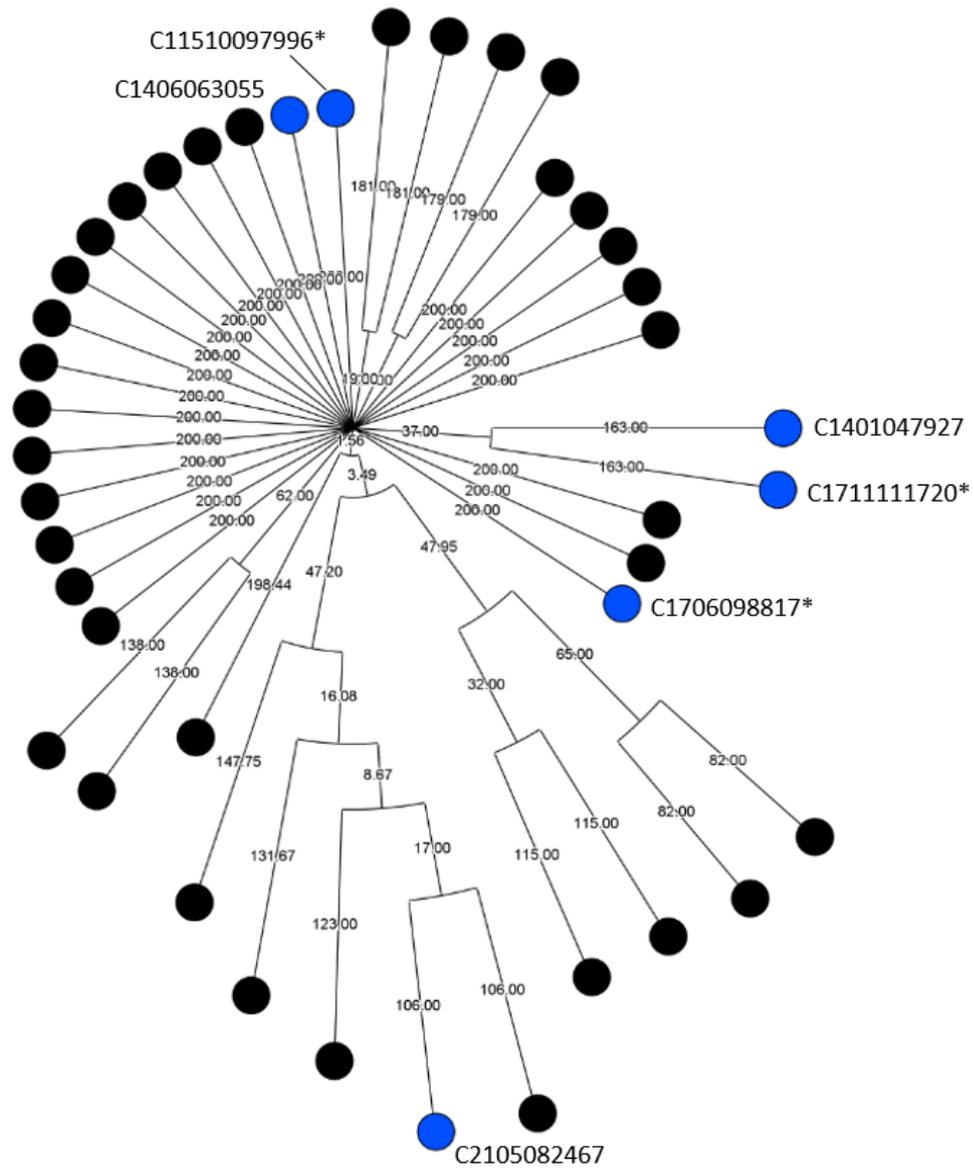
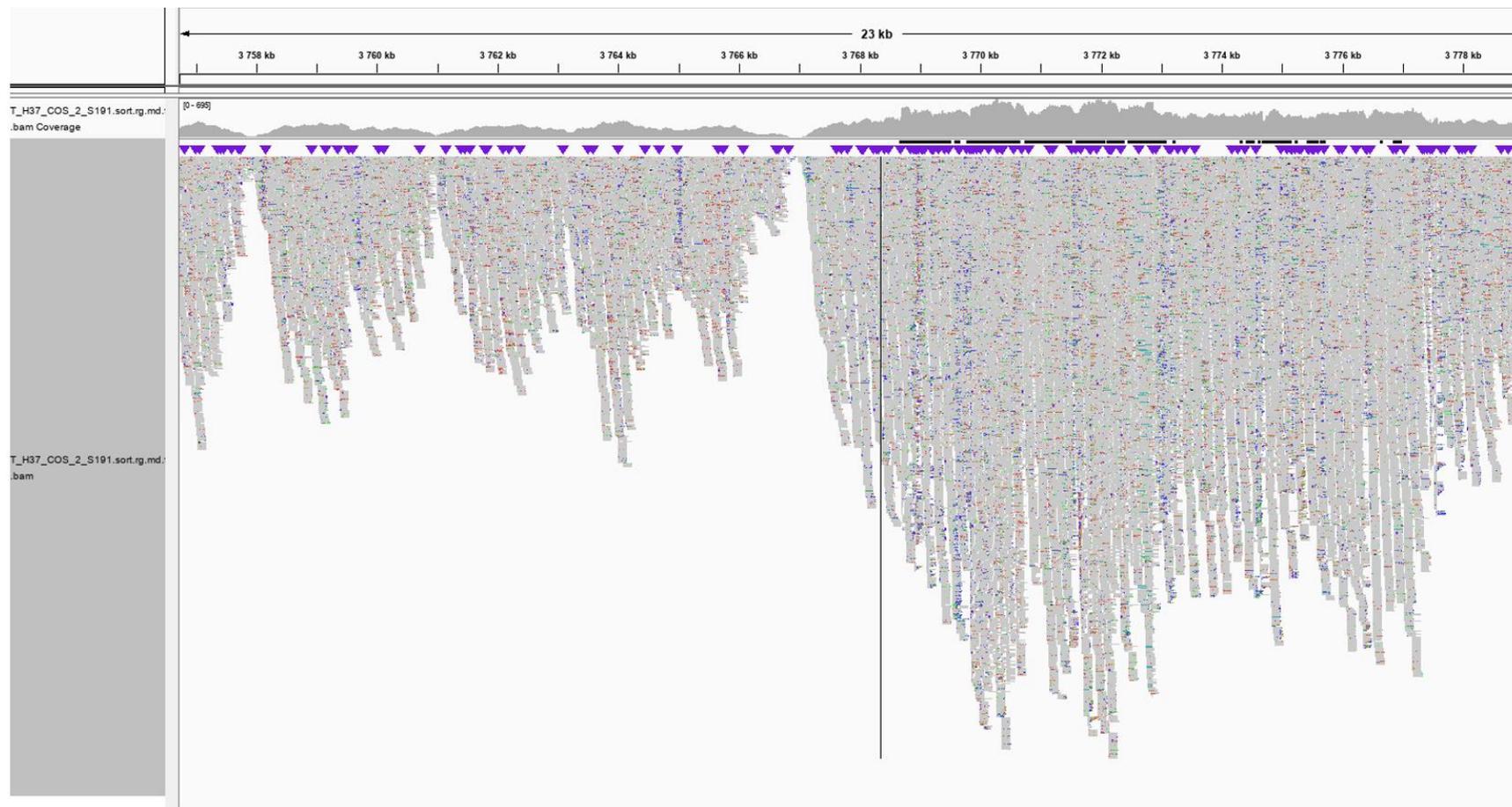


Figure S3: Coverage plot showing the integration of the cosmid DNA (insert 3768-3806 kb) in the H37Rv parental strain, by a doubling of the average coverage depth.



III. Travaux portant sur l'investigation des mécanismes moléculaires de dissémination d'un cluster particulier de souches de *M. tuberculosis* MDR

a. Contexte et objectifs

Comme nous l'avons vu dans la partie bibliographique, MTBC se caractérise sur le plan épidémiologique par une structure phylogéographique très particulière avec la description de neuf grandes lignées phylogénétiques^{57, 54 58}. Les lignées modernes (L1, L2 et L3) sont distribuées mondialement (**Figure 51**). Les lignées 2 (Est Asiatique) et 4 (Euro-Américaine) sont prédominantes et distribuées sur l'ensemble des continents. La lignée 4 est particulièrement représentée sur les continents européen, américain et africain (**Figure 51**).

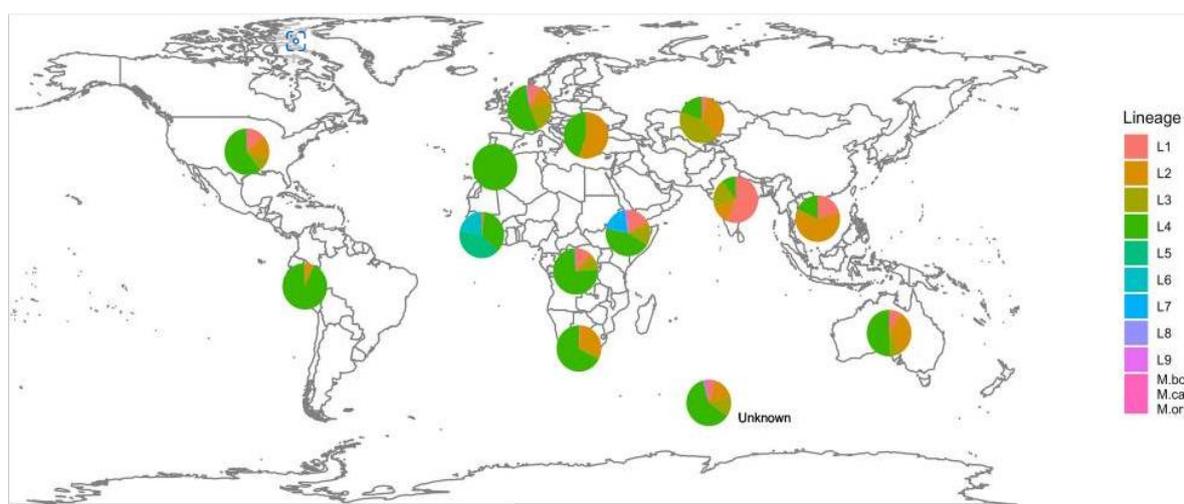


Figure 51- Répartition géographique des 35 298 souches de MTBC dont les génomes ont été analysés dans l'étude de Napier *et al.* D'après⁵⁸

La lignée 4 est une lignée complexe qui se décompose en de nombreuses sous-lignées, comprenant entre autres les clades LAM, Haarlem, T, X ou encore Ural^{54, 60} (§ 1.3.2 *Etude de la phylogénie du complexe tuberculosis*, **Tableau 1**). Comme décrit dans la partie bibliographique, il apparaît que certaines lignées semblent posséder un potentiel élevé de dissémination ainsi qu'une capacité plus importante d'acquisition de la multirésistance^{502, 503}. Cela est illustré de façon frappante par la dissémination récente du génotype W-Beijing, et plus

particulièrement du clone B0/W148 au niveau mondial, qui représente actuellement un facteur majeur de dissémination de la TB MDR ⁵⁰³, ⁵⁰².

Parmi les souches MDR/XDR collectées au CNR-MyRMA, un cluster de souches appartenant au clade T3 (lignée 4) se distinguait tout particulièrement par :

- une **appartenance au clade T3** par spoligotypage,
- le **pays de naissance des patients** était en Afrique de l'Ouest, dont la plupart en République Démocratique du Congo (RDC) ou dans en République du Congo (RC)
- la **combinaison spécifique de deux mutations associées à la résistance** : la substitution A110V dans KatG (isoniazide) et l'introduction prématurée d'un codon Stop à la position 269 d'EthA (Q269*) (éthionamide). La combinaison de ces deux mutations était exclusivement trouvée dans les souches de ce cluster au sein de la database du CNR-MyRMA.

Les premières souches de ce cluster, qu'on dénommera T3-Congo, ont été collectées au CNR-MyRMA au début des années 2000 ; la combinaison de ces deux mutations de résistance a été le premier élément qui a motivé l'investigation de ce cluster. Sa première caractérisation au CNR-MyRMA par RFLP et MIRU-VNTR a fait l'objet d'une publication par Brossier *et al.* en 2015 ⁵⁰⁴.

b. Caractéristiques des souches étudiées

Les génomes de 17 souches collectées sur une période de 18 ans (2004-2022) et appartenant au cluster ont pu être séquencés. Les caractéristiques épidémiologiques, cliniques et microbiologiques de ces souches sont présentées dans le tableau 16. Les patients étaient quasiment tous de sexe masculin et nés en RDC ou en RC.

La caractérisation génotypique et phénotypique (méthode des proportions) de la résistance aux antituberculeux a montré que tous les isolats du cluster étaient MDR, avec une résistance ajoutée à l'éthionamide. Les mutations associées à la résistance aux antituberculeux étaient : RpoB S450L (rifampicine), KatG-A110V (isoniazide), *fabG-inhA* : c-15t (isoniazide et éthionamide) et EthA Q269* (éthionamide). Le génotypage des souches par spoligotypage a montré qu'elles appartenaient toutes au clade T3, en revanche, l'analyse par MLVA MIRU-VNTR 24 loci a mis en évidence que toutes les souches appartenaient à l'haplotype 677-66 sauf 3 souches (C7 et C15 avaient 2 MIRU de différence et C12 1 seul) (**Tableau 10**).

Tableau 10- Données épidémiologiques, cliniques et microbiologiques relatives aux souches du cluster.

Isolat	Année ^a	Pays de naissance	Sexe	Age ^b	VIH	ATCD TB	Date d'arrivée en France	Forme clinique	Laboratoire d'origine	Prélèvement	EM	MIRU-VNTR 24 loci
C1	2011	RC	M	30	neg	non	NC	Pulmonaire	Nanterre	Respiratoire	pos	677-66
C2	2013	Cameroun	M	18	NC	NC	1997	Pulmonaire	Avicenne	Respiratoire	pos	677-66
C3	2013	RDC	M	32	NC	non	NC	Pulmonaire	Béclère	Respiratoire	pos	677-66
C4	2004	RDC	M	NC	NC	NC	NC	NC	Fresnes	NC	NC	677-66
C5	2007	RDC	M	40	pos	non	1994	Mixte	VSG	Respiratoire	neg	677-66
C6	2012	RC	F	24	neg	non	NC	Pulmonaire	Cochin	Respiratoire	neg	677-66
C7	2007	RDC	M	29	neg	oui	NC	Pulmonaire	Mulhouse	Respiratoire	pos	?-66
C8	2008	NC	M	32	NC	NC	NC	Pulmonaire	Henri Mondor	NC	NC	677-66
C9	2010	Angola	M	41	neg	non	1999	Pulmonaire, ORL, spondylodiscite	Lariboisière	Masse rétropharyngée	pos	677-66
C10	2016	Angola	M	39	neg	NC	NC	Pulmonaire	Corbeil	Respiratoire	neg	677-66
C11	2006	Angola	M	15	neg	non	2001	Pulmonaire	Pontoise	Respiratoire	pos	677-66
C12	2008	Côte d'Ivoire	M	37	neg	non	NC	Péricardique	PSL	Liquide péricardique	neg	11431-66
C13	2007	RDC	M	30	neg	NC	NC	Pulmonaire	Tenon	Respiratoire	pos	677-66
C14	2004	RDC	M	43	NC	NC	NC	NC	Pontoise	NC	NC	677-66
C15	2010	RC	M	38	pos	NC	NC	ganglionnaire	KB	Ganglion	NC	?-431
C16	2009	RDC	M	47	neg	non	1982	ganglionnaire	Paul Brousse	Ganglion	neg	677-66
C17	2022	RC	M	41	neg	non	1990	Pulmonaire + abcès sous cutané	Béclère	Respiratoire	pos	677-66

^a Année d'isolement de la souche

^b Age au diagnostic

Abréviations : ATCD : antécédent ; EM : examen microscopique ; KB : Kremlin Bicêtre ; NC : non connu ; neg : négatif ; pos : positif ; PSL : Pitié-Salpêtrière ; RC : République du Congo ; RDC : République Démocratique du Congo ; TB : tuberculose ; VSG : Villeneuve Saint George

c. Analyse génomique

Afin de réaliser le séquençage du génome complet, les isolats ont été repiqués sur milieu LJ. L'ADN génomique a été extrait sur l'automate MagNA Pure (Roche), après traitement de l'échantillon par la protéinase K et le lysozyme. Le WGS a été effectué par séquençage Illumina en *paired-end* sur NextSeq550, sur la plateforme P2M de l'Institut Pasteur. La préparation des bibliothèques a été réalisée avec le kit Nextera XT selon les recommandations du fabricant. Les données brutes issues du séquençage ont été déposées sur NCBI (Sequence Read Archive, PRJNA533314). L'analyse bio-informatique a été réalisée au moyen de deux pipelines d'analyse : BioNumerics-7 et scripts maison. Concernant le pipeline « maison », la qualité des *reads* a été contrôlée en utilisant FastQC (version 0.11.7). Le *trimming* a été réalisé avec sickle, en filtrant notamment les bases avec un Phred score < 30. L'alignement a ensuite été réalisé par *mapping* sur le génome de référence H37Rv (GenBank accession AL123456.3) en utilisant l'algorithme de BWA-MEM. La qualité du *mapping* a été contrôlée avec samtools (v. 1.9) et qualimap (v 2.2.2). L'appel des variants a été réalisé avec GATK HaplotypeCaller en respectant les *best practices* de GATK pour ne conserver que les variants de haute qualité. Que ce soit sur BioNumerics ou avec le pipeline maison, les variants dans les régions répétées de type PE/PPE ont été exclus de l'analyse. Les variants identifiés ont ensuite été contrôlés manuellement par visualisation sur *Integrative Genomics Viewer* (Broad Institute). Les dendrogrammes utilisant la méthode UPGMA ont été construits sur BioNumerics-7.

A l'issue de l'analyse des données des 17 génomes, la couverture moyenne était de 99,3% et la profondeur moyenne de 122X (74-278X). Le dendrogramme construit à partir des séquences génomiques de 155 isolats appartenant à la lignée 4 de la database du CNR-MyRMA est montré dans la **Figure 52**. L'analyse de celui-ci a permis de mettre en évidence que les isolats du cluster T3-Congo partageaient un faible nombre de SNV d'écart entre eux ($n = 7$) en *pairwise comparison*, bien que ceux-ci aient été isolés sur une longue période. Un maximum de 5 SNV séparait les isolats les plus anciens (C4, 2004) de l'isolat le plus récent (C17, 2022). Plus surprenant, les isolats C1 à C5, isolés de 2004 à 2018, ne présentaient aucun SNV d'écart. Ces résultats semblent montrer une vitesse d'évolution plus lente des isolats du cluster T3-Congo que celle décrite pour *Mtb*, évaluée à 0.3-0.5 SNV/génome/an basée sur le concept d'« horloge moléculaire » et définie par les résultats convergents de plusieurs études génomiques⁵⁴. Plus récemment, l'étude d'Ortiz Torres *et al* a estimé la vitesse d'évolution de la lignée 4 à 0.299 SNV/génome/an⁵⁰⁵.

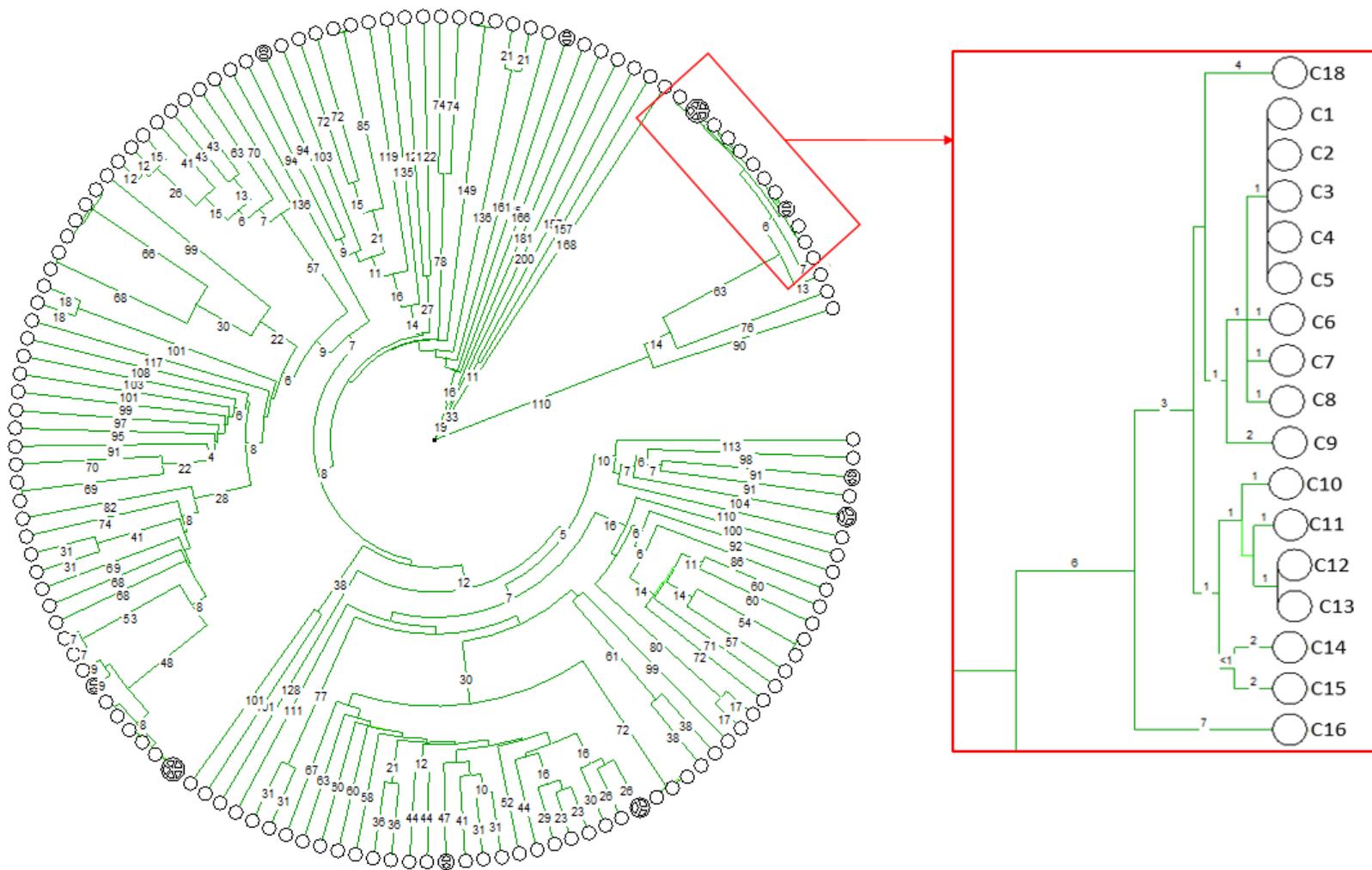


Figure 52- Dendrogramme UPGMA de 155 génomes de souches appartenant à la lignée 4 (database CNR-MyRMA). Le cluster T3-Congo est encadré en rouge, avec un focus sur celui-ci présenté à droite. La distance en nombre de SNV est indiquée sur les branches. La numérotation des souches du cluster correspond à celle utilisée dans le Tableau 10.

Un total de 1517 SNV et 184 InDels ont été trouvés comparativement au génome de référence H37Rv pour les isolats du cluster T3-Congo. Après filtration des SNV localisés dans les PE/PPE, 762 SNV ont été retenus pour l'analyse. Parmi ceux-ci, huit SNV et deux InDels étaient identifiés spécifiquement et de façon commune au sein des souches du cluster (**Tableau 11**).

Les deux InDels correspondaient à (i) une délétion dans le gène *lipO* qui code une probable esterase⁵⁰⁶, et (ii), une insertion dans Rv2052c, qui code une protéine de fonction inconnue⁵⁰⁶.

Sept des huit SNV spécifiques du cluster T3-Congo correspondaient à des changements de type gc->at (cytosine déamination) ou gc->ta (formation de 8-oxoguanine), qui constituent des signatures des dommages causés par le stress oxydatif sur l'ADN^{507,508}.

De plus, parmi les SNV, on trouvait la combinaison des substitutions KatG-A110V et EthA-Q269*, également en lien avec le stress oxydatif. En effet, ces deux mutations entraînent des modifications de fonctions redox clés chez *Mtb*. La mutation Q269* conduit à une protéine tronquée avec une perte de la fonction monooxygénase indispensable au mécanisme de détoxification au sein du macrophage ; la substitution KatG-A110V a été décrite par Brossier *et al.* comme entraînant une augmentation d'un facteur 2 de l'activité peroxydase avec une activité catalase conservée⁵⁰⁹. On peut ainsi émettre l'hypothèse que la substitution KatG-A110V serait compensatrice du défaut de fonction monooxygénase dû à la substitution EthA-Q269*.

Deux autres SNV présentaient un intérêt particulier : (i) une mutation non synonyme dans *echA14*, qui code une enoyl-CoA hydratase, impliquée dans la voie de synthèse des lipides membranaires, et (ii) une mutation située 31 pb en amont du gène *espK*, qui est situé dans le locus *esx-1*⁴⁵¹ (**Figure 53**).

Tableau 11- Variants communs et spécifiques aux isolats du cluster.

Nucléotide	Position génomique	Type	Localisation	Gène	Identifiant	AA	Fonction de la protéine
c->a	761557	NS	CDS	<i>rpoB</i>	Rv0667	S450L	ARN polymérase RpoB
g->a	2155783	NS	CDS	<i>katG</i>	Rv1908c	A110V ^a	Catalase-peroxydase KatG
g->c	2795021	NS	CDS	<i>echA14</i>	Rv2486	E224D	Probable enoyl-CoA hydratase
g->a	2991199	S	CDS	-	Rv2675c	A246A	Inconnue
g->a	3721728	-	<i>upstream gene</i>	-	Rv3337	-	Inconnue
g->t	4287731	NS	CDS	-	Rv3822	L337F	Inconnue
g->a	4326669	stop	CDS	<i>ethA</i>	Rv3854c	Q269 ^{*a}	Monooxygénase EthA
c->t	4359813	-	<i>upstream gene</i>	<i>espK</i>	RV3879c	-	ESX-1 secretion-associated protein
ag->a	1601954	Del avec FS	CDS	<i>lipO</i>	Rv1426c	-	Probable estérase LipO
a->ac	2311409	Ins avec FS	CDS	-	Rv2052c	-	Inconnue

^a Les substitutions KatG-A110V et EthA-Q269* étaient trouvées dans l'ensemble des isolats du cluster T3-Congo.

AA : acide aminé ; CDS : région codante ; Del : délétion ; FS : *frameshift* (décalage du cadre de lecture) ; Ins : insertion ; NS : non synonyme ; S : synonyme ; SNV : *single nucleotide variant*

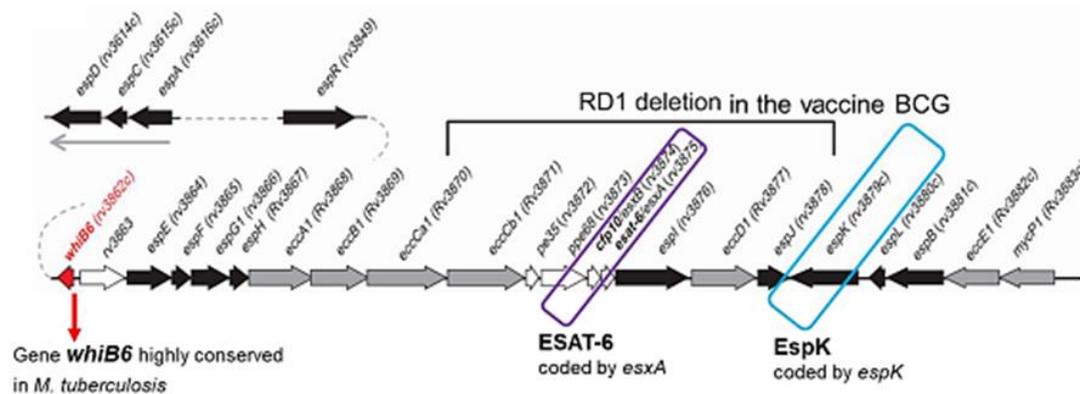


Figure 53- Représentation schématisée du locus *esx-1* chez *Mtb*; *esxA* qui code ESAT-6 ainsi que *espK* sont encadrés en violet et en bleu respectivement. D’après ⁴⁵⁷.

Nous avons alors choisi de nous intéresser plus particulièrement à cette dernière mutation, du fait de sa localisation dans *esx-1*, qui code un système de virulence clé de *Mtb*, comme détaillé dans la partie bibliographique (§ 3.2.1 **Système ESX-1**). EspK est une protéine de 75 kDa ; elle fait partie de la famille des *alanine- and proline-rich ESX-1-associated proteins*, avec un motif W-X-G conservé. EspK est référencée comme facteur de virulence dans la Virulence Factor Database ⁵¹⁰.

Plusieurs données ont apporté des précisions sur le rôle d’EspK dans la virulence chez *Mtb*, dont une étude publiée récemment ⁵¹¹. Dans cette étude, une souche de *Mtb* avec une inactivation d’*espK* a été créée par l’insertion d’un transposon (*espK::Tn*). Le défaut de production d’EspK chez *Mtb* semblait uniquement affecter la sécrétion d’EsxA et d’EspB *in vitro*. En effet, comparativement à la souche sauvage, il était observé une diminution et un retard de la sécrétion d’EsxA, sans aller jusqu’à l’absence complète de sécrétion comme ce qui a été observé pour EspB. Par contre, la capacité de destruction de macrophages THP-1 du mutant *espK::Tn* n’était pas affectée comparativement à la souche sauvage, de même que sa capacité de répllication *in vivo* dans un modèle murin, comme ce qui avait été montré chez *M. bovis* ^{512, 513}. L’ensemble de ces résultats sont en accord avec les observations d’études précédentes menées chez *Mtb* ^{454, 514}.

Le deuxième résultat de cette étude est la mise en évidence de la localisation cellulaire d’EspK, au niveau de la paroi, sans sécrétion extracellulaire, contrairement à ce qui avait été montré chez *M. marinum* ⁵¹⁵, et contrairement à EsxA, EsxB ou EspB. La traversée de la membrane cytoplasmique d’EspK était indépendante d’EsxA et d’EsxB chez *Mtb*, ce qui fait un autre élément différent de ce qui avait été observé chez *M. marinum* ⁵¹⁵. Enfin, cette étude montrait

que l'interaction entre EspB et EspK nécessitait la présence du motif conservé W-X-G, et que cette interaction permettait d'empêcher un assemblage précoce d'EspB en intracellulaire. Ainsi, on peut émettre l'hypothèse qu'EspK aurait le rôle de protéine chaperon pour EspB. On peut supposer qu'en l'absence d'EspK, l'assemblage d'EspB en structure oligomérique au sein du bacille tuberculeux pourrait empêcher sa sécrétion par ESX-1 du fait d'une taille trop importante et/ou de sa conformation.

La mutation observée de façon commune et spécifique aux souches du cluster étant située 31 bp en amont d'*espK*, nous avons voulu étudier sa présence putative dans la région promotrice d'*espK*, dans un premier temps par une approche *in silico*.

d. Etude *in silico* de la localisation de la mutation en amont d'*espK* dans la région promotrice

La prédiction de promoteur chez *Mtb* et chez les mycobactéries au sens large est très complexe, car les promoteurs sont de nature et de localisation très variables⁵¹⁶. Afin d'explorer l'hypothèse de la localisation de la mutation c-31t au sein du promoteur d'*espK*, nous avons d'abord réalisé une étude comparative avec d'autres régions promotrices connues et publiées chez *Mtb*, à savoir les promoteurs de *fabG-inhA* et d'*eis* (**Figure 54**Erreur ! Source du renvoi introuvable.). On peut voir que la position et la nature (c->t) de la mutation située en amont d'*espK* étaient similaires à celles de mutations connues dans la région promotrice de *fabG-inhA* et d'*eis*.

L'outil de prédiction de promoteur G4PromFinder a ensuite été utilisé⁵¹⁷. Cet outil bio-informatique basé sur la détection des motifs G-quadruplex a été choisi car il est adapté pour l'analyse de bactéries à haut GC% telles que *Mtb*. Nous avons préalablement testé l'algorithme avec des promoteurs de *Mtb* connus et publiés, tels que le promoteur du gène *eis*⁵¹⁸. L'analyse conduite avec G4Promfinder a mis en évidence que la mutation que nous avons caractérisée était située dans une région promotrice putative (**Figure 54**Erreur ! Source du renvoi introuvable.).



Figure 54- Comparaison des régions promotrices des gènes *eis*, *fabG-inhA* (promoteurs publiés) et de la région promotrice putative d'*espK*. Les codons start sont surlignés en vert et les RBS en violet. Le TSP est marqué par une flèche. En rouge et en majuscule sont notifiés les nucléotides mutés, avec la position de deux mutations connues comme associées à la résistance (c-15t *fabG-inhA* pour l'isoniazide et l'éthionamide et c-14t *eis* pour la kanamycine). La région promotrice prédite par G4Promfinder en amont d'*espK* est surlignée en bleu. On peut voir qu'elle comprend la mutation située 31 pb en amont d'*espK*.

RBS : *ribosome binding site* ; TSP : *transcriptional start point*.

Suite à ces résultats, nous avons cherché à évaluer l'impact de la mutation c-31t sur le niveau de transcription d'*espK*, mais également sur celui d'*esxA*. Pour cela, nous avons utilisé un protocole de RT-qPCR.

e. Etude de la transcription d'*espK* et d'*esxA* par RT-qPCR

Nous avons réalisé des expériences de RT-qPCR avec deux protocoles successifs, afin d'évaluer si la mutation *espK* c-31t avait un impact sur le niveau de transcription, non seulement d'*espK*, mais aussi d'*esxA*.

Le premier protocole consistait à réaliser la RT-qPCR *espK* et *esxA* sur quatre souches :

- H37Rv,
- CDC 1551 : souche décrite comme « hypervirulente »,
- la souche C9 appartenant au cluster T3-Congo (**Tableau 10**),
- une souche « témoin » (Tem1) appartenant à la même lignée mais hors du cluster T3-Congo.

Pour cela, les souches ont été mises en culture dans les mêmes conditions d'incubation (milieu 7H9 additionné de 10% d'OADC). L'ARN total a ensuite été extrait en phase logarithmique de croissance ($DO_{600\text{ nm}}$ env. 0,6) selon un protocole utilisant du trizol et du chloroforme. La *reverse* transcription a été réalisée ensuite en utilisant 2 μg d'ARN pour chaque échantillon, afin d'obtenir 2 μg de cDNA.

La qPCR temps réel a été conduite sur ABI PRISM® 7000 (Applied Biosystems) en utilisant du SYBR green. Trois cibles ont été utilisées : un gène rapporteur (*ftsZ*), *espK* et *esxA*. Les résultats obtenus ont été normalisés sur ceux obtenus pour le gène rapporteur. Chaque échantillon a été passé en double. L'analyse des courbes de fusion permettait de s'assurer de la spécificité de l'amplification. Un contrôle négatif était intégré à chaque qPCR. Pour l'analyse, une courbe était générée à partir d'un cDNA témoin dilué de 2 en 2 permettant de calculer l'efficacité de la qPCR et le R² (paramètres de qualité de la qPCR). Les ratios d'expression des différentes cibles ont été calculés grâce à l'équation de Pfaffl, qui permet de pondérer les résultats en fonction de l'efficacité de la qPCR (la souche H37Rv étant utilisée comme contrôle) :

$$\text{ratio} = \frac{(E_{\text{target}})^{\Delta\text{CP}_{\text{target}}(\text{control} - \text{sample})}}{(E_{\text{ref}})^{\Delta\text{CP}_{\text{ref}}(\text{control} - \text{sample})}}$$

Les résultats de ce premier protocole de qPCR ont montré (**Figure 55**) :

- un niveau de transcription d'*esxA* le plus élevée pour la souche hors cluster (Tem1), suivi de la souche virulente de référence CDC 1551, et de la souche C9 appartenant au cluster T3-Congo (et possédant la mutation *espK* c-31t).
- un niveau de transcription d'*espK* le plus élevé pour la souche CDC 1551, suivi de la souche C9, puis de la souche Tem1.

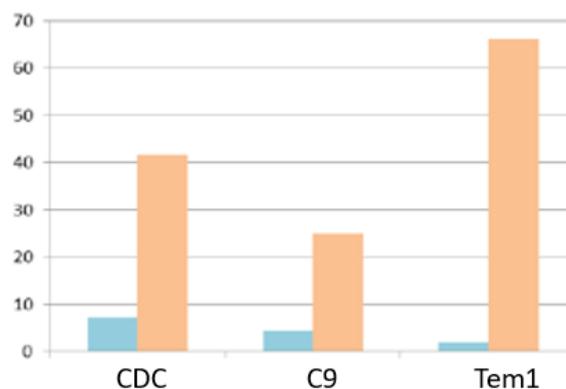


Figure 55- Résultats obtenus à l'issu du 1^{er} protocole de qPCR pour les gènes *espK* (en bleu) et *esxA* (en orange)

Afin d'étoffer ces résultats, nous avons conduit une analyse en triplicat de culture avec un deuxième protocole, en utilisant plus de souches :

- H37Rv,
- 3 souches appartenant au cluster T3-Congo : C6, C9 et C15 (**Tableau 10**),
- 3 souches « témoin » de la lignée 4 mais hors cluster : Tem1, Tem2 et Tem3.

Les cultures ont été réalisées en triplicat pour chaque souche, dans les mêmes conditions que le protocole n°1. L'extraction de l'ARN total, la *reverse* transcription, et les étapes de RT-qPCR ont été conduites de la même manière. Nous avons malheureusement rencontré des problèmes de reproductibilité entre les triplicats pour les résultats de qPCR pour l'isolat Tem3, dont les résultats ont été exclus de l'analyse. Les résultats obtenus à l'issue de ce deuxième protocole sont présentés dans la **Figure 56**.

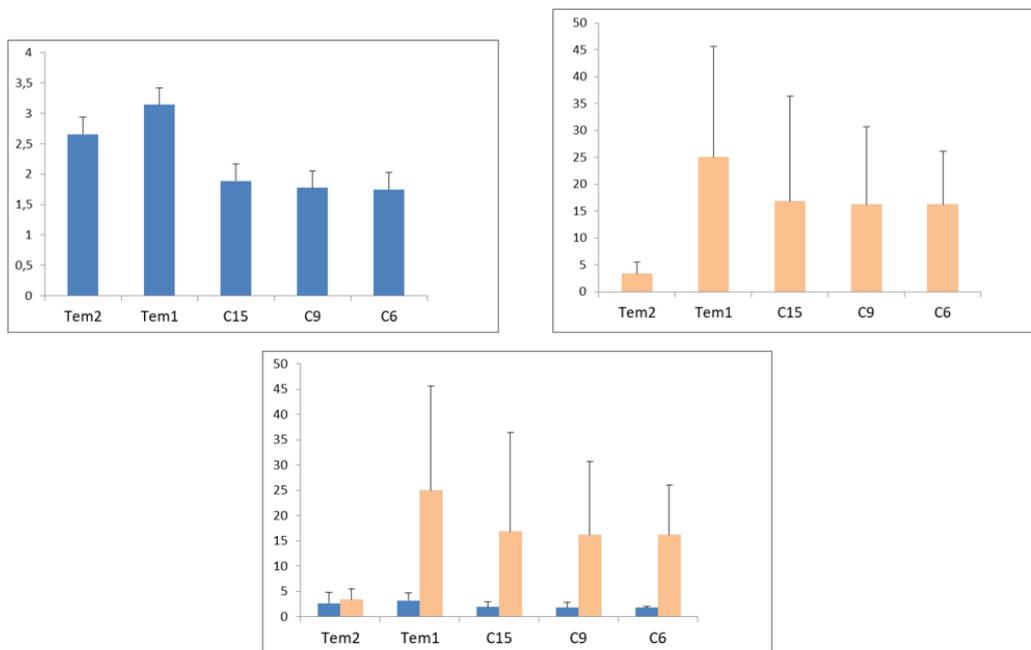


Figure 56-Résultats obtenus à l'issue du 2^{ème} protocole de qPCR pour les gènes *espK* (en bleu) et *esxA* (en orange) (moyenne des triplicats et déviation standard).

Ces résultats montrent un niveau de transcription d'*espK* et d'*esxA* homogène entre les trois souches appartenant au cluster T3-Congo. Les résultats obtenus pour les deux souches témoins appartenant à la lignée 4 mais hors cluster T3-Congo sont assez hétérogènes, notamment en ce qui concerne le niveau de transcription d'*esxA*. Cela illustre la difficulté du choix de la souche témoin. Pour les souches du cluster T3-Congo et la souche Tem1, le niveau de transcription d'*espK* apparaît être corrélé à celui d'*esxA*.

f. Conclusion et perspectives

L'étude du cluster particulier de souches de *Mtb* MDR T3-Congo a permis de mettre en évidence : (i) une vitesse d'évolution plus lente au sein de celui-ci que pour *Mtb* en général, (ii) des mutations spécifiques en relation avec le stress oxydatif, et (iii) une mutation spécifique dans le système de virulence clé de *Mtb*, ESX-1. L'ensemble de ces éléments pourraient être liés entre eux, les mutations identifiées exclusivement dans ce cluster (en comparaison avec la database de 900 génomes du CNR-MyRMA) pouvant concourir à un impact sur la virulence/la résistance au stress oxydatif des souches de ce cluster.

A l'issue de ces premiers résultats, les perspectives envisagées sont les suivantes :

- compléter les données de RT-qPCR avec les cibles *whiB6*, *phoP* liées à l'expression d'*esxA* et ajouter les souches CDC1551 et H37Ra,
- séquencer les génomes des souches du cluster par une technique long-read type nanopore afin d'explorer les mutations au niveau des PE/PPE. En effet, les souches C1 à C5 du cluster qui ne présentent aucun SNV d'écart par séquençage Illumina, pourraient présenter des SNV de différences au niveau de ces régions du génome,
- étudier le transcriptome et le protéome des souches du cluster T3-Congo.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Ce projet s'inscrit dans les thématiques développées par l'équipe d'accueil (EDIRA, Cimi-Paris) en étroite collaboration avec le CNR-MyRMA, en particulier pour améliorer le diagnostic de la résistance aux antituberculeux (Publications 4 à 9). Ce travail répond aussi à la volonté de l'équipe de développer et d'accroître l'utilisation des approches génomiques au laboratoire, y compris vers des thématiques nouvelles comme l'investigation des bases moléculaires de la dissémination de certains clones à succès (étude du cluster T3-Congo).

Les résultats obtenus nous ont permis d'avancer sur plusieurs points relatifs aux objectifs de ma thèse. Nous avons montré (i) que des duplications contenant l'opéron *mfpAE* étaient impliquées dans la résistance aux FQ chez *Mtb*, (ii) que le diagnostic moléculaire de la résistance nécessitait d'être amélioré, en particulier en intégrant des analyses non réalisées aujourd'hui en pratique courante (recherche de variants structuraux notamment...), et (iii), qu'apporter la preuve expérimentale de l'implication de variants génétiques dans la résistance aux antituberculeux ou dans le succès de la dissémination de certains clones était complexe.

L'un des résultats majeurs de ces travaux de thèse est la mise en évidence d'un mécanisme original et jamais décrit comme impliqué dans la résistance chez *Mtb*, à savoir la présence de duplications génomiques massives dans la portion du génome comprise entre 3000 et 4000 kb (Publication 9) (Figure 57).

La présence de duplications de grande taille a été peu décrite chez les mycobactéries ; lorsqu'elle l'a été c'était dans le cadre d'analyses d'évolution génomique ou d'impact sur la virulence, sans mention du profil de sensibilité aux antibiotiques des souches décrites.

La raison principale du faible nombre d'études rapportant la présence de duplication de grande taille chez *Mtb* est due au fait que la recherche de variants par approche génomique chez les mycobactéries d'intérêt médical, et en particulier pour *Mtb*, se concentre principalement sur la recherche de SNV et de petits InDels. La recherche de variants structuraux tels que les duplications de grande taille fait appel à d'autres types d'analyses, fastidieuses, basées sur

l'analyse de la profondeur de couverture, qui nécessite une visualisation génome par génome, ou basées sur l'étude des *read-pair* en cas de WGS réalisé en *paired-end* ^{297, 519}.

Au sein de MTBC, c'est chez la souche vaccinale *M. bovis* BCG que la présence de duplications de grande taille est la mieux connue et bien décrite ⁵²⁰ ; il s'agit de deux duplications en tandem, DU1 et DU2. La première, DU1, d'environ 29,7 kb, est restreinte à la souche BCG Pasteur et couvre l'origine chromosomique de réplication, *oriC*. Concernant DU2, quatre variants (DU2-I à DU2-IV), de tailles variables, ont été décrits dans les différentes souches vaccinales ; ces variants sont issus de remaniements génétiques successifs ⁵²⁰ (**Figure 57**). En termes de position génomique, les quatre variants de DU2 se chevauchent, sur la région comprise entre les positions génomiques 3 684 229 et 3 690 127 (positions du génome de *Mtb* H37Rv). Cette portion d'environ 5,9 kb, contient entre autres le gène *glpD2*, qui code une glycerol-3-phosphate déshydrogénase (**Figure 57**) ; à noter que ce gène est absent des duplications décrites dans la **publication 9**. La duplication de ce gène conduirait ainsi à un avantage sélectif pour la croissance en milieu contenant du glycérol, celui-ci étant utilisé dans le milieu de préparation du vaccin. Ainsi, il a été pensé que ce mécanisme de duplication de grande taille était un mécanisme adaptatif pour la croissance *in vitro*, notamment en présence de glycérol ⁵²⁰. De la même manière, une duplication de 56 kb a été rapportée chez la souche de référence de *M. smegmatis* mc²155 ⁵²¹.

Des duplications de taille encore plus grande, voire massives (de taille variant de 280 à 530 kb, soit plus de 10% de la totalité du génome), ont été décrites dans de rares souches cliniques de la lignée 2 et 4 ^{522,523,524} (**Figure 57**). **Ces duplications, mises en évidence *in vitro*, étaient instables et perdues après passage *in vivo* dans un modèle murin, et avaient un impact négatif sur la virulence des souches**, que l'amplification génomique soit due à une duplication d'une grande portion du génome ou à un mécanisme d'amplification « en accordéon », comme observé chez un mutant délété pour la région *esxGH* (38 à 60 copies -région de 2.5 kb localisée au sein du locus *esx-3*) ^{523,522,525}. Ce résultat est particulièrement intrigant puisque, dans notre contexte, la duplication a été acquise *in vivo*. En analysant les différences entre les duplications décrites par Domenech *et al.* et celles que nous observons, un rôle du régulon *dosR* dans ces différences de stabilité *in vitro/in vivo* peut être suspecté. En effet, de façon intéressante, les duplications observées dans mon travail de thèse (**Publication 9**) concernaient la même région (3 000 – 4 000 kb), suggérant une plasticité et instabilité particulière de cette portion du génome de *Mtb* (**Figure 57**). Cependant, les duplications que nous avons observées dans les souches FQ-R sélectionnées *in vivo*, ne comprenaient pas le régulon *dosR*, qui régule l'une des stratégies

de virulence de *Mtb*, à savoir la dormance ⁵²⁶. Il est à noter que le régulon *dosR* n'est pas non plus présent dans les quatre variants de DU2 décrits chez les souches vaccinales de *M. bovis* BCG ⁵²⁰ (**Figure 57**). De plus, les bacilles en phase de dormance sont souvent tolérants à de nombreux antibiotiques en raison de leur métabolisme réduit. Les deux types de duplications de 89 et 180 kb et celles décrites chez certaines souches cliniques ^{523,522}, contrairement à DU2 chez *M. bovis* BCG, comprenaient cependant le gène *dnaE2*, qui code une enzyme clé, la polymérase DnaE2, qui est impliquée dans la génération de mutations en condition de stress ⁵²⁷. En effet, en cas de stress oxydatif, la DnaE2 est activée pour réparer l'ADN endommagé, mais sa faible fidélité favorise la génération de mutations ⁵²⁷. Il a également été rapporté que l'expression de la DnaE2 augmentait fortement après exposition aux antibiotiques, notamment à la ciprofloxacine ^{528, 529}. On peut ainsi supposer que l'augmentation d'expression liée à la duplication pourrait favoriser l'acquisition de mutations chez *Mtb*, et ainsi augmenter sa faculté d'adaptation par un maintien du fitness.

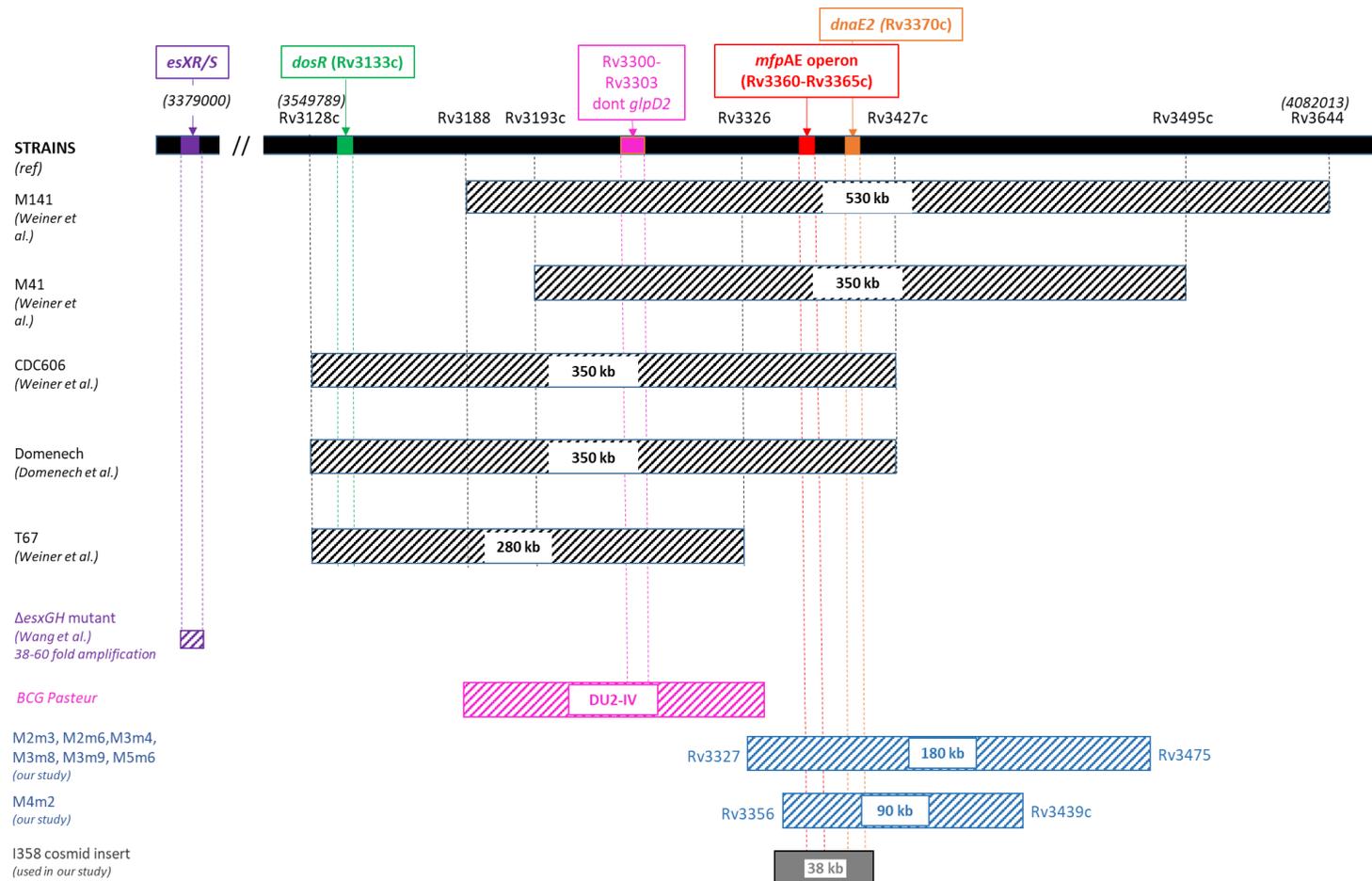


Figure 57- Duplications de grande taille décrites chez MTBC : au sein de souches cliniques (en noir), chez un mutant délété pour *esxGH* (en violet), chez la souche vaccinale *M. bovis* BCG Pasteur (en rose), et dans ce travail de thèse (souches sélectionnées *in vivo* dans un modèle murin d'infection tuberculeuse, publication 9, en bleu). Des régions particulières sont représentées en couleur : le régulon *dosR* (en vert), la portion trouvée dans tous les variants de DU2 chez *M. bovis* BCG (Rv3300-Rv3303 (numérotation *Mtb*), en rose), l'opéron *mfpAE* (en rouge), et le gène *dnaE2* (en orange). L'insert de 38 kb du cosmide I358 utilisé dans ces travaux de thèse (Publication 9) est représenté en gris.

Figure construite d'après les données publiées par Weiner *et al.*⁵²⁴, Domenech *et al.*⁵²², Wang *et al.*⁵²⁵ et Brosch *et al.*⁵²⁰.

Aucune donnée de sensibilité phénotypique aux antituberculeux, y compris aux FQ, n'était disponible dans les publications rapportant des duplications ^{523,522,524}. **Cependant, l'implication de duplications de grande taille et en tandem dans la résistance aux antibiotiques a été mise en évidence chez d'autres bactéries d'intérêt médical, en particulier chez les bactéries à Gram négatif (*E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* et *Acinetobacter baumannii*)** ^{530, 531}. Les points communs de ces duplications étaient d'être transitoires et présentes de façon hétérogène dans la population. Par exemple, chez *Salmonella*, ce phénomène de duplication en tandem a été décrit comme impliqué dans la résistance hétérogène à la colistine. Ces duplications étaient de grande taille et concernaient une portion précise du chromosome ; plusieurs tailles de duplications étaient observées (jusqu'à 300 kb), avec un chevauchement commun d'une région de 47 kb contenant les gènes impliqués dans la résistance à la colistine. De façon intéressante, ces duplications étaient instables, et en l'absence d'exposition à la colistine, étaient présentes à un faible pourcentage dans la population (10% environ) ⁵³¹. Il est intéressant à la lumière de ces données de noter que les duplications que nous avons identifiées dans les sept souches FQ-R de CRyptiC étaient présentes de façon non fixée dans la population, avec des fréquences alléliques variant de 15 à 40%. Ainsi, à la difficulté de la détection des variants structuraux s'ajoute ici celle de la détection de l'hétérorésistance discutée ci-dessous.

L'implication des duplications que nous avons observées dans la résistance aux FQ est probable car : (i) c'était la seule différence avec la souche parentale pour plusieurs mutants FQ-R sélectionnés dans le modèle murin, (ii) la présence de duplication était significativement plus fréquente parmi les souches cliniques FQ-R que parmi les FQ-S (**Tableau 4, Publication 9**).

Notre hypothèse du rôle majeur de l'opéron *mfpAE* au sein de cette duplication dans la résistance aux FQ est étayée par plusieurs observations :

- toutes les duplications que nous avons observées contenaient l'opéron *mfpAE*. Chez les souches cliniques, que ce soit celles publiées (à l'exception d'une) ^{523,522,524} ou les souches cliniques FQ-R du Consortium CRyptiC, les duplications étaient de taille variant de 130 à 450 kb, tandis que celles observées dans les souches FQ-R sélectionnées chez la souris étaient plus petites (89 kb et 180 kb), semblant correspondre à une réduction des duplications massives publiées, conservant cependant l'opéron *mfpAE*.

- l'analyse génomique des souches FQ-R sans mutation connue comme associée à la résistance dans *gyrA* et *gyrB*, (i) isolées chez les souris traitées par monothérapie FQ, et (ii), issues de la collection du CNR-MyRMA et du Consortium CRYptiC a mis évidence la présence de mutations ponctuelles au sein de plusieurs gènes de l'opéron *mfpAE*.
- des données de la littérature sont en faveur du rôle de deux (MpfA et MfpB), voire 3 protéines codées par l'opéron (MpfA, MfpB et MfpD), dans la résistance aux FQ chez les mycobactéries ^{374, 532, 376, 377, 533}.

Le gène le plus étudié de l'opéron *mfpAE* est Rv3361, qui code la protéine MfpA (*Mycobacterium fluoroquinolone resistance protein A*). Plusieurs études ont évalué son rôle dans la résistance aux FQ chez les mycobactéries ^{375, 374, 532}.

Un premier élément en faveur de l'implication de MfpA dans la résistance aux FQ est que MfpA appartient à la famille des PRP ³⁶⁵, comme les protéines Qnr qui sont impliquées dans la résistance aux FQ chez les bactéries à Gram négatif par un mécanisme de protection de la cible ^{366, 367, 368}. Il a été montré que ce rôle dans la résistance aux FQ chez *Mtb* nécessitait la présence de la GTPase MfpB ^{376, 377}. Chez la plupart des mycobactéries, le gène *mfpA* est situé au sein d'un **opéron qui comprend quatre autres gènes** (Rv3362 (*mfpB*) à Rv3365c (*mfpE*)) **chez *Mtb*** ³²⁸ (**Figure 58**). Cette structure de quatre gènes est conservée chez les *Actinomycetales*, mais MfpA n'est présent que chez les mycobactéries. Ainsi, on peut parler de « **conservon** » pour l'opéron *mfpAE*. Les prédictions de fonction par recherche d'homologues structuraux suggèrent que **MfpC** est une protéine à motif Helix Turn Helix (fonction inconnue), **MfpD** a une fonction de *GTPase-activating protein* (GAP) et **MfpE** serait une pseudo histidine kinase et pourrait avoir un rôle de senseur (**Figure 59 et Figure 60**). Si des données expérimentales récentes ont étayé le rôle de MfpD comme activateur de MfpB ⁵³³, les mécanismes de régulation de la production de MfpA et des autres protéines Mfp ne sont pas encore élucidés et le promoteur de l'opéron *mfpAE* n'a pas été identifié.

La délétion de MfpD induit l'accumulation de MfpB sous forme GTP-liée, ce qui entraîne une augmentation de MfpA sous forme active. La forme active de MfpA pourrait inhiber la formation du complexe ternaire ADN-ADN gyrase-FQ et ainsi protéger l'ADN gyrase des FQ et entraîner une résistance aux FQ (**Figure 61**). Ainsi, des mutations de MfpD perturbant sa fonction de GAP pourraient avoir un rôle dans la résistance aux FQ. Cependant, si nous avons identifié des mutations dans chaque gène de l'opéron *mfpAE* dans les souches cliniques FQ-R du Consortium CRYptiC, ce sont des mutations dans MfpB et dans MfpE dans les souches

cliniques FQ-R du CNR-MyRMA et dans MfpC dans les souches FQ-R isolées chez la souris qui ont été observées (**Publication 9, tableaux 4 et 5**). Parmi les plus de 900 génomes du Consortium CRyptiC, ce sont les mutations dans Rv3364c, qui code MfpC, qui étaient les plus fréquentes parmi les mutations présentes exclusivement dans les souches FQ-R. Deux mutations étaient observées, non synonyme (V82M) et synonyme (V88V). La mutation non synonyme V82M, était trouvée dans deux lignées différentes (lignées 2 et 4). La fonction précise de MfpC n'est pas connue, mais en plus de son possible rôle en tant que protéine effectrice (homologie avec les guanine nucléotide exchange factors, GEFs) de MfpB, elle jouerait un rôle dans la virulence de *Mtb*. Tout comme EsxA et EsxB, autres protéines à motif *helix turn helix*, MfpC interagit avec l'inflammasome du macrophage infecté. En effet, sa liaison à la cathepsine G induit l'inhibition de la pyroptose du macrophage médiée par la caspase-1^{534,535}. Ainsi, la mutation V82M mise en exergue chez les isolats CRyptiC FQ-R pourrait également avoir un rôle dans la virulence de *Mtb*. Il a d'ailleurs été mis en évidence que cette mutation était une homoplasie au sein d'une population de 1000 souches cliniques en Russie¹⁵². Le rôle de MfpE est encore plus hypothétique mais les mutations identifiées dans ce travail de thèse suggèrent un rôle prépondérant dans la résistance aux FQ, tout comme MfpC (**Publication 9**).

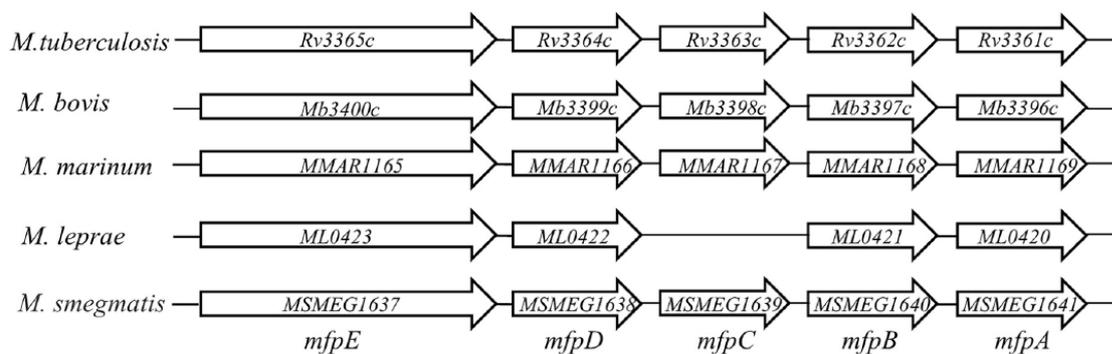


Figure 58- Structure de l'opéron *mfpAE* de plusieurs mycobactéries. Les gènes de l'opéron *mfpAE* sont co-transcrits. D'après⁵³³

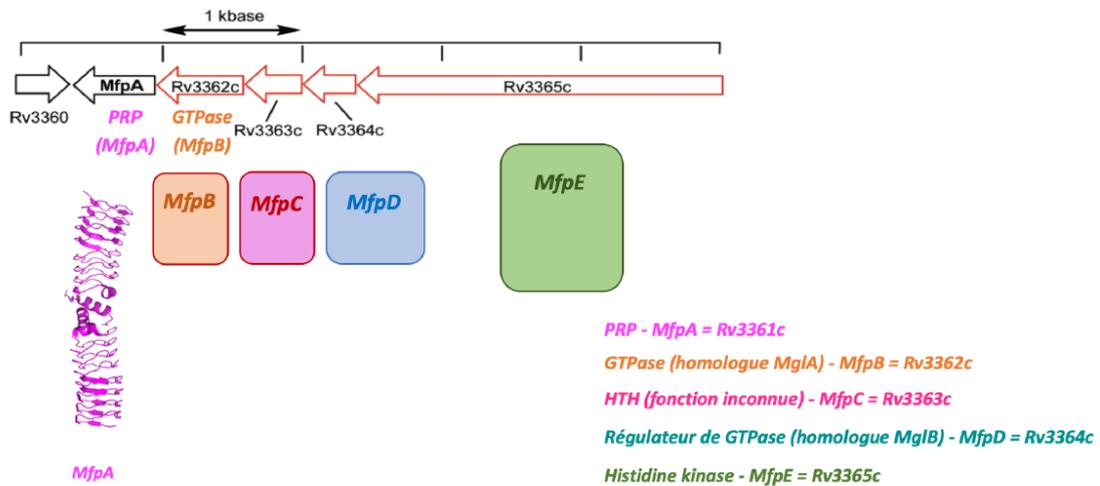


Figure 59- Structures de l'opéron *mfpAE* de *Mtb*. Les gènes de l'opéron *mfpAE* sont co-transcrit (d'après Stéphanie Petrella, données personnelles).

PRP : pentapeptide repeat protein ; HTH : helix turn helix.

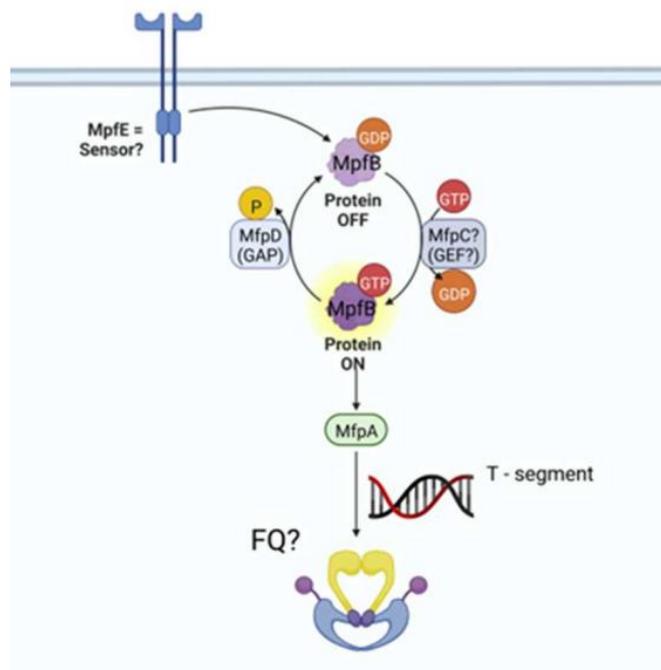


Figure 60- Représentation schématique de l'interaction des protéines Mfp et de leurs rôles putatifs. (d'après Stéphanie Petrella, données personnelles).

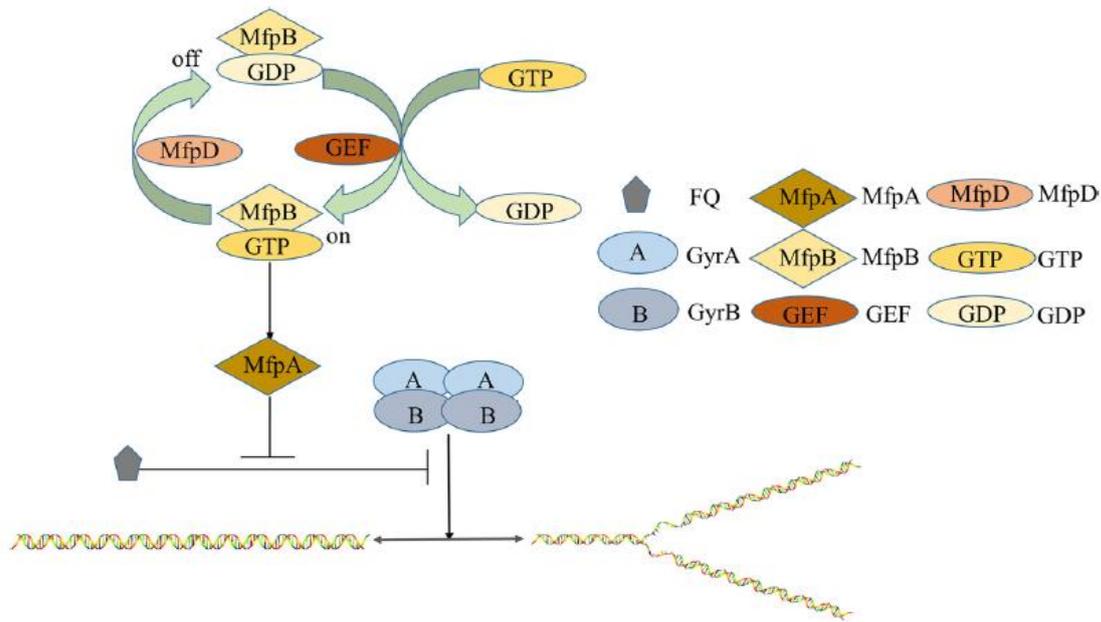


Figure 61- Rôle de MfpD dans la résistance aux FQ médiée par MfpA chez *Mtb*. La délétion de MfpD induit l'accumulation de MfpB sous forme GTP-liée, ce qui entraîne une augmentation de MfpA sous forme active. La forme active de MfpA pourrait inhiber la formation du complexe ternaire ADN-ADN gyrase-FQ et ainsi protéger l'ADN gyrase des FQ, et ainsi entraîner une résistance aux FQ. D'après ⁵³³.

De façon intéressante, la présence d'un autre type de variant structural, à savoir des inversions génomiques massives survenant dans la même portion du génome que les duplications discutées ci-dessus, et contenant l'opéron *mfpAE*, a été mise en évidence chez le clone à succès Beijing W148 ⁵³⁶. Cette caractéristique génétique spécifique a été confirmée par l'étude génomique de 720 isolats appartenant à ce clone ⁵³⁷. L'impact physiologique ou sur la résistance aux antituberculeux de ces deux inversions de grande taille n'a pas été étudié à l'heure actuelle. Une autre caractéristique génétique spécifique à ce clone et dont l'impact sur la virulence a été démontré expérimentalement est la délétion au sein du locus *ppe38*. En effet, il a été montré que cette délétion était l'une des explications du phénotype hypervirulent des souches Beijing modernes ⁴⁷⁹, comme déjà détaillé dans le § 3.4 *Protéines PE/PPE*. De plus, une mutation spécifique de type *frameshift* dans le système à deux composants KdpD/KdpE a également été trouvée dans l'ensemble des isolats. Peu de données existent concernant l'impact de cette mutation sur la virulence ; il a été montré que ce système à deux composants était impliqué dans la réponse au stress oxydatif chez *E. coli* ⁵³⁸. De plus, une étude publiée en 2003 a mis en évidence que la délétion de ce système à deux composants entraînait une virulence accrue dans un modèle murin d'infection à *Mtb* ⁵³⁹. Cette piste doit donc être étayée par d'autres

études, génomiques mais aussi expérimentales. Ainsi, le succès du clone W148 serait lié en partie, sur le plan génétique, à la combinaison de facteurs conduisant à un phénotype hypervirulent favorisant la transmission.

C'est sur ce modèle que nous avons cherché à explorer les mécanismes moléculaires qui pourraient expliquer la dissémination au cours du temps du cluster T3-Congo appartenant à la lignée 4, dont les souches ont été collectées sur une période de 18 ans, allant de 2004 à 2022. L'analyse génomique des souches de ce cluster montre une vitesse d'évolution plus faible que celle de *Mtb*, y compris de la lignée 4^{505, 54}, avec notamment l'absence de SNV de différence en *pairwise comparison* pour cinq souches du cluster collectées entre 2004 et 2018 (**Figure 52, partie III Travaux portant sur l'investigation des mécanismes moléculaires de dissémination d'un cluster particulier de souches de *M. tuberculosis* MDR**). Ce nombre faible de mutations d'écart pourrait s'expliquer par une virulence atténuée des souches avec une augmentation de la phase de latence, favorisant ainsi la dissémination du cluster T3-Congo au cours du temps, mais avec un faible nombre de souches collectées. Un taux de mutation moindre durant la phase de latence comparativement à celui de la TB active a été mis en évidence *in vivo* chez l'homme par Colangeli *et al.*⁵⁴⁰. Ces résultats vont à l'encontre des conclusions de Ford *et al.* qui montraient que ce taux n'était pas différent dans un modèle d'infection tuberculeuse chez le macaque⁵⁴¹. Ainsi, du fait du peu de données dont nous disposons et de leur caractère contradictoire, il faut rester prudent sur l'interprétation qui peut en être faite.

En ligne avec notre hypothèse, nous avons pu mettre en évidence chez le cluster T3-Congo des mutations spécifiques et communes en relation notamment avec le stress oxydatif. En effet, la plupart des mutations observées pourraient correspondre aux signatures mutationnelles engendrées par les dommages causés à l'ADN par les ROS⁵⁰⁸. De plus, la substitution KatG-A110V pourrait être compensatrice du défaut de fonction monooxygénase dû à la substitution EthA-Q269*.

La mutation c-31t en amont d'*espK* au sein du locus *esx-I* pourrait avoir un impact sur la virulence des souches de ce cluster. Des données croissantes mettent en lumière le rôle joué par EspK dans la mécanistique de la virulence, en jouant le rôle de chaperon pour la protéine EspB⁵¹¹. En parallèle, des études génomiques sur des souches cliniques MDR/XDR ont mis en évidence des mutations au sein d'*espK*, qui pourraient ainsi jouer un rôle compensatoire^{542, 543}.

Les résultats de la RT-qPCR ont permis de montrer un niveau de transcription homogène d'*espK* et d'*esxA* parmi les isolats du cluster. Cependant, nous n'avons pas pu conclure sur le niveau de transcription augmenté ou diminué d'*esxA* et d'*espK*, du fait de résultats hétérogènes chez les deux souches témoins utilisées (**Figure 56**), **partie III Travaux portant sur l'investigation des mécanismes moléculaires de dissémination d'un cluster particulier de souches de *M. tuberculosis* MDR)**

Ces travaux de thèse ont permis d'apporter des éléments nouveaux en faveur de l'implication de l'opéron *mfpAE* dans la résistance aux FQ. Néanmoins, ces résultats doivent être confirmés par une approche expérimentale. Des expériences sont en cours. Ainsi, des transformants de la souche parentale H37Rv utilisée dans le modèle murin, dans lesquels un cosmide contenant un insert de 38 kb (incluant l'opéron *mfpAE*) a été électroporé, ont été obtenus. Si les CMI des FQ de ces transformants sont augmentées par rapport à la souche sauvage, nous aurons apporté la preuve expérimentale qu'une amplification génique contenant l'opéron *mfpAE* est impliqué dans la résistance.

Il est de plus capital d'évaluer si la duplication est accompagnée d'une augmentation de la transcription et de la synthèse protéique de l'opéron *mfpAE* comme cela est suspecté. Pour cela, des premières expériences de RT-qPCR du gène *mfpA* ont été réalisées pour la souche parentale H37Rv et les souches FQ-R présentant une duplication, qu'il serait intéressant de coupler à une approche de transcriptomique voire de protéomique.

Tous les résultats obtenus au cours de ce travail de thèse mettent en lumière la complexité de l'étude de mécanismes moléculaires de résistance et de dissémination chez *Mtb*. Les différents éléments à l'origine de cette complexité, et soulevés dans ce travail de thèse, sont détaillés ci-après.

1. Difficulté d'analyse des résultats obtenus via une approche de génomique comparative entre souche parentale et clones obtenus après sélection

Dans le modèle murin où les souris infectées par *Mtb* étaient traitées par monothérapie de FQ (Publication 9) nous avons observé des mutations dans des cibles assez variées, et la plupart des mutations identifiées l'étaient dans un seul clone, ce qui rend difficile l'interprétation de leur impact (**Publication 9, tableaux 1, 2 et figure 3**) La multiplicité des gènes mutés rend l'interprétation complexe, et difficile et longue l'étude expérimentale de leur impact. Les mutations observées pourraient (i) être l'effet du hasard, (ii) être impliquées dans la résistance, (iii) être des facteurs prédisposants l'acquisition de résistance, (iv) avoir un rôle compensatoire, par des interactions épistatiques. Par exemple, la mutation E303Q dans GyrA, mise en évidence dans deux souches FQ-R isolées chez les souris traitées et n'ayant pas d'impact dans la résistance aux FQ (**Publication 9, tableaux 1, 2 et figure 3**) pourrait représenter un phénomène de compensation dans l'ADN gyrase.

2. Difficultés de détection de l'hétérorésistance.

L'hétérorésistance représente un véritable challenge pour le diagnostic de la résistance. Le terme de résistance « cryptique » a même ainsi été employé ¹²³. Les techniques basées sur le NGS ont permis d'améliorer les performances de diagnostic de l'hétérorésistance, mais avec plusieurs limites. Les méthodes phénotypiques pour l'étude de la sensibilité aux antituberculeux permettent de détecter ce phénomène, avec un cut-off de 1% pour l'antibiogramme solide par méthode des proportions. Cependant, le RAV peut être présent dans la population à moins de 1% (ces RAV à très faible fréquence peuvent être détectées par *deep-sequencing*, mais là aussi dans les limites de détection de cette technique) ; la question centrale à se poser est donc surtout quelle est la proportion de bacilles résistants à partir de laquelle le succès thérapeutique est compromis. Cette question cruciale est au centre de la réflexion menée dans les années 1960 pour déterminer la méthodologie à employer pour le diagnostic de la résistance aux antituberculeux au laboratoire ^{227, 544}. Il est donc capital de comprendre les mécanismes de

l'hétérorésistance et d'en optimiser les moyens diagnostiques génotypiques, car il a été montré qu'elle pouvait être associée de façon significative à des échecs thérapeutiques, notamment pour la rifampicine ²⁶⁴.

Dans le travail mené dans le cadre de cette thèse, nous avons été confrontés à cette problématique de détection de l'hétérorésistance. D'une part, par la mise en évidence de duplications massives présentes de façon hétérogène dans les souches cliniques FQ-R du Consortium CRyptiC ; cela complexifie leur détection, et participe au fait que ce phénomène de duplications génomiques massives soit passé quasi inaperçu chez les souches cliniques de *Mtb*. D'autre part, la réanalyse des génomes des souches FQ-R du Consortium CRyptiC a permis de mettre en évidence des mutations hétérogènes dans *gyrA* et *gyrB* qui n'avaient pas été détectée par la première analyse bio-informatique. Le phénomène d'hétérorésistance est en effet particulièrement décrit pour les FQ ¹²⁸. Enfin, nous n'avons pas réalisé de *deep-sequencing* dans les travaux que nous avons menés, il est donc possible des variants minoritaires n'aient pas été explorés, aussi bien concernant l'implication dans la résistance que dans la dissémination du cluster T3-Congo.

3. Difficulté d'apporter des preuves expérimentales d'implication des SNV identifiés ou des duplications dans la résistance aux antituberculeux ou le succès de dissémination des souches.

En effet, les duplications massives observées dans ce travail de thèse sont complexes à étudier expérimentalement, du fait de leur taille ; il est impossible de créer un insert de plus d'une centaine de kb afin de réaliser des expériences de transformation ; ainsi, nous avons utilisé un insert de 38 kb pour « mimer » la duplication, qui représente une « réduction » des duplications observées. Cependant, l'avantage est que cela permet de s'affranchir de l'impact de la duplication des gènes qui ne sont pas compris dans cet insert de 38 kb, et de se concentrer un peu plus sur l'impact de la duplication de l'opéron *mfpAE*. Par ailleurs, les travaux portant sur le cluster T3-Congo illustrent la difficulté du choix de souches témoin pour l'étude de la transcription des facteurs de virulence (*espK* et *esxA* étudiés ici). En effet, les deux souches témoin que nous avons choisies, possédant pourtant le même fond génétique, ont montré des niveaux de transcription d'*esxA* complètement différents ; avec même pour l'une d'elle, un niveau supérieur à celui de la souche « hypervirulente » CDC 1551.

4. Problématique de définition de notion de clone à succès en termes de « dissémination ».

Le cluster T3-Congo auquel nous nous sommes intéressés pose des problématiques tout à fait différentes du clone Beijing W148. En effet, si le cluster Beijing W148, constitué de souches de virulence élevée, est devenu majoritaire dans les pays de l'ex-URSS, le cluster T3-Congo a pour principale caractéristique d'avoir persisté dans le temps sans pour autant devenir majoritaire, notamment en Afrique de l'Ouest. Le cluster T3-Congo apparaît persister au cours du temps, cela pouvant peut-être être lié à une moindre virulence et transmissibilité, comme les premiers résultats que nous avons obtenus semble le montrer. Cela semble donc être à l'opposé de ce qui est rapporté pour le cluster Beijing W148. Par ailleurs, nous n'avons pas étudié l'impact de mutations éventuelles dans les régions PE/PPE du fait de la réalisation d'un séquençage de type Illumina. Le séquençage de type *long-read* des isolats de ce cluster T3-Congo a été amorcé sur MinIon (Oxford Nanopore), notamment afin d'explorer les cinq souches (C1 à C5), qui ne présentaient aucun SNV de différence en pairwise comparaison malgré leur isolement sur une longue période. Cependant, la technique d'extraction de l'ADN doit être encore optimisée, après l'essai de plusieurs protocoles.

Enfin, la complexité de l'étude de la résistance aux antituberculeux chez *Mtb* est également illustrée par la présentation du premier cas européen de mutation dans *atpE* dans une souche clinique⁴⁴⁰, qui montre la difficulté du diagnostic génotypique et phénotypique de la résistance à la BDQ, notamment du fait de son caractère dynamique et de la présence de mutations hétérogènes au sein de *Rv0678*. Les données relatives à la corrélation phénotype/génotype sont encore insuffisantes pour la BDQ, et extrêmement parcellaires pour les molécules les plus récentes que sont le délamanide et le prétomanide.

A plus long terme, la perspective est de poursuivre l'étude des mécanismes de résistance aux antituberculeux les plus récents, sur le modèle de ce qui a été conduit dans cette thèse et dans les travaux précédents de l'équipe pour les FQ, afin d'optimiser leur utilisation thérapeutique, dans le cadre d'une prise en charge personnalisée des patients.

CONCLUSION

L'ensemble des éléments discutés illustre l'intrication entre les mécanismes de résistance et de virulence. Ainsi, les deux grands objectifs de ces travaux de thèse, qui consistaient en la recherche de nouveaux mécanismes de résistance aux FQ et en l'étude des mécanismes moléculaires de dissémination d'un cluster particulier de souches MDR, se rejoignent. En effet, les duplications génomiques massives identifiées dans les travaux portant sur les FQ ont probablement un lien avec la virulence de *Mtb* et son adaptabilité dans un environnement hostile, du fait de la présence (i) dans certaines d'entre elles, du régulon *dosR*, qui régule la dormance et ainsi la tolérance aux antibiotiques, (ii) de *dnaE2* impliqué dans l'acquisition de nouvelles mutations en présence de stress oxydatif ou d'antibiotique, et (iii), de l'opéron *mfpAE*, dont certains gènes, notamment *Rv3364c*, codent des protéines interagissant avec l'inflammasome. La mise en évidence de duplications massives en tandem au sein du clone Beijing W148 dans la même région génomique étaye l'hypothèse que celles-ci jouent un rôle dans la faculté d'adaptation et donc de dissémination des souches. D'autre part, l'étude du cluster MDR T3-Congo soulève l'hypothèse d'un lien entre la combinaison spécifique de mutations de résistance (KatG A110V et EthA Q269*) et la résistance de *Mtb* au stress oxydatif. Enfin, les mutations identifiées spécifiquement dans les isolats de ce cluster MDR correspondent aux signatures mutationnelles des ROS.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Klann, A. G., Belanger, A. E., Abanes-de Mello, A., Lee, J. Y. & Hatfull, G. F. Characterization of the dnaG locus in *Mycobacterium smegmatis* reveals linkage of DNA replication and cell division. *J. Bacteriol.* **180**, 65–72 (1998).
2. Cole, S. T. *et al.* Massive gene decay in the leprosy bacillus. *Nature* **409**, 1007–1011 (2001).
3. Chiaradia, L. *et al.* Dissecting the mycobacterial cell envelope and defining the composition of the native mycomembrane. *Sci. Rep.* **7**, 12807 (2017).
4. Gupta, R. S., Lo, B. & Son, J. Phylogenomics and Comparative Genomic Studies Robustly Support Division of the Genus *Mycobacterium* into an Emended Genus *Mycobacterium* and Four Novel Genera. *Front. Microbiol.* **9**, 67 (2018).
5. Tortoli, E. *et al.* The new phylogeny of the genus *Mycobacterium*: The old and the news. *Infect. Genet. Evol.* **56**, 19–25 (2017).
6. Tortoli, E. *et al.* Same meat, different gravy: ignore the new names of mycobacteria. *Eur. Respir. J.* **54**, 1900795 (2019).
7. Global leprosy (Hansen disease) update, 2019: time to step-up prevention initiatives. <https://www.who.int/publications-detail-redirect/who-wer9536>.
8. Sugawara-Mikami, M. *et al.* Pathogenicity and virulence of *Mycobacterium leprae*. *Virulence* **13**, 1985–2011.
9. Levis, W. R., Zhang, S. & Martiniuk, F. *Mycobacterium lepromatosis*: emerging strain or species? *J. Drugs Dermatol. JDD* **11**, 158 (2012).
10. Silva, F. J., Santos-Garcia, D., Zheng, X., Zhang, L. & Han, X. Y. Construction and Analysis of the Complete Genome Sequence of Leprosy Agent *Mycobacterium lepromatosis*. *Microbiol. Spectr.* **10**, e0169221 (2022).
11. Han, X. Y., Sizer, K. C., Velarde-Félix, J. S., Frias-Castro, L. O. & Vargas-Ocampo, F. The Leprosy Agents *Mycobacterium lepromatosis* and *Mycobacterium leprae* in Mexico. *Int. J. Dermatol.* **51**, 952–959 (2012).
12. Han, X. Y., Sizer, K. C. & Tan, H.-H. Identification of the leprosy agent *Mycobacterium lepromatosis* in Singapore. *J. Drugs Dermatol. JDD* **11**, 168–172 (2012).
13. Jessamine, P. G. *et al.* Leprosy-like illness in a patient with *Mycobacterium lepromatosis* from Ontario, Canada. *J. Drugs Dermatol. JDD* **11**, 229–233 (2012).
14. Cardona-Castro, N., Escobar-Builes, M. V., Serrano-Coll, H., Adams, L. B. & Lahiri, R. *Mycobacterium lepromatosis* as Cause of Leprosy, Colombia. *Emerg. Infect. Dis.* **28**, 1067–1068 (2022).
15. Daley, C. *et al.* Treatment of Nontuberculous Mycobacterial Pulmonary Disease: An Official ATS/ERS/ESCMID/IDSA Clinical Practice Guideline: Executive Summary. *Clin Infect Dis* **71**, e1–e36 (2020).
16. Prevots, D. R. & Marras, T. K. Epidemiology of human pulmonary infection with nontuberculous mycobacteria: a review. *Clin. Chest Med.* **36**, 13–34 (2015).

17. Namkoong, H. *et al.* Epidemiology of Pulmonary Nontuberculous Mycobacterial Disease, Japan. *Emerg. Infect. Dis.* **22**, 1116–1117 (2016).
18. Winthrop, K. L. *et al.* Incidence and Prevalence of Nontuberculous Mycobacterial Lung Disease in a Large U.S. Managed Care Health Plan, 2008–2015. *Ann. Am. Thorac. Soc.* **17**, 178–185 (2020).
19. Masson, E. Mycobactéries atypiques. *EM-Consulte* <https://www.em-consulte.com/article/1331266/mycobacteries-atypiques>.
20. Lange, C. *et al.* Consensus management recommendations for less common non-tuberculous mycobacterial pulmonary diseases. *Lancet Infect. Dis.* **22**, e178–e190 (2022).
21. Turenne, C. Y. Nontuberculous mycobacteria: Insights on taxonomy and evolution. *Infect. Genet. Evol.* **72**, 159–168 (2019).
22. Brites, D. & Gagneux, S. The Nature and Evolution of Genomic Diversity in the Mycobacterium tuberculosis Complex. in *Strain Variation in the Mycobacterium tuberculosis Complex: Its Role in Biology, Epidemiology and Control* (ed. Gagneux, S.) 1–26 (Springer International Publishing, 2017). doi:10.1007/978-3-319-64371-7_1.
23. Ngabonziza, J. C. S. *et al.* A sister lineage of the Mycobacterium tuberculosis complex discovered in the African Great Lakes region. *Nat. Commun.* **11**, 2917 (2020).
24. Firdessa, R. *et al.* Mycobacterial lineages causing pulmonary and extrapulmonary tuberculosis, Ethiopia. *Emerg. Infect. Dis.* **19**, 460–463 (2013).
25. Coscolla, M. *et al.* Phylogenomics of Mycobacterium africanum reveals a new lineage and a complex evolutionary history. *Microb. Genomics* **7**, 000477 (2021).
26. Castets, M., Boisvert, H., Grumbach, F., Brunel, M. & Rist, N. Les bacilles tuberculeux de type Africain: note préliminaire. *Rev. Tuberc. Pneumol. (Paris)* **32**, 179–84 (1968).
27. WHO (World Health Organization). Global Tuberculosis Report 2020. **53**, 1689–1699 (2020).
28. Malone, K. M. & Gordon, S. V. Mycobacterium tuberculosis Complex Members Adapted to Wild and Domestic Animals. in *Strain Variation in the Mycobacterium tuberculosis Complex: Its Role in Biology, Epidemiology and Control* (ed. Gagneux, S.) 135–154 (Springer International Publishing, 2017). doi:10.1007/978-3-319-64371-7_7.
29. Karlson, a. g. & lessel, e. f. y. 1970. Mycobacterium bovis nom. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **20**, 273–282.
30. Smith T. A comparative study of bovine tubercle bacilli and of human bacilli from sputum. *J Exp Med.* 1898 Jul 1;3(4-5):451-511. doi: 10.1084/jem.3.4-5.451. PMID: 19866892; PMCID: PMC2117982.
31. Runyon, E. H. & Al, E. Mycobacterium tuberculosis, M. bovis and M. microti species descriptions. *Zentralblatt Bakteriologie. Parasitenkd. Infekt. Hyg. Abt Orig.* **204**, 405–13 (1967).
32. Calmette A. The Protection of Mankind against Tuberculosis: Being an Address before the Medico-Chirurgical Society of Edinburgh. *Edinb Med J.* 1922 Jul;29(1):93-104. PMID: 29640999; PMCID: PMC5316573
33. Mahairas, G. G., Sabo, P. J., Hickey, M. J., Singh, D. C. & Stover, C. K. Molecular analysis of genetic differences between Mycobacterium bovis BCG and virulent M. bovis. *J. Bacteriol.* **178**, 1274–1282 (1996).
34. Stanley, S. A., Raghavan, S., Hwang, W. W. & Cox, J. S. Acute infection and macrophage subversion by Mycobacterium tuberculosis require a specialized secretion system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 13001–13006 (2003).

35. Mangtani, P. *et al.* Protection by BCG Vaccine Against Tuberculosis: A Systematic Review of Randomized Controlled Trials. *Clin. Infect. Dis.* **58**, 470–480 (2014).
36. Levi, L. *et al.* Bacillus Calmette-Guerin infection following intravesical instillation: Does the strain matter? *Med Mal Infect* **49**, 350–355 (2019).
37. Meije, Y. *et al.* Health-Care Associated Mycobacterium bovis-BCG Infection in Cancer Patients without prior BCG Instillation. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* **65**, (2017).
38. Mycobacterium bovis BCG spinal osteomyelitis in a patient with bladder cancer without a history of BCG instillation. - PubMed - NCBI. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30065051>.
39. Gies, V. *et al.* Case Report: Acquired Disseminated BCG in the Context of a Delayed Immune Reconstitution After Hematological Malignancy. *Front. Immunol.* **12**, 696268 (2021).
40. Kiers, A., Klarenbeek, A., Mendelts, B., Van Soolingen, D. & Koeter, G. Transmission of Mycobacterium pinnipedii to humans in a zoo with marine mammals. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* **12**, 1469–1473 (2008).
41. Vågane, Å. J. *et al.* Geographically dispersed zoonotic tuberculosis in pre-contact South American human populations. *Nat. Commun.* **13**, 1195 (2022).
42. Brodin, P. *et al.* Bacterial Artificial Chromosome-Based Comparative Genomic Analysis Identifies Mycobacterium microti as a Natural ESAT-6 Deletion Mutant. *Infect. Immun.* **70**, 5568–5578 (2002).
43. van Ingen, J. *et al.* Characterization of Mycobacterium orygis as M. tuberculosis Complex Subspecies. *Emerg. Infect. Dis.* **18**, 653–655 (2012).
44. Mostowy S, Cousins D, Behr MA. Genomic interrogation of the dassie bacillus reveals it as a unique RD1 mutant within the Mycobacterium tuberculosis complex. *J Bacteriol.* 2004 Jan;186(1):104-9. doi: 10.1128/JB.186.1.104-109.2003. PMID: 14679230; PMCID: PMC303463.
45. Alexander, K. A. *et al.* Novel Mycobacterium tuberculosis Complex Pathogen, M. mungi. *Emerg. Infect. Dis.* **16**, 1296–1299 (2010).
46. Parsons, S. D. C., Drewe, J. A., Gey van Pittius, N. C., Warren, R. M. & van Helden, P. D. Novel Cause of Tuberculosis in Meerkats, South Africa. *Emerg. Infect. Dis.* **19**, 2004–2007 (2013).
47. Koeck, J.-L. *et al.* Clinical characteristics of the smooth tubercle bacilli ‘Mycobacterium canettii’ infection suggest the existence of an environmental reservoir. *Clin. Microbiol. Infect.* **17**, 1013–1019 (2011).
48. Supply, P. *et al.* Genomic analysis of smooth tubercle bacilli provides insights into ancestry and pathoadaptation of Mycobacterium tuberculosis. *Nat. Genet.* **45**, 172–179 (2013).
49. Daffé, M., Lacave, C., Lanéelle, M. A. & Lanéelle, G. Structure of the major triglycosyl phenolphthiocerol of Mycobacterium tuberculosis (strain Canetti). *Eur. J. Biochem.* **167**, 155–160 (1987).
50. Brosch, R. *et al.* A new evolutionary scenario for the Mycobacterium tuberculosis complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 3684–3689 (2002).
51. Boritsch, E. C. & Brosch, R. Evolution of Mycobacterium tuberculosis: New Insights into Pathogenicity and Drug Resistance. *Microbiol. Spectr.* **4**, (2016).
52. Riojas, M. A., McGough, K. J., Rider-Riojas, C. J., Rastogi, N. & Hazbón, M. H. Phylogenomic analysis of the species of the Mycobacterium tuberculosis complex demonstrates that Mycobacterium africanum, Mycobacterium bovis, Mycobacterium caprae, Mycobacterium microti and Mycobacterium pinnipedii are later heterotypic synonyms of Mycobacterium tuberculosis. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **68**, 324–332 (2018).

53. Tsukamura, M., Mizuno, S. & Toyama, H. Taxonomic Studies on the Mycobacterium tuberculosis Series. *Microbiol. Immunol.* **29**, 285–299 (1985).
54. Barbier, M. & Wirth, T. The Evolutionary History, Demography, and Spread of the Mycobacterium tuberculosis Complex. *Microbiol. Spectr.* **4**, (2016).
55. Sougakoff, W. Molecular epidemiology of multidrug-resistant strains of Mycobacterium tuberculosis. *Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **17**, 800–805 (2011).
56. Supply, P. *et al.* Variable human minisatellite-like regions in the Mycobacterium tuberculosis genome. *Mol. Microbiol.* **36**, 762–771 (2000).
57. Coll, F. *et al.* A robust SNP barcode for typing Mycobacterium tuberculosis complex strains. *Nat. Commun.* **5**, 4812 (2014).
58. Napier, G. *et al.* Robust barcoding and identification of Mycobacterium tuberculosis lineages for epidemiological and clinical studies. *Genome Med.* **12**, 114 (2020).
59. Kohl, T. A. *et al.* Harmonized Genome Wide Typing of Tubercle Bacilli Using a Web-Based Gene-By-Gene Nomenclature System. *EBioMedicine* **34**, 131–138 (2018).
60. Azé, J. *et al.* Genomics and Machine Learning for Taxonomy Consensus: The Mycobacterium tuberculosis Complex Paradigm. *PLoS ONE* **10**, e0130912 (2015).
61. Drain, P. K. *et al.* Incipient and Subclinical Tuberculosis: a Clinical Review of Early Stages and Progression of Infection. *Clin. Microbiol. Rev.* **31**, e00021-18 (2018).
62. Global tuberculosis report 2022. <https://www.who.int/publications-detail-redirect/9789240061729>.
63. Global Tuberculosis Report 2021. <https://www.who.int/publications/digital/global-tuberculosis-report-2021>.
64. Santé publique France. www.santepubliquefrance.fr.
65. Müller, B. *et al.* Zoonotic Mycobacterium bovis–induced Tuberculosis in Humans. *Emerg. Infect. Dis.* **19**, 899–908 (2013).
66. Proding, W. M., Indra, A., Koksalan, O. K., Kilicaslan, Z. & Richter, E. Mycobacterium caprae infection in humans. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* **12**, 1501–1513 (2014).
67. Kaufmann, S. H. E. & McMichael, A. J. Annulling a dangerous liaison: vaccination strategies against AIDS and tuberculosis. *Nat. Med.* **11**, S33-44 (2005).
68. Maitre, T. *et al.* Sampling strategy for bacteriological diagnosis of intrathoracic tuberculosis. *Respir. Med. Res.* **79**, 100825 (2021).
69. Bernard, C. *et al.* Evaluation of the Fluo-RAL module for detection of tuberculous and nontuberculous acid-fast bacilli by fluorescence microscopy. *Journal of Clinical Microbiology* vol. 51 3469–3470 Preprint at <https://doi.org/10.1128/JCM.01910-13> (2013).
70. Lagier, J. C. *et al.* Current and past strategies for bacterial culture in clinical microbiology. *Clin. Microbiol. Rev.* **28**, 208–236 (2015).
71. Hunter, R. L., Olsen, M. R., Jagannath, C. & Actor, J. K. Multiple Roles of Cord Factor in the Pathogenesis of Primary, Secondary, and Cavitory Tuberculosis, Including a Revised Description of the Pathology of Secondary Disease. *Ann. Clin. Lab. Sci.* **36**, 371–386 (2006).
72. Behr, M. A. & Small, P. M. A historical and molecular phylogeny of BCG strains. *Vaccine* **17**, 915–922 (1999).

73. Warren, J. R., Bhattacharya, M., De Almeida, K. N. F., Trakas, K. & Peterson, L. R. A Minimum 5.0 ml of Sputum Improves the Sensitivity of Acid-fast Smear for Mycobacterium tuberculosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **161**, 1559–1562 (2000).
74. Lawn, S. D. *et al.* Advances in tuberculosis diagnostics: The Xpert MTB/RIF assay and future prospects for a point-of-care test. *The Lancet Infectious Diseases* vol. 13 349–361 Preprint at [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(13\)70008-2](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(13)70008-2) (2013).
75. Morel, F., Jaffré, J., Sougakoff, W., Aubry, A. & Véziris, N. [Molecular diagnosis of tuberculosis]. *Rev Mal Respir* **37**, 412–416 (2020).
76. Zifodya, J. S. *et al.* Xpert Ultra versus Xpert MTB/RIF for pulmonary tuberculosis and rifampicin resistance in adults with presumptive pulmonary tuberculosis. *Cochrane Database Syst. Rev.* **2**, CD009593 (2021).
77. Kohli, M. *et al.* Xpert MTB/RIF Ultra and Xpert MTB/RIF assays for extrapulmonary tuberculosis and rifampicin resistance in adults. *Cochrane Database Syst. Rev.* **1**, CD012768 (2021).
78. WHO operational handbook on tuberculosis: module 3: diagnosis: rapid diagnostics for tuberculosis detection, 2021 update. <https://www.who.int/publications-detail-redirect/9789240030589>.
79. Ok, V. *et al.* Rapid Molecular Diagnosis of Tuberculosis and Its Resistance to Rifampicin and Isoniazid with Automated MDR/MTB ELITe MGB® Assay. *Antibiotics* **10**, 797 (2021).
80. Hodille, E. *et al.* 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. *Pathog. Basel Switz.* **10**, 176 (2021).
81. Notomi, T., Mori, Y., Tomita, N. & Kanda, H. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): principle, features, and future prospects. *Journal of Microbiology* vol. 53 1–5 Preprint at <https://doi.org/10.1007/s12275-015-4656-9> (2015).
82. Higuchi, R., Dollinger, G., Sean Walsh, P. & Griffith, R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Bio/Technology* **10**, 413–417 (1992).
83. WHO (World Health Organization). *The use of loop-mediated isothermal amplification (TB-LAMP) for the diagnosis of pulmonary tuberculosis POLICY GUIDANCE.* (2016).
84. Nyaruaba, R., Mwaliko, C., Kering, K. K. & Wei, H. Droplet digital PCR applications in the tuberculosis world. *Tuberculosis* **117**, 85–92 (2019).
85. Fan, Y. *et al.* Application of Droplet Digital PCR to Detection of Mycobacterium tuberculosis and Mycobacterium leprae Infections: A Narrative Review. *Infect. Drug Resist.* **15**, 1067–1076 (2022).
86. Zhao, Z. *et al.* A new droplet digital PCR assay: improving detection of paucibacillary smear-negative pulmonary tuberculosis. *Int. J. Infect. Dis. IJID Off. Publ. Int. Soc. Infect. Dis.* **122**, 820–828 (2022).
87. Streptomycin Treatment of Pulmonary Tuberculosis: A Medical Research Council Investigation. *BMJ* **2**, 769–782 (1948).
88. Crofton, J. & Mitchison, D. A. Streptomycin Resistance in Pulmonary Tuberculosis. *Br. Med. J.* **2**, 1009–1015 (1948).
89. Ahmad, N. *et al.* Treatment correlates of successful outcomes in pulmonary multidrug-resistant tuberculosis: an individual patient data meta-analysis. *The Lancet* **392**, 821–834 (2018).
90. *WHO consolidated guidelines on tuberculosis: Module 4: Treatment - Drug-resistant tuberculosis treatment.* (World Health Organization, 2020).

91. WHO announces updated definitions of extensively drug-resistant tuberculosis. <https://www.who.int/news/item/27-01-2021-who-announces-updated-definitions-of-extensively-drug-resistant-tuberculosis>.
92. Viney, K. *et al.* New definitions of pre-extensively and extensively drug-resistant tuberculosis: update from the World Health Organization. *Eur. Respir. J.* **57**, (2021).
93. Anti-tuberculosis drug resistance in the world: fourth global report. <https://www.who.int/publications-detail-redirect/9789241563611>.
94. Poulton, N. C. & Rock, J. M. Unraveling the mechanisms of intrinsic drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **12**, 997283 (2022).
95. Veziris, N. *et al.* Impact of the revised definition of extensively drug resistant tuberculosis. *Eur. Respir. J.* 2100641 (2021) doi:10.1183/13993003.00641-2021.
96. Gygli, S. M., Borrell, S., Trauner, A. & Gagneux, S. Antimicrobial resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: mechanistic and evolutionary perspectives. *FEMS Microbiol. Rev.* **41**, 354–373 (2017).
97. da Silva, P. E. A., Von Groll, A., Martin, A. & Palomino, J. C. Efflux as a mechanism for drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **63**, 1–9 (2011).
98. Andries, K. *et al.* Acquired resistance of *Mycobacterium tuberculosis* to bedaquiline. *PLoS One* **9**, e102135 (2014).
99. Black, P. A. *et al.* Energy metabolism and drug efflux in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **58**, 2491–2503 (2014).
100. Remm, S., Earp, J. C., Dick, T., Dartois, V. & Seeger, M. A. Critical discussion on drug efflux in *Mycobacterium tuberculosis*. *FEMS Microbiol. Rev.* fuab050 (2021) doi:10.1093/femsre/fuab050.
101. Chen, C. *et al.* Verapamil Targets Membrane Energetics in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **62**, e02107-17 (2018).
102. Laws, M., Jin, P. & Rahman, K. M. Efflux pumps in *Mycobacterium tuberculosis* and their inhibition to tackle antimicrobial resistance. *Trends Microbiol.* **30**, 57–68 (2022).
103. Davies, J. Antibiotic Resistance in Mycobacteria. in *Genetics and Tuberculosis* (eds. Chadwick, D. J. & Cardew, G.) 195–208 (John Wiley & Sons, Ltd, 1998).
104. Kochi, A., Vareldzis, B. & Styblo, K. Multidrug-resistant tuberculosis and its control. *Res. Microbiol.* **144**, 104–110 (1993).
105. Gomes, L. C., Campino, S., Marinho, C. R. F., Clark, T. G. & Phelan, J. E. Whole genome sequencing reveals large deletions and other loss of function mutations in *Mycobacterium tuberculosis* drug resistance genes. *Microb. Genomics* **7**, (2021).
106. Villellas, C. *et al.* Unexpected high prevalence of resistance-associated Rv0678 variants in MDR-TB patients without documented prior use of clofazimine or bedaquiline. *J. Antimicrob. Chemother.* **72**, 684–690 (2017).
107. Xu, J. *et al.* Contribution of Pretomanid to Novel Regimens Containing Bedaquiline with either Linezolid or Moxifloxacin and Pyrazinamide in Murine Models of Tuberculosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **63**, e00021-19 (2019).
108. Ford, C. B. *et al.* Use of whole genome sequencing to estimate the mutation rate of *Mycobacterium tuberculosis* during latent infection. *Nat. Genet.* **43**, 482–486 (2011).
109. Merker, M. *et al.* Whole genome sequencing reveals complex evolution patterns of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* Beijing strains in patients. *PLoS One* **8**, e82551 (2013).

110. Liu, Q. *et al.* Within patient microevolution of *Mycobacterium tuberculosis* correlates with heterogeneous responses to treatment. *Sci. Rep.* **5**, 17507 (2015).
111. Ley, S. D., de Vos, M., Van Rie, A. & Warren, R. M. Deciphering Within-Host Microevolution of *Mycobacterium tuberculosis* through Whole-Genome Sequencing: the Phenotypic Impact and Way Forward. *Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR* **83**, (2019).
112. Bloemberg, G. V. *et al.* Acquired Resistance to Bedaquiline and Delamanid in Therapy for Tuberculosis. *N. Engl. J. Med.* **373**, 1986–1988 (2015).
113. Grosset, J. Bacteriologic basis of short-course chemotherapy for tuberculosis. *Clin. Chest Med.* **1**, 231–241 (1980).
114. Shima, T. Drug resistance in tuberculosis control. *Tubercle* **68**, 5–18 (1987).
115. Nimmo, C. *et al.* Evolution of *Mycobacterium tuberculosis* drug resistance in the genomic era. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **12**, 954074 (2022).
116. Eldholm, V. & Balloux, F. Antimicrobial Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: The Odd One Out. *Trends Microbiol.* **24**, 637–648 (2016).
117. Hu, Y. *et al.* Emergence of additional drug resistance during treatment of multidrug-resistant tuberculosis in China: a prospective cohort study. *Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **27**, 1805–1813 (2021).
118. Castro, R. A. D. *et al.* The Genetic Background Modulates the Evolution of Fluoroquinolone-Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol. Biol. Evol.* **37**, 195–207 (2020).
119. Gagneux, S. *et al.* Variable host-pathogen compatibility in *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 2869–2873 (2006).
120. Ford, C. B. *et al.* *Mycobacterium tuberculosis* mutation rate estimates from different lineages predict substantial differences in the emergence of drug-resistant tuberculosis. *Nat. Genet.* **45**, 784–790 (2013).
121. Werngren, J. & Hoffner, S. E. Drug-susceptible *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype does not develop mutation-conferred resistance to rifampin at an elevated rate. *J. Clin. Microbiol.* **41**, 1520–1524 (2003).
122. Castro RAD, Borrell S, Gagneux S. The within-host evolution of antimicrobial resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *FEMS Microbiol Rev.* 2021 Aug 17;45(4):fuaa071. doi: 10.1093/femsre/fuaa071. PMID: 33320947; PMCID: PMC8371278
123. Metcalfe, J. Z. *et al.* Cryptic Microheteroresistance Explains *Mycobacterium tuberculosis* Phenotypic Resistance. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **196**, 1191–1201 (2017).
124. Mariam, S. H., Werngren, J., Aronsson, J., Hoffner, S. & Andersson, D. I. Dynamics of antibiotic resistant *Mycobacterium tuberculosis* during long-term infection and antibiotic treatment. *PLoS One* **6**, e21147 (2011).
125. Sun, G. *et al.* Dynamic population changes in *Mycobacterium tuberculosis* during acquisition and fixation of drug resistance in patients. *J. Infect. Dis.* **206**, 1724–1733 (2012).
126. Operario, D. J. *et al.* Prevalence and extent of heteroresistance by next generation sequencing of multidrug-resistant tuberculosis. *PLoS One* **12**, e0176522 (2017).
127. Nimmo, C. *et al.* Dynamics of within-host *Mycobacterium tuberculosis* diversity and heteroresistance during treatment. *EBioMedicine* **55**, 102747 (2020).
128. Eilertson, B. *et al.* High proportion of heteroresistance in *gyrA* and *gyrB* in fluoroquinolone-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* **58**, 3270–3275 (2014).

129. Rigouts, L. *et al.* Fluoroquinolone heteroresistance in *Mycobacterium tuberculosis*: detection by genotypic and phenotypic assays in experimentally mixed populations. *Sci. Rep.* **9**, 11760 (2019).
130. de Vos, M. *et al.* Bedaquiline Microheteroresistance after Cessation of Tuberculosis Treatment. *N. Engl. J. Med.* **380**, 2178–2180 (2019).
131. Brauner, A., Fridman, O., Gefen, O. & Balaban, N. Q. Distinguishing between resistance, tolerance and persistence to antibiotic treatment. *Nat. Rev. Microbiol.* **14**, 320–330 (2016).
132. Mirsaeidi, M. & Sadikot, R. T. Patients at high risk of tuberculosis recurrence. *Int. J. Mycobacteriology* **7**, 1–6 (2018).
133. Sarathy, J. P. *et al.* Extreme Drug Tolerance of *Mycobacterium tuberculosis* in Caseum. *Antimicrob. Agents Chemother.* **62**, e02266-17 (2018).
134. Kapoor, N. *et al.* Human granuloma in vitro model, for TB dormancy and resuscitation. *PloS One* **8**, e53657 (2013).
135. Manina, G., Dhar, N. & McKinney, J. D. Stress and host immunity amplify *Mycobacterium tuberculosis* phenotypic heterogeneity and induce nongrowing metabolically active forms. *Cell Host Microbe* **17**, 32–46 (2015).
136. Javid, B. *et al.* Mycobacterial mistranslation is necessary and sufficient for rifampicin phenotypic resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, 1132–1137 (2014).
137. Girgis, H. S., Harris, K. & Tavazoie, S. Large mutational target size for rapid emergence of bacterial persistence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 12740–12745 (2012).
138. Liu, J., Gefen, O., Ronin, I., Bar-Meir, M. & Balaban, N. Q. Effect of tolerance on the evolution of antibiotic resistance under drug combinations. *Science* **367**, 200–204 (2020).
139. Bellerose, M. M. *et al.* Common Variants in the Glycerol Kinase Gene Reduce Tuberculosis Drug Efficacy. *mBio* **10**, e00663-19 (2019).
140. Safi, H. *et al.* Phase variation in *Mycobacterium tuberculosis* glpK produces transiently heritable drug tolerance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **116**, 19665–19674 (2019).
141. Safi, H., Sherman, D. R., Dick, T. & Alland, D. Reply to Vargas and Farhat: *Mycobacterium tuberculosis* glpK mutants in human tuberculosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **117**, 3913–3914 (2020).
142. Hicks, N. D., Carey, A. F., Yang, J., Zhao, Y. & Fortune, S. M. Bacterial Genome-Wide Association Identifies Novel Factors That Contribute to Ethionamide and Prothionamide Susceptibility in *Mycobacterium tuberculosis*. *mBio* **10**, (2019).
143. Toungousova, O. S., Caugant, D. A., Sandven, P., Mariandyshev, A. O. & Bjune, G. Impact of drug resistance on fitness of *Mycobacterium tuberculosis* strains of the W-Beijing genotype. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **42**, 281–290 (2004).
144. Cohen, T., Sommers, B. & Murray, M. The effect of drug resistance on the fitness of *Mycobacterium tuberculosis*. *Lancet Infect. Dis.* **3**, 13–21 (2003).
145. Gillespie, S. H. Antibiotic resistance in the absence of selective pressure. *Int. J. Antimicrob. Agents* **17**, 171–176 (2001).
146. Andersson, D. I. & Hughes, D. Antibiotic resistance and its cost: is it possible to reverse resistance? *Nat. Rev. Microbiol.* **8**, 260–271 (2010).
147. Gagneux, S. *et al.* The competitive cost of antibiotic resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Science* **312**, 1944–1946 (2006).
148. Gagneux, S. *et al.* Impact of bacterial genetics on the transmission of isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS Pathog.* **2**, e61 (2006).

149. Comas, I. *et al.* Whole-genome sequencing of rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains identifies compensatory mutations in RNA polymerase genes. *Nat. Genet.* **44**, 106–110 (2012).
150. Müller, B., Borrell, S., Rose, G. & Gagneux, S. The heterogeneous evolution of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Trends Genet. TIG* **29**, 160–169 (2013).
151. Song, T. *et al.* Fitness costs of rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* are amplified under conditions of nutrient starvation and compensated by mutation in the β' subunit of RNA polymerase. *Mol. Microbiol.* **91**, 1106–1119 (2014).
152. Casali, N. *et al.* Evolution and transmission of drug-resistant tuberculosis in a Russian population. *Nat. Genet.* **46**, 279–286 (2014).
153. Fonseca, J. D., Knight, G. M. & McHugh, T. D. The complex evolution of antibiotic resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Int. J. Infect. Dis. IJID Off. Publ. Int. Soc. Infect. Dis.* **32**, 94–100 (2015).
154. Sherman, D. R. *et al.* Compensatory *ahpC* gene expression in isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Science* **272**, 1641–1643 (1996).
155. de Vos, M. *et al.* Putative compensatory mutations in the *rpoC* gene of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* are associated with ongoing transmission. *Antimicrob. Agents Chemother.* **57**, 827–832 (2013).
156. Comas, I. *et al.* Whole-genome sequencing of rifampicin-resistant *M. tuberculosis* strains identifies compensatory mutations in RNA polymerase. *Nat. Genet.* **44**, 106–110 (2011).
157. Reeves, A. Z., Campbell, P. J., Willby, M. J. & Posey, J. E. Disparities in capreomycin resistance levels associated with the *rrs* A1401G mutation in clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **59**, 444–449 (2015).
158. Phillips, P. C. Epistasis--the essential role of gene interactions in the structure and evolution of genetic systems. *Nat. Rev. Genet.* **9**, 855–867 (2008).
159. Borrell, S. *et al.* Epistasis between antibiotic resistance mutations drives the evolution of extensively drug-resistant tuberculosis. *Evol. Med. Public Health* **2013**, 65–74 (2013).
160. Trindade, S. *et al.* Positive epistasis drives the acquisition of multidrug resistance. *PLoS Genet.* **5**, e1000578 (2009).
161. Yoshida, S. *et al.* Bacterial population kinetics in heteroresistant *Mycobacterium tuberculosis* harbouring rare resistance-conferring mutations in *gyrA* and *rpoB* imply an epistatic interaction of mutations in a pre-XDR-TB patient. *J. Antimicrob. Chemother.* **75**, 1722–1725 (2020).
162. Pym, A. S., Saint-Joanis, B. & Cole, S. T. Effect of *katG* mutations on the virulence of *Mycobacterium tuberculosis* and the implication for transmission in humans. *Infect. Immun.* **70**, 4955–4960 (2002).
163. Brossier, F., Cambau, E., Tessier, E., Jarlier, V. & Sougakoff, W. The in vitro mechanisms of isoniazid and ethionamide resistance poorly reflect those in vivo in *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberc. Edinb. Scotl.* **101**, 144–145 (2016).
164. Trauner, A., Borrell, S., Reither, K. & Gagneux, S. Evolution of Drug Resistance in Tuberculosis: Recent Progress and Implications for Diagnosis and Therapy. *Drugs* **74**, 1063–1072 (2014).
165. Ramaswamy, S. V. *et al.* Single nucleotide polymorphisms in genes associated with isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**, 1241–1250 (2003).
166. Vilchèze, C. & Jacobs, W. R. Resistance to Isoniazid and Ethionamide in *Mycobacterium tuberculosis*: Genes, Mutations, and Causalities. *Microbiol. Spectr.* **2**, MGM2-0014–2013 (2014).

167. Banerjee, A. *et al.* inhA, a gene encoding a target for isoniazid and ethionamide in *Mycobacterium tuberculosis*. *Science* **263**, 227–230 (1994).
168. Larsen, M. H. *et al.* Overexpression of inhA, but not kasA, confers resistance to isoniazid and ethionamide in *Mycobacterium smegmatis*, *M. bovis* BCG and *M. tuberculosis*. *Mol. Microbiol.* **46**, 453–466 (2002).
169. Vilchèze, C. *et al.* Transfer of a point mutation in *Mycobacterium tuberculosis* inhA resolves the target of isoniazid. *Nat. Med.* **12**, 1027–1029 (2006).
170. Machado, D. *et al.* High-level resistance to isoniazid and ethionamide in multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* of the Lisboa family is associated with inhA double mutations. *J. Antimicrob. Chemother.* **68**, 1728–1732 (2013).
171. Ando, H., Miyoshi-Akiyama, T., Watanabe, S. & Kirikae, T. A silent mutation in mabA confers isoniazid resistance on *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol. Microbiol.* **91**, 538–547 (2014).
172. Dickinson, J. M. & Mitchison, D. A. Experimental Models to Explain the High Sterilizing Activity of Rifampin in the Chemotherapy of Tuberculosis. *Am. Rev. Respir. Dis.* **123**, 367–371 (1981).
173. Prideaux, B. *et al.* The association between sterilizing activity and drug distribution into tuberculosis lesions. *Nat. Med.* **21**, 1223–1227 (2015).
174. Rifat, D. *et al.* Pharmacokinetics of rifapentine and rifampin in a rabbit model of tuberculosis and correlation with clinical trial data. *Sci. Transl. Med.* **10**, eaai7786 (2018).
175. Somoskovi, A., Parsons, L. M. & Salfinger, M. The molecular basis of resistance to isoniazid, rifampin, and pyrazinamide in *Mycobacterium tuberculosis*. *Respir. Res.* **2**, 164–168 (2001).
176. Almeida Da Silva, P. E. A. & Palomino, J. C. Molecular basis and mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: classical and new drugs. *J. Antimicrob. Chemother.* **66**, 1417–1430 (2011).
177. Miotto, P., Cabibbe, A. M., Borroni, E., Degano, M. & Cirillo, D. M. 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**, (2018).
178. Technical Report on critical concentrations for drug susceptibility testing of isoniazid and the rifamycins (rifampicin, rifabutin and rifapentine). <https://www.who.int/publications-detail-redirect/9789240017283>.
179. Heep, M., Rieger, U., Beck, D. & Lehn, N. Mutations in the beginning of the rpoB gene can induce resistance to rifamycins in both *Helicobacter pylori* and *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**, 1075–1077 (2000).
180. Hu, Y., Coates, A. R. & Mitchison, D. A. Sterilising action of pyrazinamide in models of dormant and rifampicin-tolerant *Mycobacterium tuberculosis*. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* **10**, 317–322 (2006).
181. Scorpio, A. & Zhang, Y. Mutations in pncA, a gene encoding pyrazinamidase/nicotinamidase, cause resistance to the antituberculous drug pyrazinamide in *tubercle bacillus*. *Nat. Med.* **2**, 662–667 (1996).
182. Gopal, P. *et al.* Pyrazinamide triggers degradation of its target aspartate decarboxylase. *Nat. Commun.* **11**, 1661 (2020).
183. Rajendran, A. & Palaniyandi, K. Mutations Associated with Pyrazinamide Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: A Review and Update. *Curr. Microbiol.* **79**, 348 (2022).
184. Werngren, J., Alm, E. & Mansjö, M. Non-pncA Gene-Mutated but Pyrazinamide-Resistant *Mycobacterium tuberculosis*: Why Is That? *J. Clin. Microbiol.* **55**, 1920–1927 (2017).

185. Whitfield, M. G. *et al.* A Global Perspective on Pyrazinamide Resistance: Systematic Review and Meta-Analysis. *PloS One* **10**, e0133869 (2015).
186. Alexander, D. C. *et al.* Gene sequencing for routine verification of pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: a role for *pncA* but not *rpsA*. *J. Clin. Microbiol.* **50**, 3726–3728 (2012).
187. Simons, S. O., Mulder, A., Ingen, J. van, Boeree, M. J. & Soolingen, D. van. Role of *rpsA* Gene Sequencing in Diagnosis of Pyrazinamide Resistance. *J. Clin. Microbiol.* **51**, 382–382 (2013).
188. Takayama, K. & Kilburn, J. O. Inhibition of synthesis of arabinogalactan by ethambutol in *Mycobacterium smegmatis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **33**, 1493–1499 (1989).
189. Palomino, J. C. & Martin, A. Drug Resistance Mechanisms in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antibiot. Basel Switz.* **3**, 317–340 (2014).
190. Mikusová, K., Slayden, R. A., Besra, G. S. & Brennan, P. J. Biogenesis of the mycobacterial cell wall and the site of action of ethambutol. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**, 2484–2489 (1995).
191. Safi, H. *et al.* Evolution of high-level ethambutol-resistant tuberculosis through interacting mutations in decaprenylphosphoryl- β -D-arabinose biosynthetic and utilization pathway genes. *Nat. Genet.* **45**, 1190–1197 (2013).
192. He, L. *et al.* *ubiA* (Rv3806c) encoding DPPR synthase involved in cell wall synthesis is associated with ethambutol resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberc. Edinb. Scotl.* **95**, 149–154 (2015).
193. Sharma, K. *et al.* Transcriptional control of the mycobacterial *embCAB* operon by PknH through a regulatory protein, EmbR, in vivo. *J. Bacteriol.* **188**, 2936–2944 (2006).
194. Moazed, D. & Noller, H. F. Interaction of antibiotics with functional sites in 16S ribosomal RNA. *Nature* **327**, 389–394 (1987).
195. Finken, M., Kirschner, P., Meier, A., Wrede, A. & Böttger, E. C. Molecular basis of streptomycin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: alterations of the ribosomal protein S12 gene and point mutations within a functional 16S ribosomal RNA pseudoknot. *Mol. Microbiol.* **9**, 1239–1246 (1993).
196. Okamoto, S. *et al.* Loss of a conserved 7-methylguanosine modification in 16S rRNA confers low-level streptomycin resistance in bacteria. *Mol. Microbiol.* **63**, 1096–1106 (2007).
197. Jagielski, T. *et al.* Screening for streptomycin resistance-conferring mutations in *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from Poland. *PloS One* **9**, e100078 (2014).
198. Richter, E., Rüscher-Gerdes, S. & Hillemann, D. First linezolid-resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**, 1534–1536 (2007).
199. Kadura, S. *et al.* Systematic review of mutations associated with resistance to the new and repurposed *Mycobacterium tuberculosis* drugs bedaquiline, clofazimine, linezolid, delamanid and pretomanid. *J. Antimicrob. Chemother.* **75**, 2031–2043 (2020).
200. Walsh, C. T. Enzymes in the D-alanine branch of bacterial cell wall peptidoglycan assembly. *J. Biol. Chem.* **264**, 2393–2396 (1989).
201. Evangelopoulos, D. *et al.* Comparative fitness analysis of D-cycloserine resistant mutants reveals both fitness-neutral and high-fitness cost genotypes. *Nat. Commun.* **10**, 4177 (2019).
202. Wei, J.-R. *et al.* Depletion of antibiotic targets has widely varying effects on growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 4176–4181 (2011).
203. Desjardins, C. A. *et al.* Genomic and functional analyses of *Mycobacterium tuberculosis* strains implicate *ald* in D-cycloserine resistance. *Nat. Genet.* **48**, 544–551 (2016).

204. Georghiou, S. B. *et al.* Evaluation of genetic mutations associated with Mycobacterium tuberculosis resistance to amikacin, kanamycin and capreomycin: a systematic review. *PloS One* **7**, e33275 (2012).
205. Alangaden, G. J. *et al.* Mechanism of resistance to amikacin and kanamycin in Mycobacterium tuberculosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**, 1295–1297 (1998).
206. Catalogue of mutations in Mycobacterium tuberculosis complex and their association with drug resistance. <https://www.who.int/publications-detail-redirect/9789240028173>.
207. Zaunbrecher, M. A., Sikes, R. D., Metchock, B., Shinnick, T. M. & Posey, J. E. Overexpression of the chromosomally encoded aminoglycoside acetyltransferase eis confers kanamycin resistance in Mycobacterium tuberculosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 20004–20009 (2009).
208. Oelofse, S. *et al.* Pretomanid with bedaquiline and linezolid for drug-resistant TB: a comparison of prospective cohorts. *Int. J. Tuberc. Lung Dis. Off. J. Int. Union Tuberc. Lung Dis.* **25**, 453–460 (2021).
209. Singh, R. *et al.* PA-824 Kills Nonreplicating Mycobacterium tuberculosis by Intracellular NO Release. *Science* **322**, 1392–1395 (2008).
210. Matsumoto, M. *et al.* OPC-67683, a Nitro-Dihydro-Imidazooxazole Derivative with Promising Action against Tuberculosis In Vitro and In Mice. *PLOS Med.* **3**, e466 (2006).
211. Khoshnood, S. *et al.* Mechanism of Action, Resistance, Synergism, and Clinical Implications of Delamanid Against Multidrug-Resistant Mycobacterium tuberculosis. *Front. Microbiol.* **12**, (2021).
212. Vilchèze, C. Mycobacterial Cell Wall: A Source of Successful Targets for Old and New Drugs. *Appl. Sci.* **10**, 2278 (2020).
213. Carette, X. *et al.* Structural activation of the transcriptional repressor EthR from Mycobacterium tuberculosis by single amino acid change mimicking natural and synthetic ligands. *Nucleic Acids Res.* **40**, 3018–3030 (2012).
214. Brossier, F., Veziris, N., Truffot-Pernot, C., Jarlier, V. & Sougakoff, W. Molecular investigation of resistance to the antituberculous drug ethionamide in multidrug-resistant clinical isolates of Mycobacterium tuberculosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **55**, 355–360 (2011).
215. Maitre, T. *et al.* How a PCR Sequencing Strategy Can Bring New Data to Improve the Diagnosis of Ethionamide Resistance. *Microorganisms* **10**, 1436 (2022).
216. Vilchèze, C. *et al.* Mycothiol biosynthesis is essential for ethionamide susceptibility in Mycobacterium tuberculosis. *Mol. Microbiol.* **69**, 1316–1329 (2008).
217. Rueda, J. *et al.* Genotypic Analysis of Genes Associated with Independent Resistance and Cross-Resistance to Isoniazid and Ethionamide in Mycobacterium tuberculosis Clinical Isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* **59**, 7805–7810 (2015).
218. Rengarajan, J. *et al.* The folate pathway is a target for resistance to the drug para-aminosalicylic acid (PAS) in mycobacteria. *Mol. Microbiol.* **53**, 275–282 (2004).
219. Zhao, F. *et al.* Binding pocket alterations in dihydrofolate synthase confer resistance to para-aminosalicylic acid in clinical isolates of Mycobacterium tuberculosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **58**, 1479–1487 (2014).
220. Zhang, X. *et al.* Genetic determinants involved in p-aminosalicylic acid resistance in clinical isolates from tuberculosis patients in northern China from 2006 to 2012. *Antimicrob. Agents Chemother.* **59**, 1320–1324 (2015).

221. Dookie, N., Rambaran, S., Padayatchi, N., Mahomed, S. & Naidoo, K. Evolution of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis: a review on the molecular determinants of resistance and implications for personalized care. *J. Antimicrob. Chemother.* **73**, 1138–1151 (2018).
222. Yee, M., Gopal, P. & Dick, T. Missense Mutations in the Unfoldase ClpC1 of the Caseinolytic Protease Complex Are Associated with Pyrazinamide Resistance in Mycobacterium tuberculosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **61**, e02342-16 (2017).
223. Novick Jr: Development of in vitro susceptibility... - Google Scholar. https://scholar.google.com/scholar_lookup?title=M23:+Development+of+In+Vitro+Susceptibility+Testing+Criteria+and+Quality+Control+Parameters&publication_year=2018&.
224. Woods, G. L. *et al.* *Susceptibility Testing of Mycobacteria, Nocardiae, and Other Aerobic Actinomycetes*. (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2011).
225. Technical Report on critical concentrations for drug susceptibility testing of medicines used in the treatment of drug-resistant tuberculosis. <https://www.who.int/publications-detail-redirect/WHO-CDS-TB-2018.5>.
226. Schön, T. *et al.* Antimicrobial susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis complex isolates – the EUCAST broth microdilution reference method for MIC determination. *Clin. Microbiol. Infect.* **26**, 1488–1492 (2020).
227. 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. (Paris)* **27**, 217–272 (1963).
228. Bemer, P., Palicova, F., Rüscher-Gerdes, S., Drugeon, H. B. & Pfyffer, G. E. Multicenter Evaluation of Fully Automated BACTEC Mycobacteria Growth Indicator Tube 960 System for Susceptibility Testing of Mycobacterium tuberculosis. *J. Clin. Microbiol.* **40**, 150–154 (2002).
229. Rodrigues, C. *et al.* Drug susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis against second-line drugs using the Bactec MGIT 960 System. *Int. J. Tuberc. Lung Dis. Off. J. Int. Union Tuberc. Lung Dis.* **12**, 1449–1455 (2008).
230. Springer, B., Lucke, K., Calligaris-Maibach, R., Ritter, C. & Böttger, E. C. Quantitative Drug Susceptibility Testing of Mycobacterium tuberculosis by Use of MGIT 960 and EpiCenter Instrumentation. *J. Clin. Microbiol.* **47**, 1773–1780 (2009).
231. Cambau, E. *et al.* Mycobacterial Growth Indicator Tube Versus the Proportion Method on Löwenstein-Jensen Medium for Antibiotic Susceptibility Testing of Mycobacterium tuberculosis. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **19**, 938–942 (2000).
232. Consortium, T. Cr. & Fowler, P. W. Epidemiological cutoff values for a 96-well broth microdilution plate for high-throughput research antibiotic susceptibility testing of M. tuberculosis. 2021.02.24.21252386 Preprint at <https://doi.org/10.1101/2021.02.24.21252386> (2021).
233. Brady, M. F., Coronel, J., Gilman, R. H. & Moore, D. A. The MODS method for diagnosis of tuberculosis and multidrug resistant tuberculosis. *J. Vis. Exp. JoVE* (2008) doi:10.3791/845.
234. Zimic, M. *et al.* Development of low-cost inverted microscope to detect early growth of Mycobacterium tuberculosis in MODS culture. *PloS One* **5**, e9577 (2010).
235. Moore, D. A. J. *et al.* Microscopic-observation drug-susceptibility assay for the diagnosis of TB. *N. Engl. J. Med.* **355**, 1539–1550 (2006).
236. Wikman-Jorgensen, P. *et al.* Microscopic observation drug susceptibility assay for the diagnosis of TB and MDR-TB in HIV-infected patients: a systematic review and meta-analysis. *Eur. Respir. J.* **44**, 973–984 (2014).

237. Martin, A., Portaels, F. & Palomino, J. C. Colorimetric redox-indicator methods for the rapid detection of multidrug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: a systematic review and meta-analysis. *J. Antimicrob. Chemother.* **59**, 175–183 (2007).
238. Angeby, K. A. K., Klintz, L. & Hoffner, S. E. Rapid and inexpensive drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* with a nitrate reductase assay. *J. Clin. Microbiol.* **40**, 553–555 (2002).
239. Walker, T. M. *et al.* Whole-genome sequencing for prediction of *Mycobacterium tuberculosis* drug susceptibility and resistance: a retrospective cohort study. *Lancet Infect. Dis.* **15**, 1193–1202 (2015).
240. Technical manual for drug susceptibility testing of medicines used in the treatment of tuberculosis. <https://www.who.int/publications-detail-redirect/9789241514842>.
241. Global Tuberculosis Report s. <https://www.who.int/teams/global-tuberculosis-programme/tb-reports>.
242. Aubry, A. *et al.* First evaluation of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from Congo revealed misdetection of fluoroquinolone resistance by line probe assay due to a double substitution T80A-A90G in GyrA. *PLoS One* **9**, e95083 (2014).
243. Feuerriegel, S. *et al.* PhyResSE: a Web Tool Delineating *Mycobacterium tuberculosis* Antibiotic Resistance and Lineage from Whole-Genome Sequencing Data. *J. Clin. Microbiol.* **53**, 1908–1914 (2015).
244. Phelan, J. E. *et al.* Integrating informatics tools and portable sequencing technology for rapid detection of resistance to anti-tuberculous drugs. *Genome Med.* **11**, 41 (2019).
245. Miotto, P. *et al.* A standardised method for interpreting the association between mutations and phenotypic drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Eur. Respir. J.* **50**, 1701354 (2017).
246. Dooley, K. E. *et al.* Early Bactericidal Activity of Different Isoniazid Doses for Drug-Resistant Tuberculosis (INHindsight): A Randomized, Open-Label Clinical Trial. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **201**, 1416–1424 (2020).
247. van Ingen, J., Aarnoutse, R., de Vries, G., Boeree, M. J. & van Soolingen, D. Low-level rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains raise a new therapeutic challenge [Short communication]. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* **15**, 990–992 (2011).
248. Chien, J.-Y. *et al.* Mutations in *gyrA* and *gyrB* among Fluoroquinolone- and Multidrug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* **60**, 2090–2096 (2016).
249. Guglielmetti, L. *et al.* Poor performance of rapid molecular tests to define eligibility for the shortcourse MDR-TB regimen. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* (2018) doi:10.1093/cid/ciy808.
250. Traore, H., Fissette, K., Bastian, I., Devleeschouwer, M. & Portaels, F. Detection of rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from diverse countries by a commercial line probe assay as an initial indicator of multidrug resistance. *Int. J. Tuberc. Lung Dis. Off. J. Int. Union Tuberc. Lung Dis.* **4**, 481–484 (2000).
251. Malenfant, J. H. & Brewer, T. F. Rifampicin Mono-Resistant Tuberculosis—A Review of an Uncommon But Growing Challenge for Global Tuberculosis Control. *Open Forum Infect. Dis.* **8**, ofab018 (2021).
252. Romanowski, K. *et al.* The impact of improved detection and treatment of isoniazid resistant tuberculosis on prevalence of multi-drug resistant tuberculosis: A modelling study. *PLoS ONE* **14**, e0211355 (2019).
253. Dean, A. S. *et al.* Prevalence and genetic profiles of isoniazid resistance in tuberculosis patients: A multicountry analysis of cross-sectional data. *PLOS Med.* **17**, e1003008 (2020).

254. WHO treatment guidelines for isoniazid-resistant tuberculosis: Supplement to the WHO treatment guidelines for drug-resistant tuberculosis. (World Health Organization, 2018).
255. Jacobson, K. R. *et al.* Treatment outcomes of isoniazid-resistant tuberculosis patients, Western Cape Province, South Africa. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* **53**, 369–372 (2011).
256. Gegia, M., Cohen, T., Kalandadze, I., Vashakidze, L. & Furin, J. Outcomes among tuberculosis patients with isoniazid resistance in Georgia, 2007-2009. *Int. J. Tuberc. Lung Dis. Off. J. Int. Union Tuberc. Lung Dis.* **16**, 812–816 (2012).
257. Bachir, M. *et al.* Molecular detection of isoniazid monoresistance improves tuberculosis treatment: A retrospective cohort in France. *J. Infect.* **85**, 24–30 (2022).
258. HCSP. *Tuberculoses à bacilles résistants : diagnostic et prise en charge. Rapport de l'HCSP* <https://www.hcsp.fr/Explore.cgi/avisrapportsdomaine?clefr=483> (2014).
259. Pillay, S. *et al.* Xpert MTB/XDR for detection of pulmonary tuberculosis and resistance to isoniazid, fluoroquinolones, ethionamide, and amikacin. *Cochrane Database Syst. Rev.* **5**, CD014841 (2022).
260. Brossier, F. *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.* **54**, 1573–1580 (2016).
261. Kaswa, M. K. *et al.* Pseudo-outbreak of pre-extensively drug-resistant (Pre-XDR) tuberculosis in Kinshasa: collateral damage caused by false detection of fluoroquinolone resistance by GenoType MTBDRsl. *J. Clin. Microbiol.* **52**, 2876–2880 (2014).
262. Bonnet, I. *et al.* 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 (2021).
263. The use of next-generation sequencing technologies for the detection of mutations associated with drug resistance in Mycobacterium tuberculosis complex: technical guide. <https://www.who.int/publications-detail-redirect/WHO-CDS-TB-2018.19>.
264. Zetola, N. M. *et al.* Mixed Mycobacterium tuberculosis Complex Infections and False-Negative Results for Rifampin Resistance by GeneXpert MTB/RIF Are Associated with Poor Clinical Outcomes. *J. Clin. Microbiol.* **52**, 2422–2429 (2014).
265. Blakemore, R. *et al.* Evaluation of the analytical performance of the Xpert MTB/RIF assay. *J. Clin. Microbiol.* **48**, 2495–2501 (2010).
266. Ng, K. C. S. *et al.* How Well Do Routine Molecular Diagnostics Detect Rifampin Heteroresistance in Mycobacterium tuberculosis? *J. Clin. Microbiol.* **57**, e00717-19 (2019).
267. Chakravorty, S. *et al.* The New Xpert MTB/RIF Ultra: Improving Detection of Mycobacterium tuberculosis and Resistance to Rifampin in an Assay Suitable for Point-of-Care Testing. *mBio* **8**, (2017).
268. Cao, Y. *et al.* Xpert MTB/XDR: a 10-Color Reflex Assay Suitable for Point-of-Care Settings To Detect Isoniazid, Fluoroquinolone, and Second-Line-Injectable-Drug Resistance Directly from Mycobacterium tuberculosis-Positive Sputum. *J. Clin. Microbiol.* **59**, e02314-20 (2021).
269. Hofmann-Thiel, S. *et al.* Mechanisms of heteroresistance to isoniazid and rifampin of Mycobacterium tuberculosis in Tashkent, Uzbekistan. *Eur. Respir. J.* **33**, 368–374 (2009).
270. Folkvardsen, D. B. *et al.* Can Molecular Methods Detect 1% Isoniazid Resistance in Mycobacterium tuberculosis? *J. Clin. Microbiol.* **51**, 1596–1599 (2013).

271. Jouet, A. *et al.* Deep amplicon sequencing for culture-free prediction of susceptibility or resistance to 13 anti-tuberculous drugs. *Eur. Respir. J.* **57**, 2002338 (2021).
272. The CRyPTIC Consortium and the 100,000 Genomes Project. Prediction of Susceptibility to First-Line Tuberculosis Drugs by DNA Sequencing. *N. Engl. J. Med.* **379**, 1403–1415 (2018).
273. Gygli, S. M. *et al.* Whole genome sequencing for drug resistance profile prediction in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* (2019) doi:10.1128/AAC.02175-18.
274. Finci, I. *et al.* Investigating resistance in clinical *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates with genomic and phenotypic antimicrobial susceptibility testing: a multicentre observational study. *Lancet Microbe* **3**, e672–e682 (2022).
275. Hofmann-Thiel S, Plesnik S, Mihalic M, Heiß-Neumann M, Avsar K, Beutler M, Hoffmann H. Clinical Evaluation of BD MAX MDR-TB Assay for Direct Detection of *Mycobacterium tuberculosis* Complex and Resistance Markers. *J Mol Diagn.* 2020 Oct;22(10):1280-1286. doi: 10.1016/j.jmoldx.2020.06.013. Epub 2020 Jul 17. PMID: 32688054.
276. Sun, W., Gui, X., Wu, Z., Zhang, Y. & Yan, L. Prediction of drug resistance profile of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* (MDR-MTB) isolates from newly diagnosed case by whole genome sequencing (WGS): a study from a high tuberculosis burden country. *BMC Infect. Dis.* **22**, 499 (2022).
277. Fishbein, S., van Wyk, N., Warren, R. M. & Sampson, S. L. Phylogeny to function: PE/PPE protein evolution and impact on *Mycobacterium tuberculosis* pathogenicity. *Mol. Microbiol.* **96**, 901–916 (2015).
278. McEvoy, C. R. E. *et al.* Comparative analysis of *Mycobacterium tuberculosis* *pe* and *ppe* genes reveals high sequence variation and an apparent absence of selective constraints. *PloS One* **7**, e30593 (2012).
279. Meehan, C. J. *et al.* Whole genome sequencing of *Mycobacterium tuberculosis*: current standards and open issues. *Nat. Rev. Microbiol.* **17**, 533–545 (2019).
280. Nd, O. *et al.* Best practices for evaluating single nucleotide variant calling methods for microbial genomics. *Front. Genet.* **6**, (2015).
281. McKenna, A. *et al.* The Genome Analysis Toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Res.* **20**, 1297–1303 (2010).
282. Dai, J., Chen, Y. & Lauzardo, M. Web-accessible database of *hsp65* sequences from *Mycobacterium* reference strains. *J. Clin. Microbiol.* **49**, 2296–2303 (2011).
283. Demay, C. *et al.* SITVITWEB--a publicly available international multimarker database for studying *Mycobacterium tuberculosis* genetic diversity and molecular epidemiology. *Infect. Genet. Evol. J. Mol. Epidemiol. Evol. Genet. Infect. Dis.* **12**, 755–766 (2012).
284. Trauner, A. *et al.* The within-host population dynamics of *Mycobacterium tuberculosis* vary with treatment efficacy. *Genome Biol.* **18**, 71 (2017).
285. 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. (Paris)* **27**, 217–272 (1963).
286. Zignol, M. *et al.* Genetic sequencing for surveillance of drug resistance in tuberculosis in highly endemic countries: a multi-country population-based surveillance study. *Lancet Infect. Dis.* **18**, 675–683 (2018).
287. Pankhurst, L. J. *et al.* Rapid, comprehensive, and affordable mycobacterial diagnosis with whole-genome sequencing: a prospective study. *Lancet Respir. Med.* **4**, 49–58 (2016).

288. Doyle, R. M. *et al.* Direct Whole-Genome Sequencing of Sputum Accurately Identifies Drug-Resistant Mycobacterium tuberculosis Faster than MGIT Culture Sequencing. *J. Clin. Microbiol.* **56**, (2018).
289. George, S. *et al.* DNA Thermo-Protection Facilitates Whole-Genome Sequencing of Mycobacteria Direct from Clinical Samples. *J. Clin. Microbiol.* **58**, e00670-20 (2020).
290. Vargas, R. *et al.* In-host population dynamics of M. tuberculosis during treatment failure. 726430 Preprint at <https://doi.org/10.1101/726430> (2020).
291. Walker, T. M. *et al.* The 2021 WHO catalogue of Mycobacterium tuberculosis complex mutations associated with drug resistance: A genotypic analysis. *Lancet Microbe* **3**, e265–e273 (2022).
292. Consortium, T. Cr. Genome-wide association studies of global Mycobacterium tuberculosis resistance to 13 antimicrobials in 10,228 genomes identify new resistance mechanisms. *PLOS Biol.* **20**, e3001755 (2022).
293. Farhat, M. R. *et al.* GWAS for quantitative resistance phenotypes in Mycobacterium tuberculosis reveals resistance genes and regulatory regions. *Nat. Commun.* **10**, 2128 (2019).
294. Coll, F. *et al.* Genome-wide analysis of multi- and extensively drug-resistant Mycobacterium tuberculosis. *Nat. Genet.* **50**, 307–316 (2018).
295. Colangeli, R. *et al.* Bacterial Factors That Predict Relapse after Tuberculosis Therapy. *N. Engl. J. Med.* **379**, 823–833 (2018).
296. Bainomugisa, A. *et al.* A complete high-quality MinION nanopore assembly of an extensively drug-resistant Mycobacterium tuberculosis Beijing lineage strain identifies novel variation in repetitive PE/PPE gene regions. *Microb. Genomics* **4**, (2018).
297. Mahmoud, M. *et al.* Structural variant calling: the long and the short of it. *Genome Biol.* **20**, 246 (2019).
298. Rusu, A., Lungu, I.-A., Moldovan, O.-L., Tanase, C. & Hancu, G. Structural Characterization of the Millennial Antibacterial (Fluoro)Quinolones—Shaping the Fifth Generation. *Pharmaceutics* **13**, 1289 (2021).
299. Leshner, G. Y., Froelich, E. J., Gruett, M. D., Bailey, J. H. & Brundage, R. P. 1,8-naphthyridine derivatives. A new class of chemotherapeutic agents. *J. Med. Pharm. Chem.* **91**, 1063–1065 (1962).
300. Oliphant CM, Green GM. Quinolones: a comprehensive review. *Am Fam Physician.* 2002 Feb 1;65(3):455-64. PMID: 11858629.
301. Pham, T. D. M., Ziora, Z. M. & Blaskovich, M. A. T. Quinolone antibiotics. *MedChemComm* **10**, 1719–1739 (2019).
302. Gandelman, A. L. & Mann, P. H. MICROBIOLOGICAL STUDIES WITH NALIDIXIC ACID AND COLISTIN. *Curr. Ther. Res. Clin. Exp.* **6**, 424–430 (1964).
303. Ball, P. Quinolone generations: natural history or natural selection? *J. Antimicrob. Chemother.* **46 Suppl T1**, 17–24 (2000).
304. Yu, X. *et al.* Wild-Type and Non-Wild-Type Mycobacterium tuberculosis MIC Distributions for the Novel Fluoroquinolone Antofloxacin Compared with Those for Ofloxacin, Levofloxacin, and Moxifloxacin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **60**, 5232–5237 (2016).
305. Fung-Tomc, J. *et al.* In vitro antibacterial spectrum of a new broad-spectrum 8-methoxy fluoroquinolone, gatifloxacin. *J. Antimicrob. Chemother.* **45**, 437–446 (2000).
306. Rastogi, N., Labrousse, V. & Goh, K. S. In vitro activities of fourteen antimicrobial agents against drug susceptible and resistant clinical isolates of Mycobacterium tuberculosis and comparative

- intracellular activities against the virulent H37Rv strain in human macrophages. *Curr. Microbiol.* **33**, 167–175 (1996).
307. Cremades, R. *et al.* Comparison of the bactericidal activity of various fluoroquinolones against *Mycobacterium tuberculosis* in an in vitro experimental model. *J. Antimicrob. Chemother.* **66**, 2281–2283 (2011).
 308. Revel, V., Cambau, E., Jarlier, V. & Sougakoff, W. Characterization of mutations in *Mycobacterium smegmatis* involved in resistance to fluoroquinolones. *Antimicrob. Agents Chemother.* **38**, 1991–1996 (1994).
 309. Takiff, H. E. *et al.* Cloning and nucleotide sequence of *Mycobacterium tuberculosis* *gyrA* and *gyrB* genes and detection of quinolone resistance mutations. *Antimicrob. Agents Chemother.* **38**, 773–780 (1994).
 310. Van der Auwera, P., Matsumoto, T. & Husson, M. Intraphagocytic penetration of antibiotics. *J. Antimicrob. Chemother.* **22**, 185–192 (1988).
 311. Rastogi, N., Labrousse, V. & Goh, K. S. In vitro activities of fourteen antimicrobial agents against drug susceptible and resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* and comparative intracellular activities against the virulent H37Rv strain in human macrophages. *Curr. Microbiol.* **33**, 167–175 (1996).
 312. Prideaux, B. *et al.* The association between sterilizing activity and drug distribution into tuberculosis lesions. *Nat. Med.* **21**, 1223–1227 (2015).
 313. Shandil, R. K. *et al.* Moxifloxacin, ofloxacin, sparfloxacin, and ciprofloxacin against *Mycobacterium tuberculosis*: evaluation of in vitro and pharmacodynamic indices that best predict in vivo efficacy. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**, 576–582 (2007).
 314. Sbarbaro, J. A., Iseman, M. D. & Crowle, A. J. Combined effect of pyrazinamide and ofloxacin within the human macrophage. *Tuber. Lung Dis. Off. J. Int. Union Tuberc. Lung Dis.* **77**, 491–495 (1996).
 315. Ruiz-Serrano, M. J. *et al.* In Vitro Activities of Six Fluoroquinolones against 250 Clinical Isolates of *Mycobacterium tuberculosis* Susceptible or Resistant to First-Line Antituberculosis Drugs. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**, 2567–2568 (2000).
 316. Ji, B. *et al.* In vitro and in vivo activities of moxifloxacin and clinafloxacin against *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**, 2066–2069 (1998).
 317. Miyazaki, E., Miyazaki, M., Chen, J. M., Chaisson, R. E. & Bishai, W. R. Moxifloxacin (BAY12-8039), a new 8-methoxyquinolone, is active in a mouse model of tuberculosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**, 85–89 (1999).
 318. Lounis, N. *et al.* Effectiveness of once-weekly rifapentine and moxifloxacin regimens against *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**, 3482–3486 (2001).
 319. Hu, Y., Coates, A. R. M. & Mitchison, D. A. Sterilizing activities of fluoroquinolones against rifampin-tolerant populations of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**, 653–657 (2003).
 320. Ahmad, Z. *et al.* Contribution of moxifloxacin or levofloxacin in second-line regimens with or without continuation of pyrazinamide in murine tuberculosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **188**, 97–102 (2013).
 321. Johnson, J. L. *et al.* Early and extended early bactericidal activity of levofloxacin, gatifloxacin and moxifloxacin in pulmonary tuberculosis. *Int. J. Tuberc. Lung Dis. Off. J. Int. Union Tuberc. Lung Dis.* **10**, 605–612 (2006).
 322. Gosling, R. D. *et al.* The bactericidal activity of moxifloxacin in patients with pulmonary tuberculosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **168**, 1342–1345 (2003).

323. Pletz, M. W. R. *et al.* Early bactericidal activity of moxifloxacin in treatment of pulmonary tuberculosis: a prospective, randomized study. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**, 780–782 (2004).
324. Berry, C. *et al.* TB-PRACTECAL: study protocol for a randomised, controlled, open-label, phase II-III trial to evaluate the safety and efficacy of regimens containing bedaquiline and pretomanid for the treatment of adult patients with pulmonary multidrug-resistant tuberculosis. *Trials* **23**, 484 (2022).
325. Dorman, S. E. *et al.* Substitution of moxifloxacin for isoniazid during intensive phase treatment of pulmonary tuberculosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **180**, 273–280 (2009).
326. Gillespie, S. H. *et al.* Four-month moxifloxacin-based regimens for drug-sensitive tuberculosis. *N. Engl. J. Med.* **371**, 1577–1587 (2014).
327. Jindani, A. *et al.* High-dose rifapentine with moxifloxacin for pulmonary tuberculosis. *N. Engl. J. Med.* **371**, 1599–1608 (2014).
328. Mayer, C. & Takiff, H. The Molecular Genetics of Fluoroquinolone Resistance in Mycobacterium tuberculosis. *Microbiol. Spectr.* **2**, MGM2-0009–2013 (2014).
329. Aldred, K. J., Kerns, R. J. & Osheroff, N. Mechanism of quinolone action and resistance. *Biochemistry* **53**, 1565–1574 (2014).
330. Champoux, J. J. DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism. *Annu. Rev. Biochem.* **70**, 369–413 (2001).
331. Aubry, A., Pan, X.-S., Fisher, L. M., Jarlier, V. & Cambau, E. Mycobacterium tuberculosis DNA gyrase: interaction with quinolones and correlation with antimycobacterial drug activity. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**, 1281–1288 (2004).
332. Schoeffler, A. J. & Berger, J. M. DNA topoisomerases: harnessing and constraining energy to govern chromosome topology. *Q. Rev. Biophys.* **41**, 41–101 (2008).
333. Levine, C., Hiasa, H. & Marians, K. J. DNA gyrase and topoisomerase IV: biochemical activities, physiological roles during chromosome replication, and drug sensitivities. *Biochim. Biophys. Acta* **1400**, 29–43 (1998).
334. Postow, L., Crisona, N. J., Peter, B. J., Hardy, C. D. & Cozzarelli, N. R. Topological challenges to DNA replication: conformations at the fork. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 8219–8226 (2001).
335. Grompone, G., Ehrlich, S. D. & Michel, B. Replication restart in gyrB Escherichia coli mutants. *Mol. Microbiol.* **48**, 845–854 (2003).
336. Piton, J. *et al.* Structural Insights into the Quinolone Resistance Mechanism of Mycobacterium tuberculosis DNA Gyrase. *PLoS ONE* **5**, e12245 (2010).
337. Takiff, H. & Mayer, C. The Molecular Genetics of Fluoroquinolone Resistance in Mycobacterium tuberculosis. in *Molecular Genetics of Mycobacteria, Second Edition* (eds. Hatfull, G. F. & Jacobs, W. R.) 455–478 (American Society of Microbiology, 2014).
338. Kramlinger, V. M. & Hiasa, H. The ‘GyrA-box’ is required for the ability of DNA gyrase to wrap DNA and catalyze the supercoiling reaction. *J. Biol. Chem.* **281**, 3738–3742 (2006).
339. Roca, J., Berger, J. M., Harrison, S. C. & Wang, J. C. DNA transport by a type II topoisomerase: direct evidence for a two-gate mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 4057–4062 (1996).
340. Piton, J. *et al.* Structural Insights into the Quinolone Resistance Mechanism of Mycobacterium tuberculosis DNA Gyrase. *PLoS ONE* **5**, (2010).
341. Drlica, K. & Zhao, X. Bacterial death from treatment with fluoroquinolones and other lethal stressors. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* **19**, 601–618 (2021).

342. Maruri, F. *et al.* A systematic review of gyrase mutations associated with fluoroquinolone-resistant *Mycobacterium tuberculosis* and a proposed gyrase numbering system. *J. Antimicrob. Chemother.* **67**, 819–831 (2012).
343. Avalos, E. *et al.* Frequency and Geographic Distribution of *gyrA* and *gyrB* Mutations Associated with Fluoroquinolone Resistance in Clinical *Mycobacterium Tuberculosis* Isolates: A Systematic Review. *PloS One* **10**, e0120470 (2015).
344. Pantel, A. *et al.* Extending the definition of the *GyrB* quinolone resistance-determining region in *Mycobacterium tuberculosis* DNA gyrase for assessing fluoroquinolone resistance in *M. tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **56**, 1990–1996 (2012).
345. Kim, H. *et al.* Impact of the E540V amino acid substitution in *GyrB* of *Mycobacterium tuberculosis* on quinolone resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **55**, 3661–3667 (2011).
346. Malik, M. *et al.* Induction of mycobacterial resistance to quinolone class antimicrobials. *Antimicrob. Agents Chemother.* **56**, 3879–3887 (2012).
347. Groll, A. V. *et al.* Fluoroquinolone Resistance in *Mycobacterium tuberculosis* and Mutations in *gyrA* and *gyrB*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**, 4498–4500 (2009).
348. Brossier, F., Veziris, N., Aubry, A., Jarlier, V. & Sougakoff, W. 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**, 1683–1689 (2010).
349. Pantel, A. *et al.* Description of compensatory *gyrA* mutations restoring fluoroquinolone susceptibility in *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Antimicrob. Chemother.* (2016) doi:10.1093/jac/dkw169.
350. Malik, S., Willby, M., Sikes, D., Tsodikov, O. V. & Posey, J. E. New insights into fluoroquinolone resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: functional genetic analysis of *gyrA* and *gyrB* mutations. *PloS One* **7**, e39754 (2012).
351. Aubry, A. *et al.* Novel gyrase mutations in quinolone-resistant and -hypersusceptible clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*: functional analysis of mutant enzymes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**, 104–112 (2006).
352. Pasca, M. R. *et al.* Rv2686c-Rv2687c-Rv2688c, an ABC fluoroquinolone efflux pump in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**, 3175–3178 (2004).
353. Choudhuri, B. S. *et al.* Overexpression and functional characterization of an ABC (ATP-binding cassette) transporter encoded by the genes *drrA* and *drrB* of *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochem. J.* **367**, 279–285 (2002).
354. Banerjee, S. K., Bhatt, K., Misra, P. & Chakraborti, P. K. Involvement of a natural transport system in the process of efflux-mediated drug resistance in *Mycobacterium smegmatis*. *Mol. Gen. Genet. MGG* **262**, 949–956 (2000).
355. Bhatt, K., Banerjee, S. K. & Chakraborti, P. K. Evidence that phosphate specific transporter is amplified in a fluoroquinolone resistant *Mycobacterium smegmatis*. *Eur. J. Biochem.* **267**, 4028–4032 (2000).
356. Liu, J., Takiff, H. E. & Nikaido, H. Active efflux of fluoroquinolones in *Mycobacterium smegmatis* mediated by *LfrA*, a multidrug efflux pump. *J. Bacteriol.* **178**, 3791–3795 (1996).
357. Takiff, H. E. *et al.* Efflux pump of the proton antiporter family confers low-level fluoroquinolone resistance in *Mycobacterium smegmatis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 362–366 (1996).
358. Viveiros, M., Leandro, C. & Amaral, L. Mycobacterial efflux pumps and chemotherapeutic implications. *Int. J. Antimicrob. Agents* **22**, 274–278 (2003).

359. De Rossi, E. *et al.* The multidrug transporters belonging to major facilitator superfamily in *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol. Med. Camb. Mass* **8**, 714–724 (2002).
360. Gupta, A. K. *et al.* Estimation of efflux mediated multi-drug resistance and its correlation with expression levels of two major efflux pumps in mycobacteria. *J. Commun. Dis.* **38**, 246–254 (2006).
361. Ates, L. S. *et al.* Essential Role of the ESX-5 Secretion System in Outer Membrane Permeability of Pathogenic Mycobacteria. *PLoS Genet.* **11**, e1005190 (2015).
362. Eilertson, B. *et al.* A novel resistance mutation in *eccC 5* of the ESX-5 secretion system confers ofloxacin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Antimicrob. Chemother.* **71**, 2419–2427 (2016).
363. Blackman, A. *et al.* Re-evaluation of a novel resistance mutation in *eccC5* of the ESX-5 secretion system in ofloxacin-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Antimicrob. Chemother.* (2020) doi:10.1093/jac/dkaa507.
364. Chaiyachai, P. *et al.* Whole-genome analysis of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* reveals novel mutations associated with fluoroquinolone resistance. *Int. J. Antimicrob. Agents* 106385 (2021) doi:10.1016/j.ijantimicag.2021.106385.
365. Montero, C., Mateu, G., Rodriguez, R. & Takiff, H. Intrinsic resistance of *Mycobacterium smegmatis* to fluoroquinolones may be influenced by new pentapeptide protein MfpA. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**, 3387–3392 (2001).
366. Ruiz, J. Transferable Mechanisms of Quinolone Resistance from 1998 Onward. *Clin. Microbiol. Rev.* **32**, e00007-19 (2019).
367. Tran, J. H. & Jacoby, G. A. Mechanism of plasmid-mediated quinolone resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 5638–5642 (2002).
368. Tran, J. H., Jacoby, G. A. & Hooper, D. C. Interaction of the plasmid-encoded quinolone resistance protein Qnr with *Escherichia coli* DNA gyrase. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**, 118–125 (2005).
369. Ellington, M. J. & Woodford, N. Fluoroquinolone resistance and plasmid addiction systems: self-imposed selection pressure? *J. Antimicrob. Chemother.* **57**, 1026–1029 (2006).
370. Chatterji, M., Sengupta, S. & Nagaraja, V. Chromosomally encoded gyrase inhibitor GyrI protects *Escherichia coli* against DNA-damaging agents. *Arch. Microbiol.* **180**, 339–346 (2003).
371. Chatterji, M. & Nagaraja, V. GyrI: a counter-defensive strategy against proteinaceous inhibitors of DNA gyrase. *EMBO Rep.* **3**, 261–267 (2002).
372. Wang, M., Jacoby, G. A., Mills, D. M. & Hooper, D. C. SOS regulation of *qnrB* expression. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**, 821–823 (2009).
373. Montero, C., Mateu, G., Rodriguez, R. & Takiff, H. Intrinsic resistance of *Mycobacterium smegmatis* to fluoroquinolones may be influenced by new pentapeptide protein MfpA. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**, 3387–3392 (2001).
374. Falco, A., Aranaga, C., Ocampo, I. & Takiff, H. Overexpression of *mfpA* Gene Increases Ciprofloxacin Resistance in *Mycobacterium smegmatis*. *Int. J. Microbiol.* **2021**, 6689186 (2021).
375. Hegde, S. S. *et al.* A fluoroquinolone resistance protein from *Mycobacterium tuberculosis* that mimics DNA. *Science* **308**, 1480–1483 (2005).
376. Mérens, A. *et al.* The Pentapeptide Repeat Proteins MfpAMt and QnrB4 Exhibit Opposite Effects on DNA Gyrase Catalytic Reactions and on the Ternary Gyrase-DNA-Quinolone Complex. *J. Bacteriol.* **191**, 1587–1594 (2009).

377. Tao, J. *et al.* Mycobacterium fluoroquinolone resistance protein B, a novel small GTPase, is involved in the regulation of DNA gyrase and drug resistance. *Nucleic Acids Res.* **41**, 2370–2381 (2013).
378. Eilertson, B. *et al.* High proportion of heteroresistance in *gyrA* and *gyrB* in fluoroquinolone-resistant Mycobacterium tuberculosis clinical isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* **58**, 3270–3275 (2014).
379. Streicher, E. M. *et al.* Mycobacterium tuberculosis population structure determines the outcome of genetics-based second-line drug resistance testing. *Antimicrob. Agents Chemother.* **56**, 2420–2427 (2012).
380. Mokrousov, I. *et al.* Molecular characterization of ofloxacin-resistant Mycobacterium tuberculosis strains from Russia. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**, 2937–2939 (2008).
381. Hillemann, D., Rüscher-Gerdes, S. & Richter, E. Feasibility of the GenoType MTBDRsl assay for fluoroquinolone, amikacin-capreomycin, and ethambutol resistance testing of Mycobacterium tuberculosis strains and clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.* **47**, 1767–1772 (2009).
382. Bernard, C. *et al.* In vivo Mycobacterium tuberculosis fluoroquinolone resistance emergence: a complex phenomenon poorly detected by current diagnostic tests. *J. Antimicrob. Chemother.* **71**, 3465–3472 (2016).
383. Maruri, F. *et al.* Resistance-Conferring Mutations on Whole-Genome Sequencing of Fluoroquinolone-resistant and -Susceptible Mycobacterium tuberculosis Isolates: A Proposed Threshold for Identifying Resistance. *Clin. Infect. Dis.* ciaa496 (2020) doi:10.1093/cid/ciaa496.
384. Pholwat, S., Stroup, S., Foongladda, S. & Houpt, E. Digital PCR to detect and quantify heteroresistance in drug resistant Mycobacterium tuberculosis. *PLoS One* **8**, e57238 (2013).
385. Andries, K. *et al.* A diarylquinoline drug active on the ATP synthase of Mycobacterium tuberculosis. *Science* **307**, 223–227 (2005).
386. Bahuguna, A. & Rawat, D. S. An overview of new antitubercular drugs, drug candidates, and their targets. *Med. Res. Rev.* med.21602 (2019) doi:10.1002/med.21602.
387. Koul, A. *et al.* Diarylquinolines are bactericidal for dormant mycobacteria as a result of disturbed ATP homeostasis. *J. Biol. Chem.* **283**, 25273–25280 (2008).
388. Tran, S. L. & Cook, G. M. The F1Fo-ATP synthase of Mycobacterium smegmatis is essential for growth. *J. Bacteriol.* **187**, 5023–5028 (2005).
389. Haagsma, A. C. *et al.* Probing the interaction of the diarylquinoline TMC207 with its target mycobacterial ATP synthase. *PLoS One* **6**, e23575 (2011).
390. Bald, D., Villellas, C., Lu, P. & Koul, A. Targeting Energy Metabolism in Mycobacterium tuberculosis, a New Paradigm in Antimycobacterial Drug Discovery. *mBio* **8**, e00272-17 (2017).
391. Koul, A. *et al.* Delayed bactericidal response of Mycobacterium tuberculosis to bedaquiline involves remodelling of bacterial metabolism. *Nat. Commun.* **5**, 3369 (2014).
392. Sasseti, C. M., Boyd, D. H. & Rubin, E. J. Genes required for mycobacterial growth defined by high density mutagenesis. *Mol. Microbiol.* **48**, 77–84 (2003).
393. Guo, H., Suzuki, T. & Rubinstein, J. L. Structure of a bacterial atp synthase. *eLife* **8**, (2019).
394. Junge, W., Sielaff, H. & Engelbrecht, S. Torque generation and elastic power transmission in the rotary F₀F₁-ATPase. *Nature* vol. 459 364–370 Preprint at <https://doi.org/10.1038/nature08145> (2009).
395. Koul, A. *et al.* Diarylquinolines target subunit c of mycobacterial ATP synthase. *Nat. Chem. Biol.* **3**, 323–324 (2007).

396. Kundu, S., Biukovic, G., Grüber, G. & Dick, T. Bedaquiline targets the ϵ subunit of mycobacterial F-ATP synthase. *Antimicrob. Agents Chemother.* **60**, 6977–6979 (2016).
397. Segala, E., Sougakoff, W., Nevejans-Chauffour, A., Jarlier, V. & Petrella, S. New mutations in the mycobacterial ATP synthase: New insights into the binding of the diarylquinoline TMC207 to the ATP synthase C-Ring structure. *Antimicrob. Agents Chemother.* **56**, 2326–2334 (2012).
398. Preiss, L. *et al.* Structure of the mycobacterial ATP synthase Fo rotor ring in complex with the anti-TB drug bedaquiline. *Sci. Adv.* **1**, (2015).
399. Guo, H. *et al.* Structure of mycobacterial ATP synthase bound to the tuberculosis drug bedaquiline. *Nature* **589**, 143–147 (2021).
400. Haagsma, A. C. *et al.* Selectivity of TMC207 towards Mycobacterial ATP synthase compared with that towards the eukaryotic homologue. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**, 1290–1292 (2009).
401. Luo, M. *et al.* Bedaquiline inhibits the yeast and human mitochondrial ATP synthases. *Commun. Biol.* **3**, (2020).
402. Lounis, N., Vranckx, L., Gevers, T., Kaniga, K. & Andries, K. In vitro culture conditions affecting minimal inhibitory concentration of bedaquiline against *M. tuberculosis*. *Med. Mal. Infect.* **46**, 220–225 (2016).
403. Kaniga, K. *et al.* Bedaquiline Drug Resistance Emergence Assessment in Multidrug-Resistant Tuberculosis (MDR-TB): a 5-Year Prospective *In Vitro* Surveillance Study of Bedaquiline and Other Second-Line Drug Susceptibility Testing in MDR-TB Isolates. *J. Clin. Microbiol.* **60**, e02919-20 (2022).
404. Williams, K. *et al.* Sterilizing activities of novel combinations lacking first- and second-line drugs in a murine model of tuberculosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **56**, 3114–3120 (2012).
405. Diacon, A. H. *et al.* Randomized pilot trial of eight weeks of bedaquiline (TMC207) treatment for multidrug-resistant tuberculosis: Long-term outcome, tolerability, and effect on emergence of drug resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **56**, 3271–3276 (2012).
406. Veziris, N. *et al.* A once-weekly R207910-containing regimen exceeds activity of the standard daily regimen in murine tuberculosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **179**, 75–79 (2009).
407. Lenaerts, A. J. *et al.* Location of persisting mycobacteria in a guinea pig model of tuberculosis revealed by R207910. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**, 3338–3345 (2007).
408. Rustomjee, R. *et al.* Early bactericidal activity and pharmacokinetics of the diarylquinoline TMC207 in treatment of pulmonary tuberculosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**, 2831–2835 (2008).
409. Tasneen, R. *et al.* Sterilizing activity of novel TMC207- and PA-824-containing regimens in a murine model of tuberculosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **55**, 5485–5492 (2011).
410. Diacon, A. H. *et al.* The diarylquinoline TMC207 for multidrug-resistant tuberculosis. *N. Engl. J. Med.* **360**, 2397–2405 (2009).
411. Pym, A. S. *et al.* Bedaquiline in the treatment of multidrug- and extensively drug-resistant tuberculosis. *Eur. Respir. J.* **47**, 564–574 (2016).
412. Guglielmetti, L. *et al.* Long-term outcome and safety of prolonged bedaquiline treatment for multidrug-resistant tuberculosis. *Eur. Respir. J.* **49**, 1601799 (2017).
413. Tsuyuguchi, K. *et al.* Safety, efficacy, and pharmacokinetics of bedaquiline in Japanese patients with pulmonary multidrug-resistant tuberculosis: An interim analysis of an open-label, phase 2 study. *Respir. Investig.* **57**, 345–353 (2019).
414. Ndjeka, N. *et al.* High treatment success rate for multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis using a bedaquiline-containing treatment regimen. *Eur. Respir. J.* **52**, (2018).

415. Han, X. *et al.* Bedaquiline in the treatment of multidrug- and extensively drug-resistant tuberculosis in China. *Int. J. Tuberc. Lung Dis. Off. J. Int. Union Tuberc. Lung Dis.* **24**, 789–794 (2020).
416. Gao, M. *et al.* Early outcome and safety of bedaquiline-containing regimens for treatment of MDR- and XDR-TB in China: a multicentre study. *Clin. Microbiol. Infect.* (2020) doi:10.1016/j.cmi.2020.06.004.
417. Mbuagbaw, L. *et al.* Outcomes of bedaquiline treatment in patients with multidrug-resistant tuberculosis. *Emerg. Infect. Dis.* **25**, 936–943 (2019).
418. Ahmad, N. *et al.* Treatment correlates of successful outcomes in pulmonary multidrug-resistant tuberculosis: an individual patient data meta-analysis. *The Lancet* **392**, 821–834 (2018).
419. WHO (World Health Organization). *WHO operational handbook on tuberculosis. Module 4: treatment - drug-resistant tuberculosis treatment.* (2020).
420. Conradie, F. *et al.* Bedaquiline-Pretomanid-Linezolid Regimens for Drug-Resistant Tuberculosis. *N. Engl. J. Med.* **387**, 810–823 (2022).
421. Rapid communication: Key changes to the treatment of drug-resistant tuberculosis. <https://www.who.int/publications-detail-redirect/WHO-UCN-TB-2022-2>.
422. Somoskovi, A., Bruderer, V., Hömke, R., Bloemberg, G. V & Böttger, E. C. A mutation associated with clofazimine and bedaquiline cross-resistance in MDR-TB following bedaquiline treatment. *European Respiratory Journal* vol. 45 554–557 Preprint at <https://doi.org/10.1183/09031936.00142914> (2015).
423. Veziris, N. *et al.* Rapid emergence of Mycobacterium tuberculosis bedaquiline resistance: lessons to avoid repeating past errors. *Eur. Respir. J.* **49**, 1601719 (2017).
424. Dorp, L. van *et al.* Detection of a bedaquiline / clofazimine resistance reservoir in Mycobacterium tuberculosis predating the antibiotic era. 2020.10.06.328799 Preprint at <https://doi.org/10.1101/2020.10.06.328799> (2020).
425. Ismail, N. *et al.* Genetic variants and their association with phenotypic resistance to bedaquiline in Mycobacterium tuberculosis: a systematic review and individual isolate data analysis. *Lancet Microbe* **2**, e604–e616 (2021).
426. Hartkoorn, R. C., Uplekar, S. & Cole, S. T. Cross-resistance between clofazimine and bedaquiline through upregulation of mmp15 in mycobacterium tuberculosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **58**, 2979–2981 (2014).
427. Andries, K. *et al.* Acquired resistance of Mycobacterium tuberculosis to bedaquiline. *PLoS ONE* **9**, e102135 (2014).
428. Ismail, N., Peters, R. P. H., Ismail, N. A. & Omar, S. V. Clofazimine exposure in vitro selects efflux pump mutants and bedaquiline resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **63**, (2019).
429. Karmakar, M. *et al.* Empirical ways to identify novel Bedaquiline resistance mutations in AtpE. *PLOS ONE* **14**, e0217169 (2019).
430. Ismail, N., Omar, S. V., Ismail, N. A. & Peters, R. P. H. Collated data of mutation frequencies and associated genetic variants of bedaquiline, clofazimine and linezolid resistance in Mycobacterium tuberculosis. *Data Brief* **20**, 1975–1983 (2018).
431. Guo, Q. *et al.* Whole Genome Sequencing Identifies Novel Mutations Associated With Bedaquiline Resistance in Mycobacterium tuberculosis. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **12**, 807095 (2022).
432. Radhakrishnan, A. *et al.* Crystal structure of the transcriptional regulator Rv0678 of Mycobacterium tuberculosis. *J. Biol. Chem.* **289**, 16526–16540 (2014).

433. Sandhu, P. & Akhter, Y. Siderophore transport by MmpL5-MmpS5 protein complex in *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Inorg. Biochem.* **170**, 75–84 (2017).
434. Mallick, J. S., Nair, P., Abbew, E. T., Van Deun, A. & Decroo, T. Acquired bedaquiline resistance during the treatment of drug-resistant tuberculosis: a systematic review. *JAC-Antimicrob. Resist.* **4**, dlac029 (2022).
435. Nimmo, C. *et al.* Population-level emergence of bedaquiline and clofazimine resistance-associated variants among patients with drug-resistant tuberculosis in southern Africa: a phenotypic and phylogenetic analysis. *Lancet Microbe* **1**, e165–e174 (2020).
436. Wu, S.-H., Chan, H.-H., Hsiao, H.-C. & Jou, R. Primary Bedaquiline Resistance Among Cases of Drug-Resistant Tuberculosis in Taiwan. *Front. Microbiol.* **12**, 754249 (2021).
437. Almeida, D. *et al.* Mutations in pepQ confer low-level resistance to bedaquiline and clofazimine in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **60**, 4590–4599 (2016).
438. Beckert, P. *et al.* MDR M. tuberculosis outbreak clone in Eswatini missed by Xpert has elevated bedaquiline resistance dated to the pre-treatment era. *Genome Med.* **12**, 104 (2020).
439. Vargas, R. *et al.* Role of Epistasis in Amikacin, Kanamycin, Bedaquiline, and Clofazimine Resistance in *Mycobacterium tuberculosis* Complex. *Antimicrob. Agents Chemother.* **65**, e0116421 (2021).
440. Le Ray, L. F. *et al.* atpE Mutation in *Mycobacterium tuberculosis* Not Always Predictive of Bedaquiline Treatment Failure. *Emerg. Infect. Dis.* **28**, 1062–1064 (2022).
441. N, I., Na, I., Sv, O. & Rph, P. In Vitro Study of Stepwise Acquisition of rv0678 and atpE Mutations Conferring Bedaquiline Resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **63**, (2019).
442. World Health Organization. WHO consolidated guidelines on drug-resistant tuberculosis treatment. *Geneva Switz.* (2019).
443. Aung, K. J. M. *et al.* Successful ‘9-month Bangladesh regimen’ for multidrug-resistant tuberculosis among over 500 consecutive patients. *Int. J. Tuberc. Lung Dis. Off. J. Int. Union Tuberc. Lung Dis.* **18**, 1180–1187 (2014).
444. Conradie, F. *et al.* Treatment of Highly Drug-Resistant Pulmonary Tuberculosis. *N. Engl. J. Med.* (2020) doi:10.1056/NEJMoa1901814.
445. Chandra, P., Grigsby, S. J. & Philips, J. A. Immune evasion and provocation by *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat. Rev. Microbiol.* **20**, 750–766 (2022).
446. Palmer, T., Finney, A. J., Saha, C. K., Atkinson, G. C. & Sargent, F. A holin/peptidoglycan hydrolase-dependent protein secretion system. *Mol. Microbiol.* **115**, 345–355 (2021).
447. Cole, S. T. *et al.* Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* **393**, 537–544 (1998).
448. Vaziri, F. & Brosch, R. ESX/Type VII Secretion Systems-An Important Way Out for Mycobacterial Proteins. *Microbiol. Spectr.* **7**, (2019).
449. Dumas, E. *et al.* Mycobacterial Pan-Genome Analysis Suggests Important Role of Plasmids in the Radiation of Type VII Secretion Systems. *Genome Biol. Evol.* **8**, 387–402 (2016).
450. Gröschel, M. I., Sayes, F., Simeone, R., Majlessi, L. & Brosch, R. ESX secretion systems: mycobacterial evolution to counter host immunity. *Nat. Rev. Microbiol.* **14**, 677–691 (2016).
451. Bottai, D., Gröschel, M. I. & Brosch, R. Type VII Secretion Systems in Gram-Positive Bacteria. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **404**, 235–265 (2017).
452. Gröschel, M. I., Sayes, F., Simeone, R., Majlessi, L. & Brosch, R. ESX secretion systems: mycobacterial evolution to counter host immunity. *Nat. Rev. Microbiol.* **14**, 677–691 (2016).

453. Ohol, Y. M. *et al.* Mycobacterium tuberculosis MycP1 protease plays a dual role in regulation of ESX-1 secretion and virulence. *Cell Host Microbe* **7**, 210–220 (2010).
454. Chen, J. M. *et al.* Mycobacterium tuberculosis EspB binds phospholipids and mediates EsxA-independent virulence. *Mol. Microbiol.* **89**, 1154–1166 (2013).
455. Ates, L. S. & Brosch, R. Discovery of the type VII ESX-1 secretion needle? *Mol. Microbiol.* **103**, 7–12 (2017).
456. Tiwari, S., Casey, R., Goulding, C. W., Hingley-Wilson, S. & Jacobs, W. R. Infect and Inject: How Mycobacterium tuberculosis Exploits Its Major Virulence-Associated Type VII Secretion System, ESX-1. *Microbiol. Spectr.* **7**, (2019).
457. Solans, L. *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.* **82**, 3446–3456 (2014).
458. Blasco, B. *et al.* Virulence regulator EspR of Mycobacterium tuberculosis is a nucleoid-associated protein. *PLoS Pathog.* **8**, e1002621 (2012).
459. Berthet, F.-X., Rasmussen, P. B., Rosenkrands, I., Andersen, P. & Gicquel, B. A Mycobacterium tuberculosis operon encoding ESAT=6 and a novel low-molecular-mass culture filtrate protein (CFP-10). *Microbiology* **144**, 3195–3203 (1998).
460. Pym, A. S., Brodin, P., Brosch, R., Huerre, M. & Cole, S. T. Loss of RD1 contributed to the attenuation of the live tuberculosis vaccines Mycobacterium bovis BCG and Mycobacterium microti. *Mol. Microbiol.* **46**, 709–717 (2002).
461. Hsu, T. *et al.* The primary mechanism of attenuation of bacillus Calmette–Guérin is a loss of secreted lytic function required for invasion of lung interstitial tissue. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100**, 12420–12425 (2003).
462. Osman, M. M. *et al.* The C terminus of the mycobacterium ESX-1 secretion system substrate ESAT-6 is required for phagosomal membrane damage and virulence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **119**, e2122161119 (2022).
463. Stoop, E. J. M. *et al.* Zebrafish embryo screen for mycobacterial genes involved in the initiation of granuloma formation reveals a newly identified ESX-1 component. *Dis. Model. Mech.* **4**, 526–536 (2011).
464. Volkman, H. E. *et al.* Tuberculous granuloma induction via interaction of a bacterial secreted protein with host epithelium. *Science* **327**, 466–469 (2010).
465. Rivera-Calzada, A., Famelis, N., Llorca, O. & Geibel, S. Type VII secretion systems: structure, functions and transport models. *Nat. Rev. Microbiol.* **19**, 567–584 (2021).
466. Siegrist, M. S. *et al.* Mycobacterial Esx-3 is required for mycobactin-mediated iron acquisition. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 18792–18797 (2009).
467. Tufariello, J. M. *et al.* Separable roles for Mycobacterium tuberculosis ESX-3 effectors in iron acquisition and virulence. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **113**, (2016).
468. Abdallah, A. M. *et al.* PPE and PE_PGRS proteins of Mycobacterium marinum are transported via the type VII secretion system ESX-5. *Mol. Microbiol.* **73**, 329–340 (2009).
469. Beckham, K. S. H. *et al.* Structure of the mycobacterial ESX-5 type VII secretion system membrane complex by single-particle analysis. *Nat. Microbiol.* **2**, 1–7 (2017).
470. Bottai, D. *et al.* Disruption of the ESX-5 system of Mycobacterium tuberculosis causes loss of PPE protein secretion, reduction of cell wall integrity and strong attenuation. *Mol. Microbiol.* **83**, 1195–1209 (2012).

471. Ghazaei, C. Mycobacterium tuberculosis and lipids: Insights into molecular mechanisms from persistence to virulence. *J. Res. Med. Sci. Off. J. Isfahan Univ. Med. Sci.* **23**, 63 (2018).
472. Ostrop, J. *et al.* Contribution of MINCLE-SYK Signaling to Activation of Primary Human APCs by Mycobacterial Cord Factor and the Novel Adjuvant TDB. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **195**, 2417–2428 (2015).
473. Passemar, C. *et al.* Multiple deletions in the polyketide synthase gene repertoire of Mycobacterium tuberculosis reveal functional overlap of cell envelope lipids in host-pathogen interactions. *Cell. Microbiol.* **16**, 195–213 (2014).
474. Fratti, R. A., Chua, J. & Deretic, V. Induction of p38 mitogen-activated protein kinase reduces early endosome autoantigen 1 (EEA1) recruitment to phagosomal membranes. *J. Biol. Chem.* **278**, 46961–46967 (2003).
475. Rens, C., Chao, J. D., Sexton, D. L., Tocheva, E. I. & Av-Gay, Y. Roles for phthiocerol dimycocerosate lipids in Mycobacterium tuberculosis pathogenesis. *Microbiol. Read. Engl.* **167**, (2021).
476. Indrigo, J., Hunter, R. L. & Actor, J. K. Influence of trehalose 6,6'-dimycolate (TDM) during mycobacterial infection of bone marrow macrophages. *Microbiol. Read. Engl.* **148**, 1991–1998 (2002).
477. Robinson, N. *et al.* Mycobacterial phenolic glycolipid inhibits phagosome maturation and subverts the pro-inflammatory cytokine response. *Traffic Cph. Den.* **9**, 1936–1947 (2008).
478. Ates, L. S. New insights into the mycobacterial PE and PPE proteins provide a framework for future research. *Mol. Microbiol.* **113**, 4–21 (2020).
479. Ates, L. S. *et al.* Mutations in ppe38 block PE_PGRS secretion and increase virulence of Mycobacterium tuberculosis. *Nat. Microbiol.* **3**, 181–188 (2018).
480. Phan, T. H., Ummels, R., Bitter, W. & Houben, E. N. G. Identification of a substrate domain that determines system specificity in mycobacterial type VII secretion systems. *Sci. Rep.* **7**, 42704 (2017).
481. Gey van Pittius, N. C. *et al.* Evolution and expansion of the Mycobacterium tuberculosis PE and PPE multigene families and their association with the duplication of the ESAT-6 (esx) gene cluster regions. *BMC Evol. Biol.* **6**, 95 (2006).
482. Wang, Q. *et al.* PE/PPE proteins mediate nutrient transport across the outer membrane of Mycobacterium tuberculosis. *Science* **367**, 1147–1151 (2020).
483. Saini, N. K. *et al.* Suppression of autophagy and antigen presentation by Mycobacterium tuberculosis PE_PGRS47. *Nat. Microbiol.* **1**, 16133 (2016).
484. Abdallah, A. M. *et al.* The ESX-5 Secretion System of *Mycobacterium marinum* Modulates the Macrophage Response. *J. Immunol.* **181**, 7166–7175 (2008).
485. Delogu, G., Brennan, M. J. & Manganeli, R. PE and PPE Genes: A Tale of Conservation and Diversity. *Adv. Exp. Med. Biol.* **1019**, 191–207 (2017).
486. De Maio, F., Berisio, R., Manganeli, R. & Delogu, G. PE_PGRS proteins of Mycobacterium tuberculosis: A specialized molecular task force at the forefront of host-pathogen interaction. *Virulence* **11**, 898–915 (2020).
487. De Maio, F. *et al.* PE_PGRS3 of Mycobacterium tuberculosis is specifically expressed at low phosphate concentration, and its arginine-rich C-terminal domain mediates adhesion and persistence in host tissues when expressed in Mycobacterium smegmatis. *Cell. Microbiol.* **20**, e12952 (2018).

488. Grover, S. *et al.* The PGRS Domain of Mycobacterium tuberculosis PE_PGRS Protein Rv0297 Is Involved in Endoplasmic Reticulum Stress-Mediated Apoptosis through Toll-Like Receptor 4. *mBio* **9**, e01017-18 (2018).
489. Chaturvedi, R. *et al.* The multifunctional PE_PGRS11 protein from Mycobacterium tuberculosis plays a role in regulating resistance to oxidative stress. *J. Biol. Chem.* **285**, 30389–30403 (2010).
490. Chen, T., Zhao, Q., Li, W. & Xie, J. Mycobacterium tuberculosis PE_PGRS17 promotes the death of host cell and cytokines secretion via Erk kinase accompanying with enhanced survival of recombinant Mycobacterium smegmatis. *J. Interferon Cytokine Res. Off. J. Int. Soc. Interferon Cytokine Res.* **33**, 452–458 (2013).
491. Yang, W. *et al.* Mycobacterium tuberculosis PE_PGRS18 enhances the intracellular survival of M. smegmatis via altering host macrophage cytokine profiling and attenuating the cell apoptosis. *Apoptosis Int. J. Program. Cell Death* **22**, 502–509 (2017).
492. Chai, Q. *et al.* A Mycobacterium tuberculosis surface protein recruits ubiquitin to trigger host xenophagy. *Nat. Commun.* **10**, 1973 (2019).
493. Iantomasi, R. *et al.* PE_PGRS30 is required for the full virulence of Mycobacterium tuberculosis. *Cell. Microbiol.* **14**, 356–367 (2012).
494. Camassa, S. *et al.* Impact of pe_pgrs33 Gene Polymorphisms on Mycobacterium tuberculosis Infection and Pathogenesis. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **7**, 137 (2017).
495. Basu, S. *et al.* Execution of macrophage apoptosis by PE_PGRS33 of Mycobacterium tuberculosis is mediated by Toll-like receptor 2-dependent release of tumor necrosis factor- α . *J. Biol. Chem.* **282**, 1039–1050 (2007).
496. Palucci, I. *et al.* PE_PGRS33 Contributes to Mycobacterium tuberculosis Entry in Macrophages through Interaction with TLR2. *PLoS ONE* **11**, e0150800 (2016).
497. Dheenadhayalan, V., Delogu, G. & Brennan, M. J. Expression of the PE_PGRS 33 protein in Mycobacterium smegmatis triggers necrosis in macrophages and enhanced mycobacterial survival. *Microbes Infect.* **8**, 262–272 (2006).
498. Deng, W. *et al.* Mycobacterium tuberculosis PE_PGRS41 Enhances the Intracellular Survival of M. smegmatis within Macrophages Via Blocking Innate Immunity and Inhibition of Host Defense. *Sci. Rep.* **7**, 46716 (2017).
499. Tullius, M. V., Nava, S. & Horwitz, M. A. PPE37 Is Essential for Mycobacterium tuberculosis Heme-Iron Acquisition (HIA), and a Defective PPE37 in Mycobacterium bovis BCG Prevents HIA. *Infect. Immun.* **87**, e00540-18 (2019).
500. Mitra, A., Speer, A., Lin, K., Ehrh, S. & Niederweis, M. PPE Surface Proteins Are Required for Heme Utilization by Mycobacterium tuberculosis. *mBio* **8**, e01720-16 (2017).
501. Ramakrishnan, P., Aagesen, A. M., McKinney, J. D. & Tischler, A. D. Mycobacterium tuberculosis Resists Stress by Regulating PE19 Expression. *Infect. Immun.* **84**, 735–746 (2015).
502. Merker, M. *et al.* Evolutionary history and global spread of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing lineage. *Nat. Genet.* **47**, 242–249 (2015).
503. Liu, H. *et al.* Associations between Mycobacterium tuberculosis Beijing genotype and drug resistance to four first-line drugs: a survey in China. *Front. Med.* **12**, 92–97 (2018).
504. Brossier, F. *et al.* Characterization of a Clone of Mycobacterium tuberculosis Clinical Isolates with Mutations in KatG (A110V), EthA (Q269STOP), and the inhA Promoter (-15C→T). *J. Clin. Microbiol.* **53**, 3104 (2015).
505. Torres Ortiz, A. *et al.* Genomic signatures of pre-resistance in Mycobacterium tuberculosis. *Nat. Commun.* **12**, 7312 (2021).

506. Kapopoulou, A., Lew, J. M. & Cole, S. T. The MycoBrowser portal: a comprehensive and manually annotated resource for mycobacterial genomes. *Tuberc. Edinb. Scotl.* **91**, 8–13 (2011).
507. Shastri, M. D. *et al.* Role of Oxidative Stress in the Pathology and Management of Human Tuberculosis. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2018**, 7695364 (2018).
508. Role of KatG catalase-peroxidase in mycobacterial pathogenesis: countering the phagocyte oxidative burst. - PubMed - NCBI. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Role+of+KatG+catalase-peroxidase+in+mycobacterial+pathogenesis%3A+countering+the+phagocyte+oxidative+burst>.
509. Brossier, F., Boudinet, M., Jarlier, V., Petrella, S. & Sougakoff, W. Comparative study of enzymatic activities of new KatG mutants from low- and high-level isoniazid-resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberc. Edinb. Scotl.* **100**, 15–24 (2016).
510. Chen, L. *et al.* VFDB: a reference database for bacterial virulence factors. *Nucleic Acids Res.* **33**, D325–328 (2005).
511. Lim, Z. L., Drever, K., Dhar, N., Cole, S. T. & Chen, J. M. *Mycobacterium tuberculosis* EspK Has Active but Distinct Roles in the Secretion of EsxA and EspB. *J. Bacteriol.* **204**, e0006022 (2022).
512. Brodin, P. *et al.* Dissection of ESAT-6 System 1 of *Mycobacterium tuberculosis* and Impact on Immunogenicity and Virulence. *Infect. Immun.* **74**, 88–98 (2006).
513. Inwald, J., Jahans, K., Hewinson, R. G. & Gordon, S. V. Inactivation of the *Mycobacterium bovis* homologue of the polymorphic RD1 gene Rv3879c (Mb3909c) does not affect virulence. *Tuberc. Edinb. Scotl.* **83**, 387–393 (2003).
514. Drever, K., Lim, Z. L., Zriba, S. & Chen, J. M. Protein Synthesis and Degradation Inhibitors Potently Block *Mycobacterium tuberculosis* type-7 Secretion System ESX-1 Activity. *ACS Infect. Dis.* **7**, 273–280 (2021).
515. Champion, M. M., Williams, E. A., Pinapati, R. S. & Champion, P. A. D. Correlation of Phenotypic Profiles Using Targeted Proteomics Identifies Mycobacterial Esx-1 Substrates. *J. Proteome Res.* **13**, 5151–5164 (2014).
516. Newton-Foot, M. & Gey van Pittius, N. C. The complex architecture of mycobacterial promoters. *Tuberc. Edinb. Scotl.* **93**, 60–74 (2013).
517. Di Salvo, M. *et al.* G4PromFinder: an algorithm for predicting transcription promoters in GC-rich bacterial genomes based on AT-rich elements and G-quadruplex motifs. *BMC Bioinformatics* **19**, 36 (2018).
518. Roberts, E. A., Clark, A., McBeth, S. & Friedman, R. L. Molecular characterization of the *eis* promoter of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Bacteriol.* **186**, 5410–5417 (2004).
519. Rausch, T. *et al.* DELLY: structural variant discovery by integrated paired-end and split-read analysis. *Bioinformatics* **28**, i333–i339 (2012).
520. Brosch, R. *et al.* Genome plasticity of BCG and impact on vaccine efficacy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 5596–5601 (2007).
521. Content, J. *et al.* Disruption of *adhC* reveals a large duplication in the *Mycobacterium smegmatis* mc2155 genome. *Microbiology* **147**, 3281–3294 (2001).
522. Domenech, P. *et al.* Origins of a 350-Kilobase Genomic Duplication in *Mycobacterium tuberculosis* and Its Impact on Virulence. *Infect. Immun.* **82**, 2902–2912 (2014).
523. Domenech, P., Kolly, G. S., Leon-Solis, L., Fallow, A. & Reed, M. B. Massive gene duplication event among clinical isolates of the *Mycobacterium tuberculosis* W/Beijing family. *J. Bacteriol.* **192**, 4562–4570 (2010).

524. Weiner, B. *et al.* Independent large-scale duplications in multiple *M. tuberculosis* lineages overlapping the same genomic region. *PLoS One* **7**, e26038 (2012).
525. Wang, L. *et al.* Multiple genetic paths including massive gene amplification allow *Mycobacterium tuberculosis* to overcome loss of ESX-3 secretion system substrates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **119**, e2112608119 (2022).
526. Zondervan, N. A., van Dam, J. C. J., Schaap, P. J., Martins dos Santos, V. A. P. & Suarez-Diez, M. Regulation of Three Virulence Strategies of *Mycobacterium tuberculosis*: A Success Story. *Int. J. Mol. Sci.* **19**, (2018).
527. Boshoff, H. I. M., Reed, M. B., Barry, C. E. & Mizrahi, V. DnaE2 polymerase contributes to in vivo survival and the emergence of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Cell* **113**, 183–193 (2003).
528. O’Sullivan, D. M., Hinds, J., Butcher, P. D., Gillespie, S. H. & McHugh, T. D. *Mycobacterium tuberculosis* DNA repair in response to subinhibitory concentrations of ciprofloxacin. *J. Antimicrob. Chemother.* **62**, 1199–1202 (2008).
529. Gillespie, S. H., Basu, S., Dickens, A. L., O’Sullivan, D. M. & McHugh, T. D. Effect of subinhibitory concentrations of ciprofloxacin on *Mycobacterium fortuitum* mutation rates. *J. Antimicrob. Chemother.* **56**, 344–348 (2005).
530. Nicoloff, H., Hjort, K., Levin, B. R. & Andersson, D. I. The high prevalence of antibiotic heteroresistance in pathogenic bacteria is mainly caused by gene amplification. *Nat. Microbiol.* **4**, 504–514 (2019).
531. Hjort, K., Nicoloff, H. & Andersson, D. I. Unstable tandem gene amplification generates heteroresistance (variation in resistance within a population) to colistin in *Salmonella enterica*. *Mol. Microbiol.* **102**, 274–289 (2016).
532. Feng, L. *et al.* The pentapeptide-repeat protein, MfpA, interacts with mycobacterial DNA gyrase as a DNA T-segment mimic. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **118**, e2016705118 (2021).
533. Huang, Y. *et al.* *Mycobacterium* Fluoroquinolone Resistance Protein D (MfpD), a GTPase-Activating Protein of GTPase MfpB, Is Involved in Fluoroquinolones Potency. *Microbiol. Spectr.* e0209822 (2022) doi:10.1128/spectrum.02098-22.
534. Danelishvili, L., Everman, J. L., McNamara, M. J. & Bermudez, L. E. Inhibition of the Plasma-Membrane-Associated Serine Protease Cathepsin G by *Mycobacterium tuberculosis* Rv3364c Suppresses Caspase-1 and Pyroptosis in Macrophages. *Front. Microbiol.* **2**, 281 (2011).
535. Rastogi, S. & Briken, V. Interaction of *Mycobacteria* With Host Cell Inflammasomes. *Front. Immunol.* **13**, 791136 (2022).
536. Shitikov, E. A. *et al.* Unusual Large-Scale Chromosomal Rearrangements in *Mycobacterium tuberculosis* Beijing B0/W148 Cluster Isolates. *PLoS ONE* **9**, e84971 (2014).
537. Merker, M. *et al.* Transcontinental spread and evolution of *Mycobacterium tuberculosis* W148 European/Russian clade toward extensively drug resistant tuberculosis. *Nat. Commun.* **13**, 5105 (2022).
538. Sardesai, A. A. & Gowrishankar, J. trans-Acting Mutations in Loci Other than kdpDE That Affect kdp Operon Regulation in *Escherichia coli*: Effects of Cytoplasmic Thiol Oxidation Status and Nucleoid Protein H-NS on kdp Expression. *J. Bacteriol.* **183**, 86–93 (2001).
539. Parish, T. *et al.* Deletion of Two-Component Regulatory Systems Increases the Virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun.* **71**, 1134–1140 (2003).
540. Colangeli, R. *et al.* Whole genome sequencing of *Mycobacterium tuberculosis* reveals slow growth and low mutation rates during latent infections in humans. *PLoS One* **9**, e91024 (2014).

541. Ford, C. B. *et al.* Mycobacterium tuberculosis mutation rate estimates from different lineages predict substantial differences in the emergence of drug-resistant tuberculosis. *Nat. Genet.* **45**, 784–790 (2013).
542. Hjort, K. *et al.* Dynamics of extensive drug resistance evolution of Mycobacterium tuberculosis in a single patient during 9 years of disease and treatment. *J. Infect. Dis.* jiaa625 (2020) doi:10.1093/infdis/jiaa625.
543. Yar, A. M. *et al.* Comparative Genome Analysis of 2 Mycobacterium Tuberculosis Strains from Pakistan: Insights Globally Into Drug Resistance, Virulence, and Niche Adaptation. *Evol. Bioinforma. Online* **14**, 1176934318790252 (2018).
544. Canetti, G. *et al.* Advances in techniques of testing mycobacterial drug sensitivity, and the use of sensitivity tests in tuberculosis control programmes. *Bull. World Health Organ.* **41**, 21–43 (1969).

ABSTRACT

Background: Tuberculosis (TB) remains one of the leading causes of death worldwide. The spread of multidrug-resistant (MDR) strains is alarming. Second-line drugs classified in WHO group A (fluoroquinolones (FQ), bedaquiline (BDQ) and linezolid) are the key drugs. Unfortunately, recent years have seen the emergence of extensively drug-resistant (XDR) strains that are MDR and resistant to FQ and one of the other group A drugs. Controlling the emergence and spread of these resistant forms relies on: (i) early and effective treatment of patients; it is thus essential to diagnose resistance to anti-tuberculosis drugs (anti-TB) as well as possible, by optimizing molecular diagnosis and (ii) understanding the mechanisms of dissemination of MDR strains. This work responds to these challenges by a genomic approach, with the following **objectives**: to improve the diagnosis of FQ resistance (**axis 1**), and to investigate the molecular mechanisms of dissemination of a particular cluster of MDR strains (**axis 2**). Beyond the experimental work necessary to achieve these objectives, works and publications related to the context of the subject and allowing me to understand my thesis project have been realized. These publications cited in the bibliographic part of this thesis manuscript (articles 1 to 6), will not be detailed here.

Axis 1: we investigated the molecular mechanisms of resistance to FQ not related to mutations in the DNA gyrase. We analyzed the genomes of nearly 1500 FQ-resistant *M. tuberculosis* (*Mtb*) strains without DNA gyrase mutations, both clinical strains (database of the CNR des Mycobactéries and CRyPTIC consortium) and strains selected *in vivo* (TB mouse model). The genomic analysis revealed: (i) the putative role of the *mfpAE* operon, and (ii) a novel mechanism in *Mtb*, namely the presence of massive genomic duplications containing this operon. These *in silico* hypotheses were then explored by an experimental approach. **Axis 2:** Among the strains collected at the CNR over the last 20 years, an MDR cluster of lineage 4 was distinguished by a specific combination of resistance mutations: KatG-A110V and EthA-Q269*; strains with few gap mutations (< 8), although isolated over a period of 20 years, testifying to a low evolutionary speed. We explored the molecular characteristics of this cluster, particularly in terms of virulence to explain this persistence. Genomic analysis revealed a specific mutation in ESX-1, a key element of virulence in *Mtb*, upstream of *espK*. To explore the hypothesis of the localization of this mutation within the *espK* promoter, we performed (i) an *in-silico* promoter prediction study and (ii) qPCR experiments to assess the impact of this mutation on the transcription of *espK*, but also of *esxA*, which encodes the virulence factor ESAT-6. We showed that there would be an inverse correlation between the level of transcription of *espK* and *esxA*.

Conclusion: this work has allowed (i) to improve the knowledge on FQ resistance, and (ii) to better understand the molecular basis of the persistence of an MDR cluster linked to ESX-1. In the continuity of this work, I will continue the study of the molecular mechanisms involved in the resistance to the new antituberculosis drugs (bedaquiline, delamanid and pretomanid).

RESUME

Contexte : La tuberculose (TB) demeure une des premières causes de décès à l'échelle mondiale. La dissémination de souches multirésistantes (MDR) est alarmante. Les molécules de 2^{nde} ligne classées dans le groupe A de l'OMS (fluoroquinolones (FQ), bédaquiline (BDQ) et linézolide), sont les molécules clé du traitement. Malheureusement, on assiste ces dernières années à l'émergence de souches ultrarésistantes (XDR) qui sont MDR et résistantes aux FQ et à l'une des autres molécules du groupe A. La lutte contre l'émergence et la dissémination de ces formes résistantes repose sur : (i) le traitement précoce et efficace des patients ; il est ainsi indispensable de diagnostiquer au mieux la résistance aux antituberculeux (antiTB), en optimisant le diagnostic moléculaire et (ii) la compréhension des mécanismes de dissémination des souches MDR. Ce travail répond à ces enjeux avec une approche génomique, par les **objectifs** suivants : améliorer le diagnostic de la résistance aux FQ (**axe 1**), et investiguer les mécanismes moléculaires de dissémination d'un cluster particulier de souches MDR (**axe 2**). Au-delà du travail expérimental nécessaire pour mener à bien ces objectifs, des travaux et publications en lien avec le contexte du sujet et me permettant de bien appréhender mon projet de thèse ont été réalisés. Ces travaux cités dans la partie bibliographique de ce manuscrit de thèse (articles 1 à 6), ne seront pas détaillés ici.

Axe 1 : nous avons investigué les mécanismes moléculaires de résistance aux FQ non liés aux mutations dans l'ADN gyrase. Nous avons analysé les génomes de près de 1500 souches de *M. tuberculosis* (*Mtb*) résistantes aux FQ sans mutation dans l'ADN gyrase, à la fois de souches cliniques (database du CNR des Mycobactéries et consortium CRYPTIC) et de souches sélectionnées *in vivo* (modèle murin de TB). L'analyse génomique a mis en évidence : (i) le rôle putatif de l'opéron *mfpAE*, et (ii) un mécanisme inédit chez *Mtb*, à savoir la présence de duplications génomiques massives contenant cet opéron. Ces hypothèses *in silico* ont ensuite été explorées par une approche expérimentale. **Axe 2** : Parmi les souches collectées au CNR ces 20 dernières années, un cluster MDR de la lignée 4 se distinguait par une combinaison spécifique de mutations de résistance : KatG-A110V et EthA-Q269* ; les souches ayant peu de mutations d'écart (< 8), bien qu'isolées sur une période de 20 ans, témoignant d'une faible vitesse d'évolution. Nous avons exploré les caractéristiques moléculaires de ce cluster, notamment sur le plan de la virulence pour expliquer cette persistance. L'analyse génomique a mis en évidence une mutation spécifique au niveau d'ESX-1, élément clé de la virulence chez *Mtb*, en amont d'*espK*. Afin d'explorer l'hypothèse de la localisation de cette mutation au sein du promoteur d'*espK*, nous avons réalisé (i) une étude de prédiction du promoteur *in silico* et (ii) des expériences de qPCR pour évaluer l'impact de cette mutation sur la transcription d'*espK*, mais aussi d'*esxA*, qui code le facteur de virulence ESAT-6. Nous avons montré qu'il y aurait une corrélation inverse entre le niveau de transcription d'*espK* et d'*esxA*.

Conclusion : ce travail de Thèse a ainsi permis (i) d'améliorer les connaissances sur la résistance aux FQ, et (ii) de mieux comprendre les bases moléculaires de la persistance d'un cluster MDR liée à ESX-1. Dans la continuité de ces travaux, je poursuivrai l'étude des mécanismes moléculaires impliqués dans la résistance aux nouveaux antituberculeux (bédaquiline, délamanide et prêtomanide).