Université de Lille
Ecole Graduée Biologie-Santé de Lille

Thèse

Pour l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LILLE

Spécialité : Sciences de la vie et de la santé

Discipline : Microbiologie

Présentée et soutenue publiquement par

Oriane RIVIÈRE

Le 19 décembre 2025

Modèle de bacilles tuberculeux différentiellement cultivables (DCTB) : étude de leur réveil par approches génétiques et criblage de composés

Devant le jury composé de :

Dr. Giulia MANINA *Directrice de recherche Institut Pasteur, Paris*	Présidente du jury / Examinatrice
Dr. Hedia MARRAKCHI *Directrice de recherche CNRS, Toulouse*	Rapporteure
Dr. René WINTJENS *Chargé de recherche Université Libre de Bruxelles, Bruxelles*	Rapporteur
Dr. Christophe GUILHOT *Directeur de recherche CNRS, Toulouse*	Examinateur
Dr. Alain BAULARD *Directeur de recherche INSERM, Lille*	Directeur de thèse
Dr. Kamel DJAOUT *Ingénieur de recherche INSERM, Lille*	Co-encadrant de thèse

Centre d'Infection et d'Immunité de Lille, Institut Pasteur de Lille,
INSERM U1019, CNRS UMR 9017, Université de Lille
Equipe Recherche sur les Mycobactéries et les Bordetelles

Cette thèse a été financée par l'Agence nationale de la recherche (ANR) française dans le cadre du Programme d'investissement d'avenir (Mustart ANR-20-PAMR-0005).



REMERCIEMENTS

Pour commencer, je voudrais remercier les membres de mon jury de thèse, les Docteurs Hedia Marrakchi, René Wintjens, Christophe Guilhot et Giulia Manina, d'avoir accepté d'en faire partie, et par conséquent, de consacrer du temps à l'évaluation et la discussion de mes travaux de thèse.

Je remercie également les membres de mon comité de suivi de thèse, le Dr. Christophe Guilhot et la Dr. Marion Flipo, avec qui j'ai eu, à trois reprises, l'occasion de partager l'avancée de ma thèse. Votre intérêt constant pour mon travail, vos remarques constructives et vos précieux conseils m'ont, à chaque fois, permis d'appréhender l'année avec une énergie renouvelée et de nouvelles perspectives.

Mes remerciements s'adressent ensuite à mes co-directeurs de thèse, Alain Baulard et Kamel Djaout, qui m'ont offert l'opportunité de réaliser cette thèse. Alain, je te remercie de m'avoir fait bénéficier de ton expérience et pour les nombreux conseils que tu m'as donnés tout au long de cette thèse, qui m'ont fait grandir scientifiquement. Merci également pour la liberté que tu m'as accordée sur ce projet, me permettant de tester mes propres idées, d'explorer différents aspects de la biologie et de développer ma réflexion scientifique. Kamel, tu as été à l'origine de ce projet et tu l'as fait vivre grâce à ton enthousiasme et tes nombreuses idées. Merci de m'avoir accompagnée dans mes premières manips, formée à de nombreuses techniques et transmis ton savoir-faire.

Je remercie tout particulièrement mes collègues du projet Mustart, Zainab et Camille. Zainab, tu as toujours été présente et disponible, que ce soit pour les questions scientifiques, ou pour les moments plus personnels. Ta façon d'être m'inspire, tu parviens à jongler entre tant de projets et à enchaîner de longues journées sans jamais laisser paraitre la moindre difficulté. Tu es une très belle personne, et je suis heureuse d'avoir eu la chance de te côtoyer, au laboratoire comme en dehors. Qui sait, nous nous croiserons peut-être à vélo sur les bords de Loire... Camille, tu es une scientifique brillante, et j'ai adoré nos discussions, parfois très sérieuses, parfois un peu moins. Ton enthousiasme est communicatif, et nos échanges m'ont permis de solutionner plusieurs difficultés. J'ai particulièrement apprécié notre collaboration sur la purification du ligand : de la conception du protocole (atelier bricolage), aux deux journées d'expériences, ce travail partagé a véritablement stimulé mon esprit scientifique. Merci également pour les moments en dehors du labo, à faire les fermetures des restaurants car l'on n'a pas vu le

temps passer. Je te félicite encore pour l'obtention de ton financement, et j'espère que ce projet sera couronné de succès.

Un grand merci à tous les membres de l'équipe RMB pour m'avoir accueillie. Ces années passées à vos côtés ont été enrichies par votre aide, vos conseils et la convivialité du labo au quotidien.

Je voudrais particulièrement remercier Cyril, Romain et Philip pour les discussions enrichissantes et les questions toujours pertinentes autour du projet. Merci également à Jonathan, pour avoir égayé de longues sessions passées au P3 et sauvé mon ficus.

Je pense également à tous les étudiants en thèse et en master, pour la plupart déjà partis, qui ont contribué à rendre mon quotidien au laboratoire plus joyeux : Fethi, Dacine, Majda, Ghida, Daniela et Camille A. Vous êtes des personnes pétillantes et avez su apporter une belle énergie, beaucoup de vie et d'éclats de rire dans cette dent 2. J'ai eu la chance de partager avec chacun d'entre vous des moments privilégiés, qui resteront des précieux souvenirs de ces années passées au laboratoire.

Je suis très reconnaissante envers tous mes amis lillois, avec qui j'ai partagé 5 ans de ma vie, et qui sont restés présents à chaque instant.
Laura, on en a parcouru du chemin, de Rennes à Lille. C'est avec toi que j'ai découvert cette ville, et il faut bien le dire, la quasi-totalité de ses musées. Avec Quentin, nous avons partagé tellement de petites aventures ensemble, qui ont rythmé toute ma thèse, que je me demande encore comme nous avons trouvé le temps de tout faire : les ateliers culinaires, les mariodis, les voyages, le camping, les jeux de société, les karaokés, les soirées au Joker. Tu es une personne qui m'est chère, toujours ouverte et sans jugement. Merci pour toutes ces bonnes idées de nouvelles expériences, dans lesquelles tu m'inclues. Quentin, tu es une personne bienveillante, avec toujours cette petite touche d'humour qui rend le moment agréable. Merci à tous les deux, et maintenant, à nous de tenir la distance. Bérénice, nous nous sommes assez vite trouvées au labo, et une belle amitié s'est développée. Nous partageons beaucoup de points communs, y compris certains traits de caractères qui nous rendent parfois un peu inadaptées au monde extérieur, mais je suis convaincue qu'on s'en sortira très bien. Charlotte, merci pour les longues discussions à l'IBL, les petites remarques cinglantes inattendues et les parties de jeu souvent mouvementées. Merci également de manger aussi lentement que moi, ça fait du bien de ne pas être seule. Maxime, merci pour toutes ces idées de futurs projets, qui m'ont permis

de rêver. Plus généralement les Costa, je suis très heureuse d'avoir partagé avec vous tant de moments importants. Dans les instants difficiles, vous avez pris soin de moi et m'avez aidée à me relever, je vous en serai toujours reconnaissante. J'ai parfois passé tant de temps chez vous, que votre maison est devenue un peu la mienne. J'ai hâte de voir où nous mèneront nos prochaines aventures.
Xing, merci pour ta bonne humeur, c'est toujours un vrai plaisir de partager un moment avec toi.

Merci aux Dodos, Tom, Morgane, Julien, Manon, avec qui l'heure est toujours à la rigolade. Merci pour tous ces week-ends et vacances, qui sont la promesse de beaux moments. Vous avez mis la barre haute à vos soutenances de thèse, j'espère être à la hauteur. Dans tous les cas, c'est un prétexte de plus pour se voir.

Je remercie du fond du cœur ma famille, qui m'a toujours soutenue et rendu visite à de nombreuses reprises, malgré la distance. Vous m'accompagnez dans chaque étape de ma vie, même lorsque mon parcours vous semble parfois un peu abstrait. Chaque instant passé avec vous recharge mes batteries et me rappelle l'essentiel.

Bien évidemment, je remercie mon complice de tous les jours, Guillaume. Outre la patience dont tu as fait preuve, ton soutien constant m'a permis de garder le cap, même dans les périodes les plus intenses. Uno et toi avez grandement contribué à l'aboutissement de ce travail, en apportant de la vie et de la douceur dans ces derniers moments d'écriture. Bien des soirées ont été passées à relire, discuter, corriger, merci pour ton regard attentif et ta présence. On ne remercie pas toujours assez ceux que l'on aime, je te remercie d'être là et de prendre soin de moi, simplement et sincèrement. Une dernière chose : je te souhaite toute la réussite que tu mérites dans ta double thèse !

RÉSUMÉ

La tuberculose, causée par *Mycobacterium tuberculosis*, demeure la principale cause de décès due à un agent infectieux unique, avec 1,25 million de décès rapportés dans le monde en 2023. Malgré l'existence de protocoles polythérapeutiques standardisés, 2 à 5 % des patients atteints de formes pharmacosensibles développent des rechutes post-traitement. L'analyse microbiologique des expectorations de patients révèle que la majorité des bacilles tuberculeux ne sont cultivables qu'en présence d'un filtrat de culture de *M. tb* en phase exponentielle. Difficiles à diagnostiquer, ces bacilles différentiellement cultivables (DCTB) sont également associés à une tolérance aux antibiotiques.

Les modèles *in vitro* de DCTB actuellement disponibles, basés sur la mise sous stress des bacilles, produisent des phénotypes réversibles spontanément lors de la levée du stress, ne reproduisant pas fidèlement la dépendance exclusive aux facteurs de réveils des filtrats de culture observée dans les isolats cliniques.

Nous avons développé un modèle de DCTB optimisé utilisant un isolat clinique de la lignée phylogénétique 1 (*Mycobacterium tuberculosis* L1), qui présente une propension à former des DCTB en culture exponentielle cent fois supérieure à celle de la souche de référence de laboratoire H37Rv. Ce modèle génère, par dilution séquentielle contrôlée de cultures *in vitro*, une population de DCTB stable et viable, dont le réveil peut être initié par l'ajout de surnageants de culture exogène.

Ce modèle constitue un outil expérimental robuste pour l'étude moléculaire des mécanismes régulant l'état DCTB. Nous avons identifié le locus génétique TbD1 comme un facteur potentiel favorisant leur formation chez *M. tb* de lignée 1. Par ailleurs, l'état de DCTB dans ce modèle semble être régulé par un mécanisme analogue à celui du *quorum sensing*. L'exploitation de ce modèle dans un criblage génomique par interférence CRISPRi a permis d'identifier des déterminants génétiques impliqués dans la survie en état DCTB et dans son maintien. Parallèlement, un criblage pharmacologique à haut-débit sur une chimiothèque de 10 240 composés a permis d'identifier des petites molécules capables d'induire le réveil des DCTB.

Ces résultats confortent la pertinence du modèle DCTB développé et mettent en évidence de nouveaux réseaux génétiques impliqués dans la régulation de la dormance mycobactérienne ainsi que des molécules capables d'en perturber l'équilibre. Ensemble, ils ouvrent des perspectives pour le développement de nouvelles approches diagnostiques ou thérapeutiques, ciblant spécifiquement les réservoirs bactériens persistants impliqués dans les rechutes cliniques.

Mots-clés : *Mycobacterium tuberculosis*, modèle DCTB, TbD1, criblage CRISPRi, criblage de composés

Model of Differentially Culturable Tubercle Bacilli (DCTB): study of their resuscitation using genetic approaches and compound screening

Tuberculosis, caused by *Mycobacterium tuberculosis*, remains the leading cause of death from a single infectious agent, with 1.25 million deaths reported worldwide in 2023. Despite the implementation of standardized multidrug treatment protocols, 2–5% of patients with drug-sensitive forms experience post-treatment relapse. Microbiological analysis of patient sputum samples reveals that most tubercle bacilli can be cultured *in vitro* exclusively in the presence of a filtrate derived from exponentially growing *M. tb* cultures. These Differentially Culturable Tubercle Bacilli (DCTB) are difficult to detect and exhibit increased antibiotic tolerance.

Current *in vitro* DCTB models, which rely on exposing bacilli to stress conditions, produce phenotypes that spontaneously resume growth once the stress is removed, thereby failing to reproduce the strict dependence on culture filtrate resuscitation factors observed in clinical isolates.

We developed an optimized DCTB model using a clinical isolate from phylogenetic lineage 1 (*Mycobacterium tuberculosis* L1), which shows a hundred-fold higher propensity to form DCTB during exponential growth compared to the laboratory reference strain H37Rv. Through controlled sequential dilution of *in vitro* cultures, this model generates a stable and viable DCTB population whose resuscitation can be triggered by the addition of exogenous culture supernatants.

This system provides a robust experimental tool to investigate the molecular mechanisms regulating the DCTB state. We identified the TbD1 genetic locus as a potential factor promoting DCTB formation in lineage 1 *M. tb*. Moreover, the DCTB state in this model appears to be controlled by a mechanism analogous to quorum sensing. Using this model in a CRISPRi-based genomic screen allowed the identification of genetic determinants involved in DCTB survival and maintenance. In parallel, a high-throughput pharmacological screening of a 10,240-compound library identified small molecules capable of inducing DCTB resuscitation.

Overall, these findings validate the relevance of the DCTB model and highlight previously unrecognized genetic networks involved in mycobacterial dormancy regulation, as well as molecules capable of disrupting this state. Together, they open new avenues for the development of diagnostic and therapeutic strategies specifically targeting persistent bacterial reservoirs responsible for clinical relapse.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*, DCTB model, TbD1, CRISPRi screening, compound screening

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Taux d'incidence estimés de la tuberculose en 2023 [26]. 26
Figure 2 : Nombre de décès causés par la tuberculose pendant la pandémie de COVID-19 et ses conséquences, 2020-2023. 27
Figure 3 : Variation (%) de l'incidence estimée de la tuberculose (nouveaux cas pour 100 000 habitants) en 2023 par rapport à 2015 [26]. 28
Figure 4 : Modèle de l'enveloppe cellulaire mycobactérienne [34]. 29
Figure 5 : Relations évolutives entre 119 espèces de mycobactéries basées sur les gènes d'ARN ribosomique 16S, *hsp65* et *rpoB* [41]. 31
Figure 6 : Phylogénie des lignées de *M. tb*. 32
Figure 7 : Phylo-géographie globale de *M. tb* [49]. 33
Figure 8 : Représentation du locus TbD1 et des gènes adjacents dans les souches *M. tb* de lignées ancestrales et modernes [51]. 34
Figure 9 : Représentation schématique de l'organisation des protéines MmpL [60]. 35
Figure 10 : Structure prédite de la protéine MmpL6 entière et tronquée. 36
Figure 11 : Représentation structurale de deux membres de la famille TetR [65]. 38
Figure 12 : Phases d'infection par *Mycobacterium tuberculosis* [69]. 39
Figure 13 : Progression de *Mycobacterium tuberculosis* dans les voies aériennes jusqu'à la formation d'un granulome [71]. 40
Figure 14 : Radiographie pulmonaire mettant en évidence un complexe de Ghon [77]. 40
Figure 15 : Dissémination de *M. tb* et progression vers une tuberculosis active [71]. 42
Figure 16 : Radiographie d'un patient présentant une tuberculose pulmonaire bilatérale. 43
Figure 17 : Imageries de patients atteints de différentes formes de tuberculose extra-pulmonaire. 44
Figure 18 : Première utilisation clinique et émergence de résistances rapportées pour les thérapies contre *M. tb*. 54
Figure 19 : Devenir de l'infection tuberculeuse [155]. 56
Figure 20 : Représentation graphique de la tolérance et persistance aux antibiotiques. 60
Figure 21 : Dynamiques de croissance des différentes populations en réponse à un stress [169]. 63
Figure 22 : Protéines Rpfs retrouvées chez *M. tb* [177]. 80
Figure 23 : Représentation de la multitude de populations de DCTB pouvant être détectée chez les patients [273]. 84
Figure 24 : Représentation schématique des différentes populations de *M. tuberculosis* présentes dans le *sputum* des patients et de leur profil de sensibilité aux antibiotiques. 89

Figure 25 : Méthode d'évaluation de la cultivabilité et d'estimation de la proportion de bactéries réplicatives et DCTB dans une culture de *Mycobacterium tuberculosis*. 93
Figure 26 : Enrichissement en DCTB d'une culture de *M. tuberculosis* H37Ra au cours du temps. 94
Figure 27 : Enrichissement en DTCB d'une culture de *M. tuberculosis* H37Rv en phase exponentielle de croissance ou âgée de 8 semaines. 95
Figure 28 : Croissance de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv en milieu 7H9-OADC ou 7H9-OADC + 50% CF à différents inocula de départ. 96
Figure 29 : Croissance de *Mycobacterium tuberculosis* L1-500960 en milieu 7H9-OADC ou 7H9-OADC + 50% CF à différents inocula de départ. 97
Figure 30 : Comptage MPN dans une culture en phase exponentielle de *M. tb* H37Rv et L1-500960. 98
Figure 31 : Effet de la phase de croissance du surnageant sur le réveil des DCTB. 100
Figure 32 : Effet de l'inoculum et de la concentration en surnageant sur le réveil des DCTB. 101
Figure 33 : Induction du phénotype DCTB dans le milieu 7H9-OADC. 102
Figure 34 : Induction du phénotype DCTB dans des plaques différentiellement oxygénées. 103
Figure 35 : Observation du phénotype de DCTB, après caractérisation de la culture initiale. 104
Figure 36 : Caractérisation par cytométrie en flux d'une population de *M. tb* L1-500960 dans un état DCTB ou réveillées par du surnageant de culture (CF). 106
Figure 37 : Induction du phénotype DCTB après différents traitements. 109
Figure 38 : Induction du phénotype DCTB dans une culture fraîche de *M. tb* L1-500960. 110
Figure 39 : Impact des sources de carbone et des composants du milieu 7H9 enrichi sur le maintien du phénotype DCTB. 112
Figure 40 : Induction du phénotype DCTB dans le milieu 7H9-Glucose. 113
Figure 41 : Induction du phénotype DCTB dans le milieu Sauton. 114
Figure 42 : Cinétique de l'effet de différents facteurs de croissance sur le réveil de DCTB. 115
Figure 43 : Cinétique de croissance de *M. tb* L1-500960 dans différents milieux. 116
Figure 44 : Réveil des DCTB en présence d'albumine avec différents degrés de purification. 117
Figure 45 : Cinétique de l'effet de différentes sources d'albumine sur le réveil de DCTB. 118
Figure 46 : Effet de la dose de CF et/ou d'OADC sur le réveil des DCTB. 119
Figure 47 : Caractérisation phénotypique des DCTB par cytométrie en flux. 128
Figure 48 : Activités des composés sur le réveil des DCTB. 177
Figure 49 : Schéma représentant la régulation par Rv1556 de *mmpL6* et son propre gène. 188
Figure 50 : Représentation schématique de l'organisation du locus TbD1 chez les mutants utilisés dans cette étude. 189

Figure 51 : Représentation phénotypique des souches de *M. tb* 79112 et H37Rv possédant ou non le locus TbD1 189
Figure 52 : Induction du phénotype DCTB par les souches 79112 et H37Rv possédant ou non le locus TbD1. 190
Figure 53 : Induction du phénotype DCTB chez des souches appartenant à différentes lignées du MTBC. 191
Figure 54 : Structure de BDM88496. 193
Figure 55 : Surexpression des gènes *mmpS6* et *mmpL6* chez *M. tb* L1-500960 en présence de BDM88496. 194
Figure 56 : Détermination de l'interaction entre Rv1556 et BDM88496 par un test de TSA. 195
Figure 57 : Gel-retard montrant l'interaction entre Rv1556 et la région promotrice de son régulon. 196
Figure 58 : Schéma représentant la régulation de *rv1556* et *mmpL6*, en présence du répresseur BDM88496. 196
Figure 59 : Dose-réponse du réveil par le surnageant des DCTB générés chez *M. tb* L1-500960 ou H37Rv, avec ou sans BDM88496. 197
Figure 60 : Structure de la cytokinine N^6-(2-Isopentenyl)adenine (2iP). 199
Figure 61 : Expression des gènes *rv1556* et *mmpL6* en présence de 2iP et BDM88496. 199
Figure 62 : Détermination de l'interaction entre Rv1556 et la cytokinine 2iP par TSA 200
Figure 63 : Hypothèses concernant la régulation de l'état réplicatif de *M. tb* par MmpL6 en présence de surnageant 201
Figure 64 : Détermination de l'interaction entre Rv1556 et des molécules du surnageant par un TSA. 203
Figure 65 : Gel-retard montrant la fixation de Rv1556 sur son régulon en présence de la fraction soluble du surnageant. 204
Figure 66 : Expression des gènes *rv1556* et *mmpL6* chez les souches surexprimant *rv0023 et rv0081*. 206
Figure 67 : Expression des gènes *rv1556* et *mmpL6* chez *M. tb* H37Ra cultivée en milieu 7H9-Glucose. 206
Figure 68 : Schéma expérimental pour détecter et purifier le ligand putatif de Rv1556. 208
Figure 69 : Analyse par SDS-PAGE des éluats obtenus après passage des échantillons sur colonne avec ou sans Rv1556. 210
Figure 70 : Analyse par TSA de la dénaturation de Rv1556 suite au traitement à l'urée. 210
Figure 71 : Vérification du locus TbD1 chez les souches M. *tb* de différentes lignées. 223
Figure 72 : Etapes de purification de Rv1556 sur gel SDS-PAGE. 233

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Principaux antibiotiques utilisés dans la thérapie antituberculeuse, avec leur mode d'action, populations bactériennes cibles et concentration minimale inhibitrice (CMI). 49
Tableau 2 : Résumé des conditions expérimentales testées pour l'induction du phénotype DCTB et résultats observés. 110
Tableau 3 : Résumé des conditions expérimentales testées pour l'induction du phénotype DCTB en absence d'albumine et résultats observés. 115
Tableau 4 : Détermination de la sensibilité aux antibiotiques de *M. tb* 79112 et H37Rv possédant ou non le locus TbD1. 192
Tableau 5 : Conditions expérimentales testées pour la purification du ligand putatif de Rv1556 207
Tableau 6 : Description des souches utilisées. 221
Tableau 7 : Amorces utilisées pour l'amplification qPCR. 229

LISTE DES ABBRÉVIATIONS

2iP	N^6-(2-Isopentenyl)adenine
ADN	Acide désoxyribonucléique
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
ARN	Acide ribonucléique
ARNr	Acide ribonucléique ribosomique
ATP	Adénosine triphosphate
BAAR	Bacilles acido-alcoolo-résistants
BCG	Bacille Calmette-Guérin
BDQ	Bédaquiline
BET	Bromure d'éthidium
BPaL	Bédaquiline - Prétomanide - Linézolide
BPaLM	Bédaquiline - Prétomanide – Linézolide - Moxifloxacine
BSA	Albumine sérique bovine (*Bovine Serum Albumin*)
BSA FA	Albumine sérique bovine sans acides gras (*Fatty Acid–Free Bovine Serum Albumin*)
BSL	Niveau de sécurité biologique (*Biosafety Level*)
CF	Filtrat de culture / surnageant de culture (*Culture Filtrate*)
CFU	Unités formant colonies (*Colony-Forming Units*)
ChIP-seq	Immunoprécipitation de la chromatine suivie de séquençage (*Chromatin Immunoprecipitation Sequencing*)
CMI	Concentration minimale inhibitrice
CRISPRi	*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats interference*
DCTB	Bacilles tuberculeux différentiellement cultivables (*Differentially Culturable Tubercle Bacilli*)
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DO	Densité optique
DosR	Régulateur de la dormance (*Dormancy survival Regulator*)
EMB	Éthambutol
EMSA	Expérience de retard sur gel (*Electrophoretic Mobility Shift Assay*)
EPTB	Tuberculose extra-pulmonaire
FC	*Fold-Change*
FDA	Fluorescéine diacétate
FDR	Taux de fausses découvertes (*False Discovery Rate*)

GFP	*Green Fluorescent Protein*
HTH	Motif hélice–tour–hélice
IFN-γ	Interféron gamma
IHN	Isoniazide
LAM	Lipoarabinomannane
LB	Milieu de Luria Bertani
LC-MS	Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (*Liquid Chromatography–Mass Spectrometry*)
LTBI	Infection Tuberculose Latente (*Latent Tuberculosis Infection*)
Lzd	Linézolide
M. tb	*Mycobacterium tuberculosis*
Mb	Mégabase
MDK	Temps de destruction minimale (*Minimum Duration for Killing*)
MDR-TB	Tuberculose multirésistante (*Multidrug-Resistant Tuberculosis*)
MFX	Moxifloxacine
MGIT	Système de culture automatisé *Mycobacteria Growth Indicator Tube*
MmpL	*Mycobacterial membrane protein Large*
MmpS	*Mycobacterial membrane protein Small*
MNT	Mycobactéries Non-Tuberculeuses
MPN	Nombre le plus probable (*Most Probable Number*)
MTBC	Complexe *Mycobacterium tuberculosis* (*Mycobacterium tuberculosis complex*)
NAAT	Test d'Amplification des Acides Nucléiques (*Nucleic Acid Amplification Test*)
NAD	Nicotinamide adénine dinucléotide
NK	Cellule tueuse naturelle (*Natural Killer cell*)
NO	Monoxyde d'azote (*Nitric oxide*)
NR	Rouge de Nile (Nile Red)
NRP	Phase non réplicative (*Non-Replicating Phase*)
ns	Non significatif (*Not significant*)
OADC	Acide oléique, albumine, dextrose et catalase (*Oleic acid–Albumin–Dextrose–Catalase*)
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PA	Prétomanide
pb	Paire de bases (*Base pair*)
PBS	Tampon phosphate salin (*Phosphate-Buffered Saline*)

PCR	Réaction de polymérisation en chaîne (*Polymerase Chain Reaction*)
PI	Iodure de propidium (*Propidium Iodide*)
POA	Acide pyrazinoïque (*Pyrazinoic acid*)
PZA	Pyrazinamide
RIF	Rifampicine
RND	*Resistance-Nodulation-Division*
ROS	Espèces réactives de l'oxygène (*Reactive Oxygen Species*)
Rpf	Facteur de réveil (*Resuscitation-promoting factor*)
RR-TB	Tuberculose résistante à la rifampicine (*Rifampicin-Resistant Tuberculosis*)
RT-qPCR	PCR quantitative en temps réel après transcription inverse (*Reverse Transcription quantitative Polymerase Chain Reaction*)
sgRNA	ARN guide simple (*Single-guide RNA*)
TAG	Triacylglycérol
TB	Tuberculose
TbD1	*Mycobacterium tuberculosis* Délétion spécifique 1
TCA	Cycle de l'acide tricarboxylique (*Tricarboxylic Acid Cycle*)
TetR	*Tetracyclin Repressor*
Tm	Température de fusion (*Melting temperature*)
TSA	Test de dénaturation thermique (*Thermal Shift Assay*)
TTP	Temps jusqu'à positivité (*Time To Positivity*)
UV	Ultraviolets
VBNC	Cellules viables mais non cultivables (*Viable But Non-Culturable*)
VIH	Virus de l'Immunodéficience Humaine
XDR-TB	Tuberculose ultrarésistante (*Extensively Drug-Resistant Tuberculosis*)

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS 5
RÉSUMÉ 9
LISTE DES FIGURES 11
LISTE DES TABLEAUX 14
LISTE DES ABBREVIATIONS 15
SOMMAIRE 19
INTRODUCTION 23
I. La tuberculose 23
A. Epidémiologie 23
1. Histoire 23
2. Transmission 24
3. Prévalence dans le monde 25
B. *Mycobacterium tuberculosis* et infection 28
1. Le pathogène 28
a. Mycobacterium tuberculosis 28
b. *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTBC) 30
c. Locus TbD1 33
d. Protéines MmpL 35
e. Régulateurs transcriptionnels TetR 37
2. Physiopathologie 38
a. Tuberculose latente 39
b. Tuberculose active 41
c. Tuberculose disséminée et extra-pulmonaire 43
d. Interaction hôte-pathogène 45
C. Dépistage et diagnostic 45
1. Diagnostic par imagerie 46
2. Diagnostic microbiologique 46
3. Diagnostic immunologique 48
D. Traitements 49
1. Traitements de première ligne 50
2. Régime BPaLM / BPaL 52
3. Traitements de seconde ligne 53
4. Résistance aux antibiotiques 53
5. Échecs thérapeutiques et rechutes 55
E. Vaccin 57
II. *M. tb* dans un état non réplicatif 57
A. Concepts et définitions 58

1. Résistance aux antibiotiques 58
2. Persistance et tolérance 58
a. Persistance 59
b. Tolérance 60
3. Dormance 61
4. Bactéries viables mais non cultivables (VBNC) 62
a. Définition 62
b. Mécanismes 63
c. Détection 64
B. Modèles d'étude des bactéries non réplicatives 65
1. *In vitro* 65
2. *In vivo* 73
C. Bacilles Tuberculeux Différentiellement Cultivables (DCTB) 78
1. Définition 78
2. Facteurs de réveil 79
a. Protéines Rpfs (*Resuscitating-Promoting Factor*) 79
b. Facteurs lipidiques 81
c. L'AMPc 81
d. Métabolisme énergétique 82
e. Théories sur le réveil 82
3. En clinique 83
a. Chez les patients 83
b. Risques associés à la présence de DCTB 84
D. Stratégies ciblant les bactéries non réplicatives 86
OBJECTIFS DE LA THESE 89
CHAPITRE 1 DEVELOPPEMENT D'UN MODELE *IN VITRO* DE DCTB 91
I. Principe du modèle 92
A. Cinétique d'obtention des DCTB 92
B. Obtention des DCTB par dilution 95
II. La lignée 1, plus propice pour la formation des DCTB 96
III. Mise au point des conditions 98
A. Standardisation du surnageant de culture 98
B. Instabilité du modèle DCTB en milieu standard 101
C. Éliminer les bactéries réplicatives 107
D. L'albumine comme source de variabilité 111
E. Conditions finales pour le modèle DCTB 115
IV. Facteurs induisant le réveil 117
V. Discussion 119

CHAPITRE 2 CARACTERISATION PHÉNOTYPIQUE, CRIBLAGE GÉNÉTIQUE ET DE MOLECULES SUR LE MODÈLE DCTB 125
I. Propriétés phénotypiques 126
II. Criblage génétique et de petites molécules sur le modèle DCTB 129
A. Description des criblages 129
B. Article de recherche : Modeling *Mycobacterium tuberculosis* Differential Culturability: From Genetic Screens to Chemical Resuscitation 130
C. Activité des composés sélectionnés 175
III. Tolérance aux antibiotiques 178
IV. Discussion 179
CHAPITRE 3 INFLUENCE DE LA REGION TBD1 SUR LE PHENOTYPE DE DCTB 187
I. Le locus TbD1 187
II. Phénotypes associés au locus TbD1 188
A. Description des souches bactériennes 188
B. Influence du locus TbD1 sur le phénotype DCTB 189
C. Influence du locus TbD1 sur la résistance aux antibiotiques 192
III. Régulation transcriptionnelle de *mmpL6* 193
A. Régulation de Rv1556 par BDM88496 194
B. Impact de la surexpression de *mmpL6* sur le phénotype DCTB 197
IV. Recherche d'un substrat naturel de MmpL6 198
A. Cytokinines 198
B. Molécules du surnageant de culture 200
1. Hypothèses 200
2. Liaison entre Rv1556 et des molécules du CF 202
V. Purification du ligand naturel de Rv1556 205
A. Conditions dans lesquelles *mmpL6* est surexprimée 205
B. Approche méthodologique pour la détection et la purification du ligand de Rv1556 207
VI. Discussion 211
CONCLUSIONS GÉNÉRALES 219
MATÉRIELS ET MÉTHODES 221
I. Matériels 221
A. Souches bactériennes 221
B. Milieux de culture et suppléments 223
1. Milieux 223
2. Surnageant de culture 224
3. Sources d'albumine et de carbone 224
4. Composés 225
II. Méthodes 225

A. Conditions de culture 225
B. Mesure et quantification de la croissance bactérienne 226
1. Lecture de la croissance 226
2. Estimation du nombre le plus probable (MPN) de *M. tb* 227
C. Techniques de biologie moléculaires 228
1. Construction de *M. tb* surexprimant la GFP, Rv0023 ou Rv0081 228
2. RT-qPCR 229
D. Caractérisation phénotypique 230
1. Microscopie à fluorescence 230
2. Cytométrie en flux 230
3. Efficacité des antibiotiques sur les souches 231
E. Test d'activité des hits du criblage 232
F. Détection et purification du ligand de Rv1556 232
1. Purification de Rv1556 232
2. Concentration du surnageant 233
3. *Thermal Shift Assay* 234
4. Retard sur gel 234
5. Test de purification du ligand 234
G. Analyse statistique 235
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 237

INTRODUCTION

I. La tuberculose

La tuberculose (TB) est une maladie causée par la bactérie *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tb*) qui a traversé les peuples et les âges, impactant profondément les sociétés et les cultures. Décrite sous différents noms dans les textes anciens, elle était connue sous le terme de « *phthisis* » dans l'Antiquité, puis « *king's evil* » au Moyen-Âge, ou encore qualifiée de « *white plague* » au XVIII^{ème} siècle, en raison de la pâleur caractéristique des malades [1]. La forme la plus répandue est la forme pulmonaire, mais elle peut également toucher d'autres organes et est alors qualifiée de tuberculose extra-pulmonaire [2].

Malgré les avancées médicales, la tuberculose reste aujourd'hui un défi majeur en matière de santé publique. Toutefois, grâce aux découvertes et travaux de nombreux scientifiques, notre compréhension de la maladie s'est considérablement améliorée, aboutissant à des progrès importants dans son traitement et sa gestion.

A. Epidémiologie

1. Histoire

Des analyses génomiques combinées à des approches statistiques ont permis d'estimer qu'un ancêtre des souches de *M. tb* serait apparu en Afrique entre 40 000 [3] et 70 000 ans [4] avant notre ère. De plus, l'émergence de souches de *M. tb* dans différents continents coïncide avec la migration des Hommes hors de l'Afrique, illustrant la relation étroite qu'entretient la bactérie avec son hôte [3,4].

Des déformations caractéristiques de la tuberculose osseuse, notamment celles affectant la colonne vertébrale, appelée maladie de Pott, sont relatées dans des textes et œuvres d'art de l'ancienne Egypte [5] et ont été retrouvées sur des momies égyptiennes [6]. Des analyses ADN effectuées sur des restes de momies égyptiennes datant de 2050 à 550 av. J.-C. ont permis de confirmer la présence de *Mycobacterium tuberculosis* chez ce peuple [7].

Dans l'Antiquité, Hippocrate décrivait déjà la *phthisis* (φθίσις), signifiant un « dépérissement » ou « consomption ». Ses descriptions détaillées des symptômes et lésions caractéristiques de la tuberculose ont convaincu les scientifiques modernes qu'il s'agissait bien de cette maladie [8].

Au Moyen-Âge, une forme spécifique de la tuberculose, affectant les ganglions lymphatiques et appelée *scrofula*, continue de ravager les populations. Elle est désormais désignée sous le nom de « *king's evil* », une pathologie pour laquelle se développe une pratique populaire : le toucher du roi , considéré comme un traitement [1,9].

En 1819, René Laennec décrit les symptômes caractéristiques de la phtisie pulmonaire dans son traité « De l'auscultation médiate » [10]. Il y mentionne la toux persistante, avec des expectorations muqueuses parfois supplémentées de sang (hémoptysie), une fièvre légère, des sueurs nocturnes et un amaigrissement progressif accompagné d'une faiblesse générale. Grâce au stéthoscope, dont il est l'inventeur, il identifie les signes respiratoires spécifiques à cette maladie, posant les bases du diagnostic clinique moderne de la tuberculose.

En 1834, le médecin allemand Johann Lukas Schönlein utilise pour la première fois le terme de « tuberculose », en raison de la présence de tubercules caractéristiques chez les patients [11].

En 1882, dans son article « *Die Ätiologie der Tuberkulose* », Robert Koch isole, colore et observe pour la première fois, au microscope, l'agent étiologique de la tuberculose. Il inocule ensuite des cochons d'Inde avec le bacille tuberculeux, provoquant la maladie et confirmant ainsi la validité de sa découverte [12]. En 1884, il formule les « postulats de Koch », une avancée majeure qui permet d'établir un lien direct entre un agent pathogène et une maladie, un fondement essentiel de la microbiologie moderne [13].

2. Transmission

Jusqu'au XIX^{ème} siècle, deux théories s'opposent concernant la transmission de la tuberculose. Certains pensent qu'il s'agit d'une maladie héréditaire, car elle touche souvent plusieurs membres d'un même foyer. D'autres, à l'instar du médecin grec Galen, considèrent que la tuberculose est une maladie infectieuse, transmissible d'une personne à une autre [14,15]. La réponse à cette question est apportée en 1865, lorsque Jean-Antoine Villemin inocule des lapins avec des tissus humains contaminés par *M. tb*. Les lapins développent la maladie et la thèse de la tuberculose en tant que maladie infectieuse est définitivement adoptée [16].

Naturellement, la tuberculose se transmet par voie aérienne, même si une infection par voie trans-dermale et gastro-intestinale sont possibles. Les personnes infectées par *Mycobacterium tuberculosis* propagent la maladie lorsqu'elles parlent, toussent ou éternuent, projetant dans l'air des gouttelettes aérosolisées contenant la bactérie. Ces gouttelettes peuvent rester suspendues dans l'air pendant plusieurs heures, bien que leur capacité de survie dépende des conditions environnementales, de la taille des gouttelettes et de la bactérie elle-même. Les personnes au contact de ces aérosols peuvent alors être infectées, l'évolution de l'infection dépend en grande partie de leur état immunitaire. [17–20].

Les personnes les plus contagieuses sont celles qui présentent la charge bactérienne la plus élevée, bien que des individus avec une charge bactérienne indétectable puissent également être contagieux [21,22]. Cependant, seule une personne symptomatique peut transmettre la maladie [2,23]. De plus, l'entourage du malade est plus susceptible de contracter la maladie [24].

Plusieurs facteurs augmentent le risque de développer la tuberculose, tels que le diabète, une immunodépression (notamment en cas d'infection par le virus de l'immunodéficience humaine [VIH]), la malnutrition, le tabagisme et l'alcoolisme [2,25]. Les enfants de moins de 5 ans sont également particulièrement vulnérables [24].

3. Prévalence dans le monde

À l'échelle mondiale, environ un quart de la population a été infectée par *Mycobacterium tuberculosis*. Cependant, seulement 5 à 10% des personnes infectées vont développer la forme symptomatique de la tuberculose. En 2023, 10,8 millions de personnes ont contracté la tuberculose et bien que des cas soient enregistrés dans toutes les régions du monde, certaines zones sont particulièrement touchées, telles que l'Asie du Sud et du Sud-Est, ainsi que l'Afrique sub-saharienne (**Figure 1**) [26].

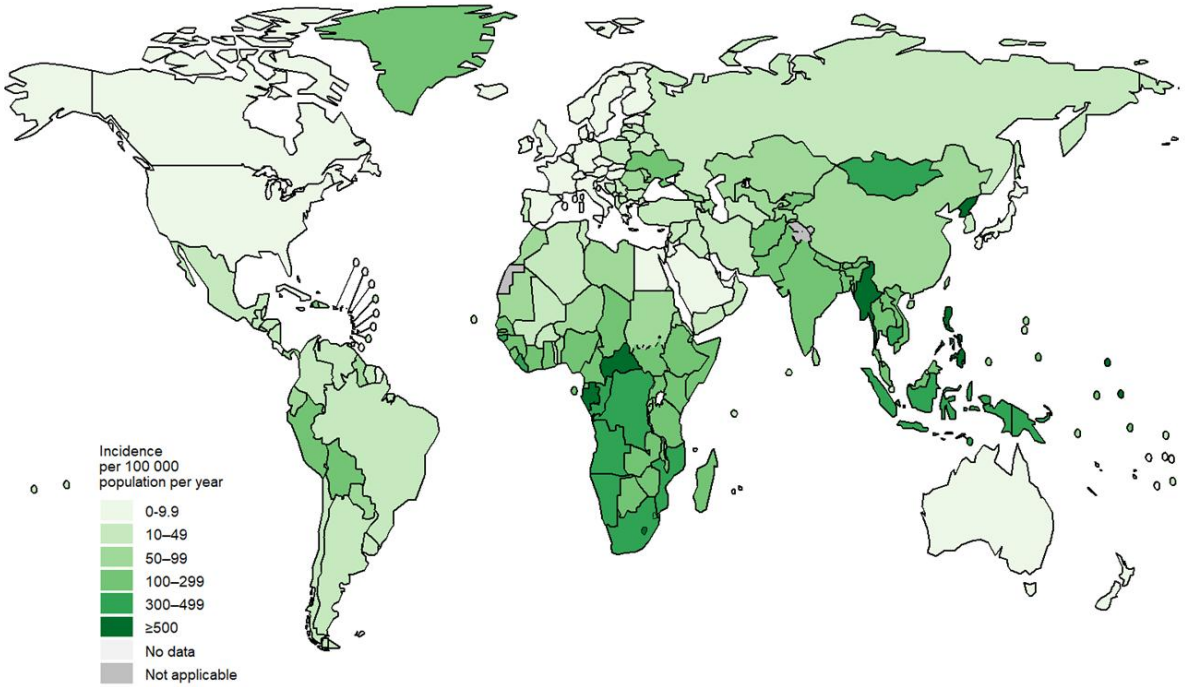


Figure 1 : Taux d'incidence estimés de la tuberculose en 2023 [26].

La tuberculose demeure la principale cause de décès causée par un agent infectieux unique, avec 1,25 million de décès en 2023. Le déclin significatif du taux de mortalité de 2010 à 2019 a été perturbé par la pandémie de COVID-19, qui a entravé les efforts de diagnostic et de traitement (**Figure 2**). Le manque d'accès aux soins et l'absence de traitement pour de nombreuses personnes ont aggravé la situation et entrainé une recrudescence de la mortalité à partir de 2020 [26,27].

On peut également qualifier la tuberculose de maladie sociale, liée à des conditions de vie précaires. Les traitements sont coûteux, et dans certains pays, la surpopulation favorise la transmission entre individus. De plus, la malnutrition et l'immunodépression, notamment causées par des infections concomitantes comme le VIH, entraîne une évolution vers des formes graves de la maladie [28,29].

La co-infection avec le VIH reste un facteur majeur de la propagation de la tuberculose, les personnes séropositives ayant un risque 16 fois plus élevé de contracter la maladie. En 2023, la tuberculose est la première cause de mortalité chez les personnes vivant avec le VIH, avec 161 000 décès [2,26].

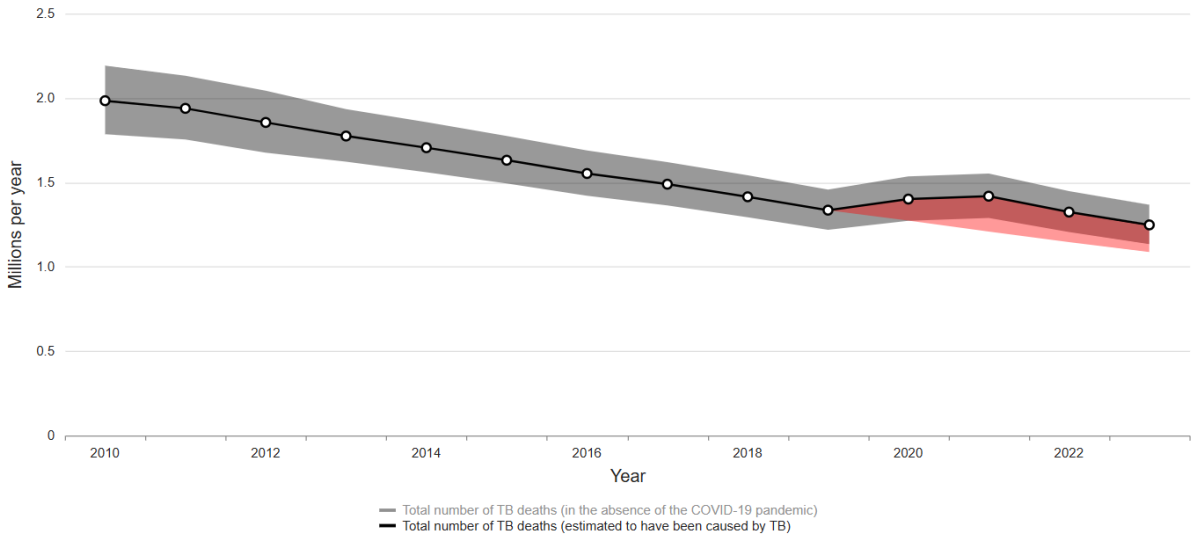


Figure 2 : Nombre de décès causés par la tuberculose pendant la pandémie de COVID-19 et ses conséquences, 2020-2023.
La zone ombrée en noir représente l'intervalle d'incertitude à 95 % du nombre réel de décès estimés comme ayant été causés par la tuberculose ; la ligne rouge montre une estimation du nombre de décès qui auraient été causés par la tuberculose en l'absence de la pandémie de COVID-19 ; la zone ombrée en rouge montre le nombre supplémentaire de décès causés par la tuberculose en raison des perturbations liées à la pandémie de COVID-19 [26].

En 2014, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) lance la « *End TB Strategy* ». Les principaux objectifs de ce programme sont de réduire, d'ici 2035, l'incidence des cas de tuberculose de 80% (**Figure 3**), de diminuer de 90% le nombre de décès dus à la maladie et d'éliminer les coûts financiers supportés par les malades. Pour atteindre ces objectifs, plusieurs mesures sont mises en place : une augmentation des capacités de diagnostic et de traitement, un soutien social accru pour les patients et un renforcement de la recherche, afin de découvrir de nouvelles stratégies médicales pour la lutte contre la tuberculose [30]. Le succès de ce programme dépendra de l'engagement mondial, du financement suffisant et de l'amélioration continue des systèmes de santé, pour garantir un accès universel aux services de dépistage, de traitement et de prévention.

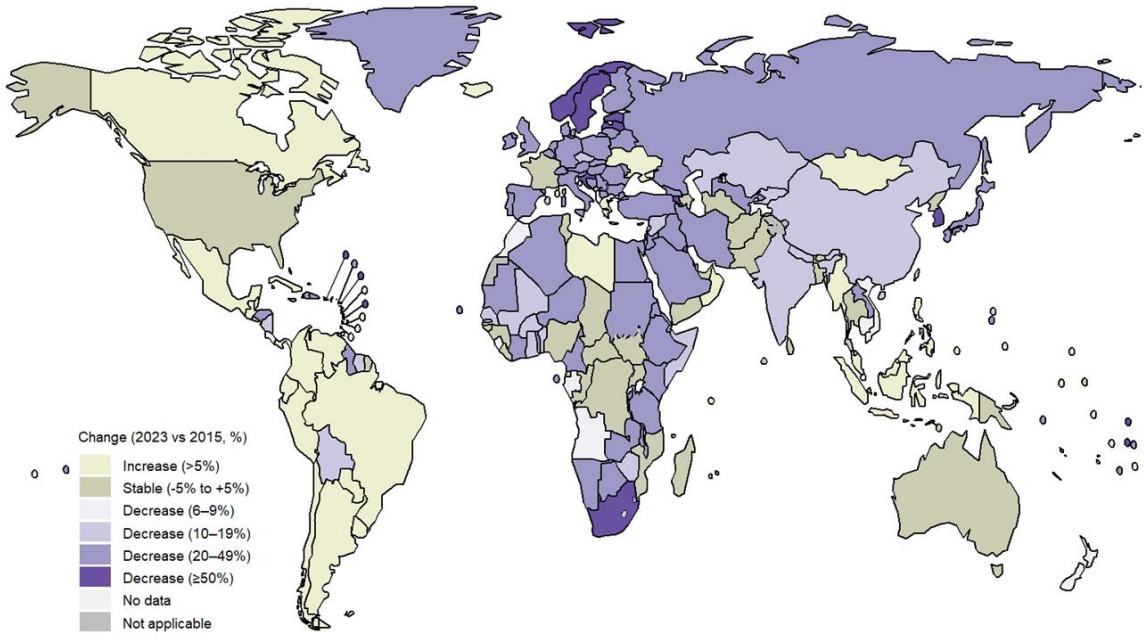


Figure 3 : Variation (%) de l'incidence estimée de la tuberculose (nouveaux cas pour 100 000 habitants) en 2023 par rapport à 2015 [26].

B. *Mycobacterium tuberculosis* et infection

1. Le pathogène

a. Mycobacterium tuberculosis

Le séquençage complet du génome de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, souche de référence en laboratoire, publié par Cole et al. a permis une avancée majeure pour l'étude et la compréhension de *M. tb*. Le génome a une taille de 4,4 Mb, très riche en contenu G + C (65.5%), avec plus de 4 000 gènes codant pour des protéines (N° accession NCBI : NC_000962) [31].

Le bacille tuberculeux mesure de 2 à 4 µm de long, et 0,2 à 0,5 µm de large, suivant les conditions. C'est un aérobe, non mobile et ne formant pas de spores. Sa croissance est lente, et son temps de génération est estimé entre 15 et 20h dans des conditions optimales de croissance. Les colonies formées sur milieu solide ont un aspect rugueux, et elles s'agrègent en milieu liquide [25,28]. Ce phénomène est attribué à leur paroi peu commune, très riche en lipides [32,33].

L'enveloppe cellulaire des mycobactéries est constituée d'une superposition de plusieurs couches (**Figure 4**). Tout d'abord, la membrane plasmique, une double couche lipidique

qui contient des lipides et protéines impliquées dans le transport cellulaire. Ensuite, l'espace périplasmique dans lequel sont retrouvés plusieurs glycolipides et protéines. La paroi cellulaire est formée du peptidoglycane, lié de manière covalente aux arabinogalactanes, eux-mêmes estérifiés par des acides mycoliques. Ces derniers forment la membrane externe, une double couche lipidique aussi appelée mycomembrane, particulièrement riche en lipides sur sa face externe. Chez les souches pathogènes, dont *M. tb* fait partie, on retrouve une capsule composée principalement de glucanes, protéines et polysaccharides, qui contribuent à la protection de la bactérie et à son interaction avec l'hôte [34,35].

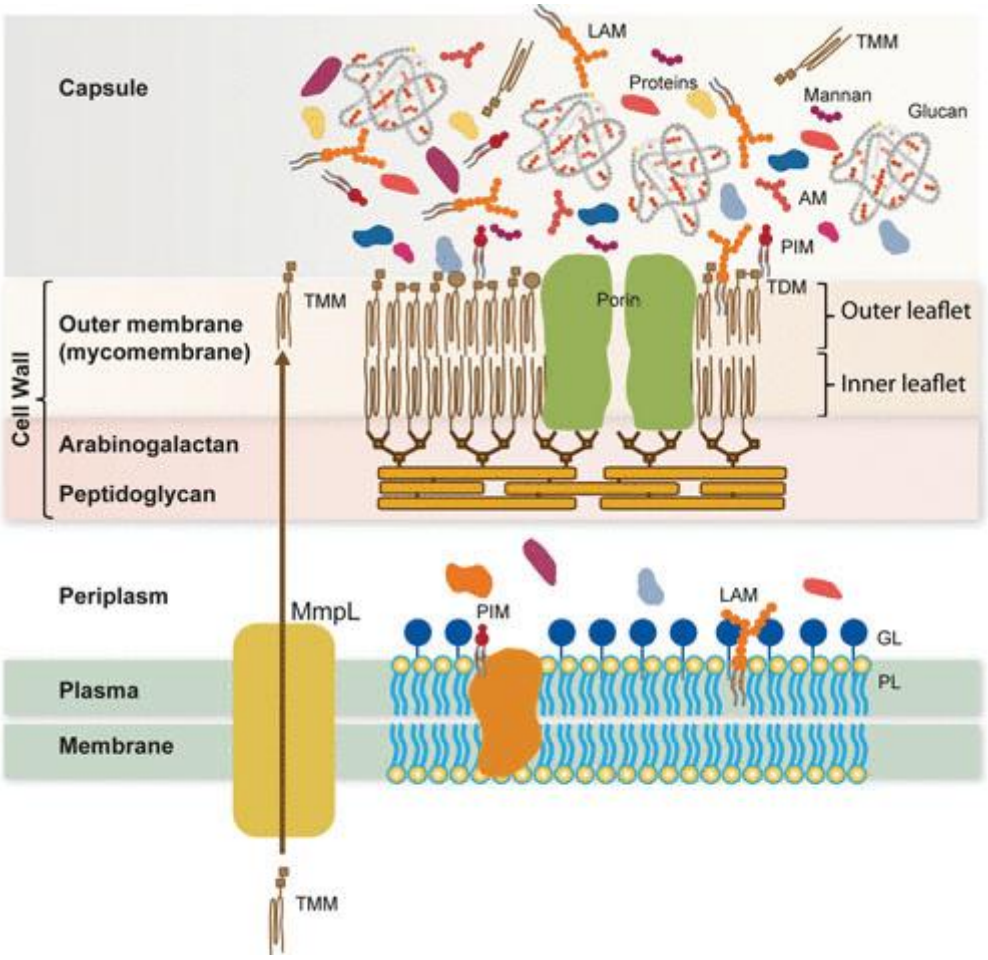


Figure 4 : Modèle de l'enveloppe cellulaire mycobactérienne [34].
AM, arabinomannane; LAM, lipoarabinomannane; GL, couche granulaire; MmpL, *mycobacterial membrane protein large*; PIM, phosphatidyl inositol mannosides; PL, phospholipides; TDM, dimycolate de tréhalose; TMM, monomycolate de tréhalose.

Cette paroi épaisse et hydrophobe empêche les mycobactéries de retenir la coloration classique de Gram. *M. tb* n'est classifié ni comme Gram-négatif, ni comme Gram-positif, même si la structure de son enveloppe cellulaire avec la présence de la mycomembrane

le rapproche plus des Gram-négatif. Par cette spécificité, *M. tb* et d'autres mycobactéries sont classés parmi les bacilles acido-alcoolo-résistants (BAAR). Entre 1882 et 1883, Friedrich Ziehl et Friedrich Neelsen ont pallié cette difficulté en mettant au point une nouvelle méthode, appelée coloration *acid-fast* ou Ziehl-Neelsen, améliorant l'observation des mycobactéries. Leur technique est basée sur l'utilisation d'un colorant (fuchsine) qui pénètre dans la bactérie grâce à un traitement par la chaleur. Ensuite, les bactéries sont traitées avec une solution acide-alcool, qui élimine le colorant des bactéries non *acid-fast* [36]. La coloration à l'auramine est également très utilisée. Elle repose sur l'emploi d'un colorant fluorescent, l'auramine O, qui se fixe aux acides mycoliques. L'excitation par les ultraviolets (UV) entraîne une émission du colorant, qui permet de visualiser les bactéries [37,38].

b. *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTBC)

Depuis sa classification en 1896, *Mycobacterium* est l'unique genre retrouvé dans la famille des *Mycobacteriaceae*, elle-même appartenant à l'ordre des *Mycobacteriales* dans le phylum *Actinobacteria* [39,40]. La plupart des espèces de *Mycobacterium* (**Figure 5**) sont des bactéries environnementales, présentes dans l'eau ou le sol. Elles sont catégorisées dans un groupe appelé Mycobactéries Non-Tuberculeuses (MNT). Certaines de ces espèces peuvent se retrouver en contact avec l'humain, et devenir des pathogènes opportunistes, comme *M. ulcerans* ou *M. abscessus*. On retrouve également les pathogènes responsables de la lèpre, *M. leprae* et *M. lepromatosis* dans le groupe du même nom. Enfin, le *Mycobacterium tuberculosis complex* (MTBC) comprend toutes les bactéries responsables de la tuberculose, chez les humains ou animaux [41,42].

Les mycobactéries appartenant au MTBC partagent une similarité de séquence de 99%, et des séquences d'ARN ribosomiques 16S identiques. Cependant, elles diffèrent dans leur spectre d'hôte : *M. tb* et *M. africanum* sont des pathogènes strictement humains, tandis que *M. microti* infecte les rongeurs et *M. bovis* a un spectre d'hôtes plus large [42]. La majorité des pathogènes humains sont caractérisés par une croissance lente, c'est-à-dire qu'il leur faut au moins 7 jours pour former des colonies visibles en milieu solide [41].

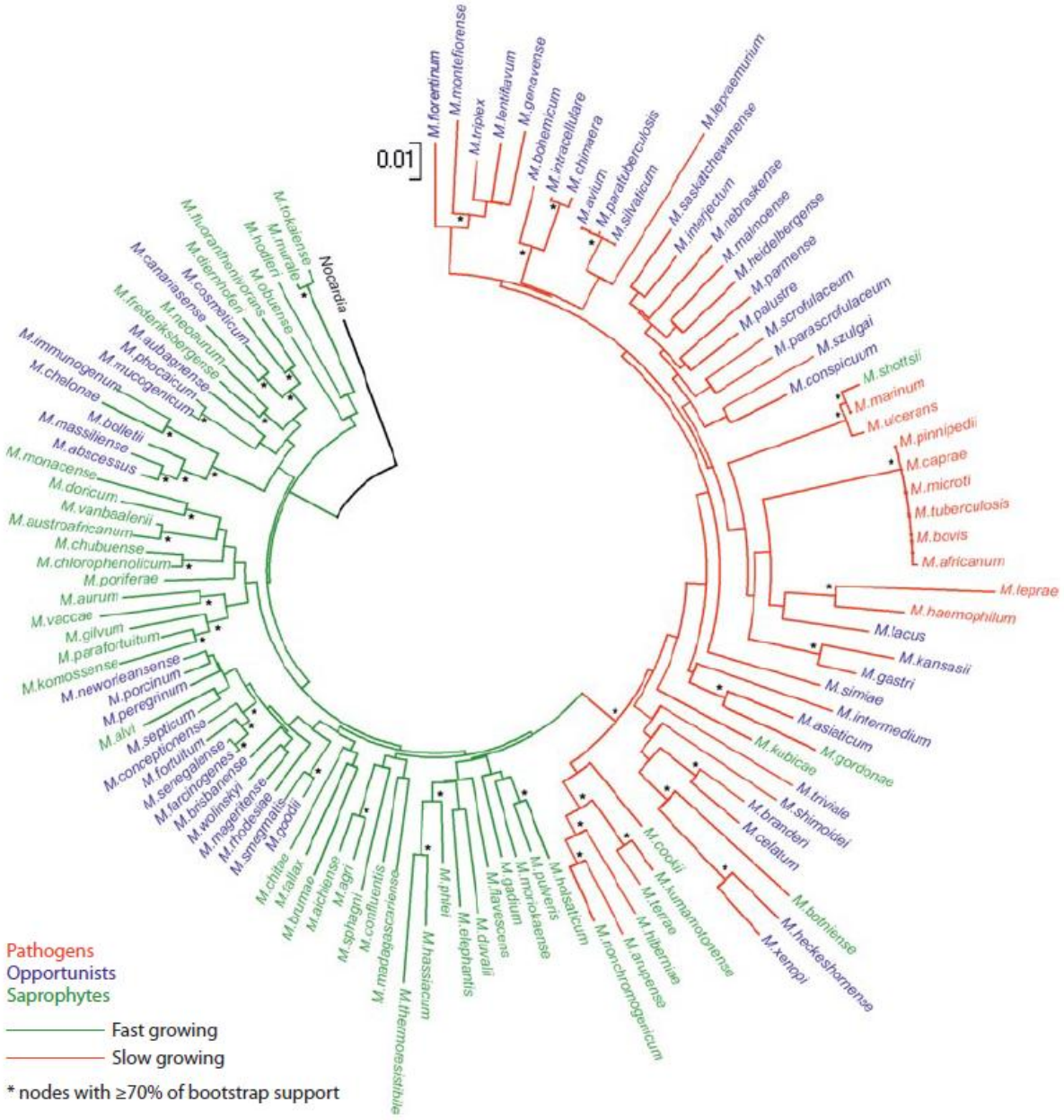


Figure 5 : Relations évolutives entre 119 espèces de mycobactéries basées sur les gènes d'ARN ribosomique 16S, *hsp65* et *rpoB* [41].

Les progrès réalisés dans les techniques de séquençage génomique ont ouvert la voie à de nouvelles perspectives pour l'étude des origines de *Mycobacterium tuberculosis* et la classification des différentes souches [31,42–44].

Mycobacterium canettii a été identifié comme agent pathogène de certains cas de tuberculose dans la corne de l'Afrique. D'un point de vue génomique, il est plus éloigné et n'appartient donc pas au MTBC. Cependant, de nombreuses régions de délétions (RD), qui ont été perdues au cours de l'évolution, ont été retrouvées dans son génome (**Figure 6**).

L'analyse de ces régions permet de distinguer les différentes espèces du genre *Mycobacterium*, ainsi que de retracer leur phylogénie. Pour ces raisons, des travaux suggèrent que le MTBC et *Mycobacterium canettii* dériveraient d'un ancêtre commun [42,45–47], désigné sous le nom de *Mycobacterium prototuberculosis* [46].

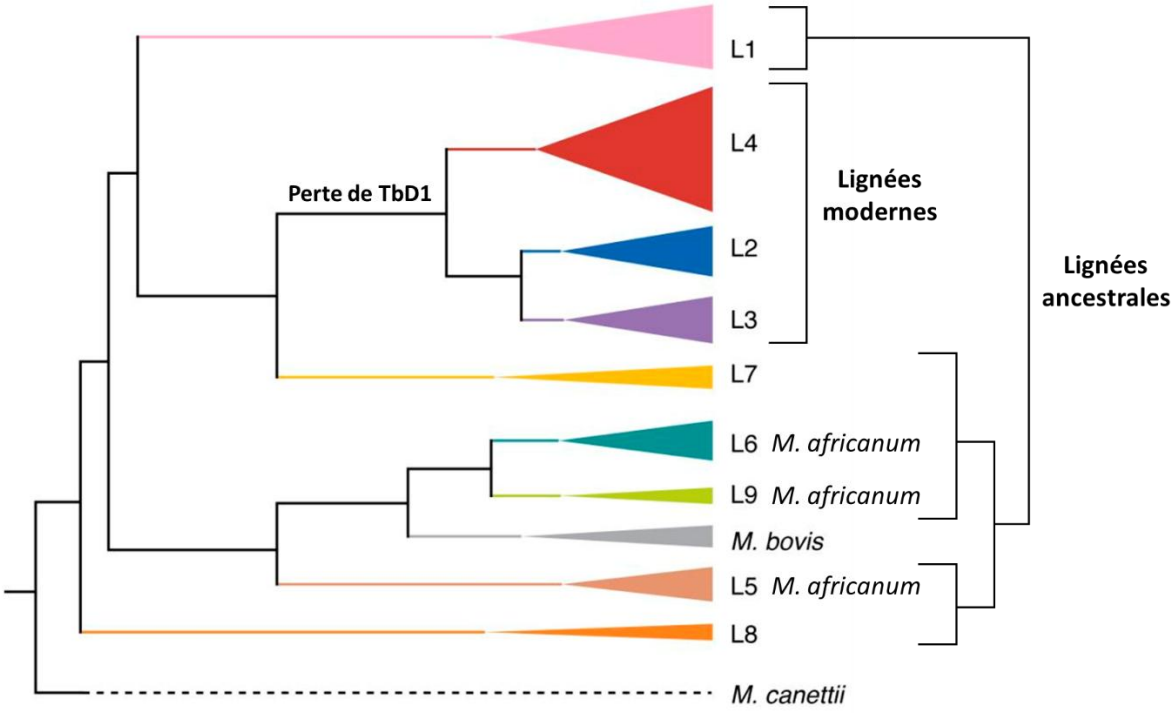


Figure 6 : Phylogénie des lignées de *M. tb*.
Phylogénie simplifiée par maximum de vraisemblance des 9 lignées de *M. tb*, ainsi que de la souche apparentée *M. bovis*. *M. canettii* est utilisé comme racine. Adapté de Koleske et al. [48].

L'identification de régions de délétion dans les souches du MTBC par Brosch et al. a permis de mettre en évidence la « *Mycobacterium tuberculosis* délétion spécifique 1 » (TbD1), qui est absente chez 87% des souches qu'ils ont séquencés. La perte de cette région est associée à des polymorphismes mono-nucléotidiques, apparus tardivement dans l'évolution. Ainsi, les souches de *M. tb* possédant le locus TbD1 appartiennent aux « lignées ancestrales » et les souches ayant perdu le locus TbD1 font partie des « lignées modernes » (**Figure 6**) [42].

Au total, le MTBC est sous-divisé en 9 lignées (L1 à L9) (**Figure 6**). Les lignées 1, 7 et 8 appartiennent aux lignées ancestrales, tout comme les lignées 5, 6 et 9, qui contiennent des souches de *Mycobacterium africanum*, la deuxième espèce retrouvée chez les patients tuberculeux, après *M. tb*. En revanche, les lignées 2, 3, et 4 font partie des lignées modernes. Ces lignées présentent une distribution géographique et épidémiologique

distincte (**Figure 7**), reflétant en partie l'adaptation évolutive de ces bactéries à des populations humaines spécifiques [49].

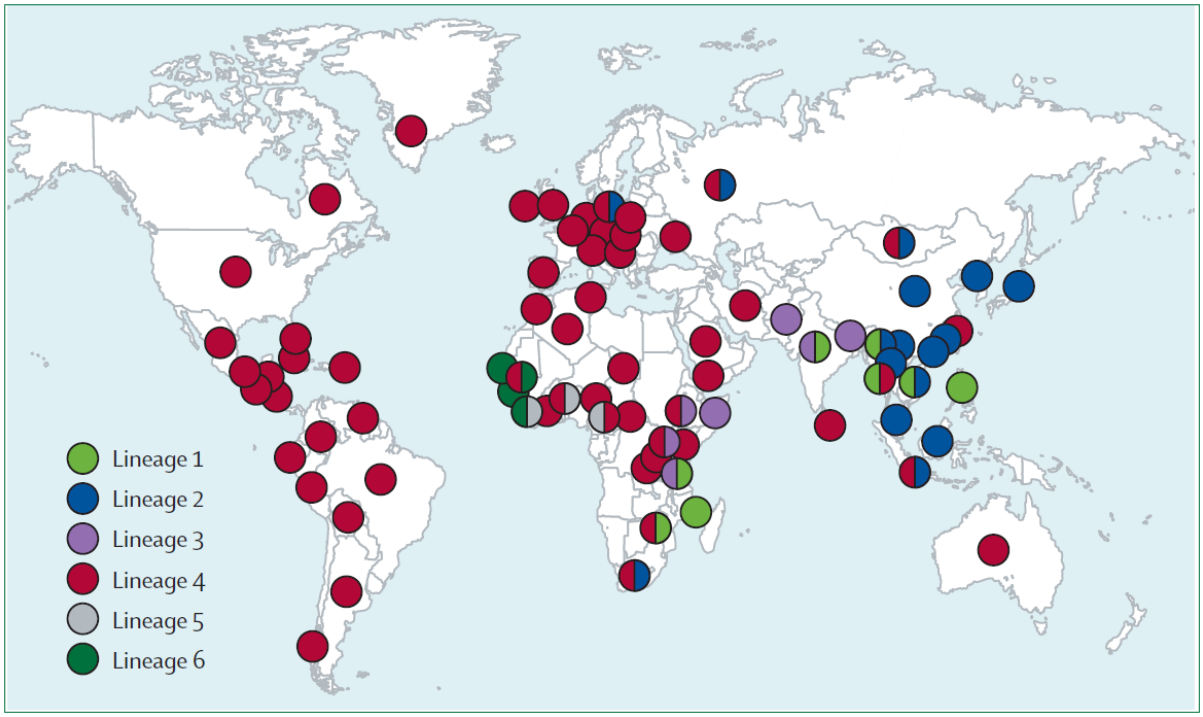


Figure 7 : Phylo-géographie globale de *M. tb* [50].

Les lignées ancestrales 1 (Indo-Océanique, ex : souche EAI) et 7 (Ethiopie), plus récemment décrite, sont restreintes à certaines régions de l'Afrique de l'Est et à l'Asie du Sud-Est. Les lignées 5 et 6 et la lignée 9 sont confinées à l'Afrique de l'Ouest et de l'Est respectivement. La lignée 8 est confinée à la région des Grands Lacs africains. Récemment décrite, une nouvelle lignée a été proposée, la L10, qui est retrouvée en Afrique centrale. Chez les lignées modernes, géographiquement plus dispersées, la lignée 2 (Asie de l'Est, ex : souche Beijing) est largement répandue en Asie de l'Est. La lignée 4 (Euro-Américaine, ex : souches LAM et Haarlem), la plus dispersée mondialement, est prédominante en Europe, en Afrique de l'Ouest et dans les Amériques. La lignée 3 (Afrique de l'Est et Inde, ex : souche CAS/Dehli) est retrouvée dans l'Afrique de l'Est et l'Asie du Sud-Est [50–55].

c. Locus TbD1

Les lignées modernes et ancestrales sont différenciées par l'absence ou la présence du locus génétique TbD1. Le locus TbD1, pour « *M. tb specific deletion 1* », correspond à un fragment de 2 153 paires de bases (pb), qui a été perdu au cours de l'évolution chez les

lignées modernes, mais reste présente chez les lignées ancestrales (**Figure 8**). Cette délétion englobe la quasi-totalité du gène *mmpS6*, ainsi qu'une partie du gène *mmpL6* (*rv1557*), qui se retrouve tronqué chez les lignées modernes [42]. Puisque le gène *mmpS6* n'est pas présent chez la souche de référence *M. tb* H37Rv, il ne possède pas de numéro d'annotation Rv. MmpS6 est une protéine accessoire dont le rôle n'est pas caractérisé, tandis que MmpL6 appartient à la famille des transporteurs MmpL (*Mycobacterial membrane protein large*), connus pour leur rôle de pompes d'efflux. Ces deux gènes ne sont pas indispensables pour la croissance *in vitro* de *M. tb* dans des conditions de culture standards, mais leur présence peut conférer des avantages adaptatifs (par exemple vis-à-vis du stress oxydant ou de l'hypoxie) [51]

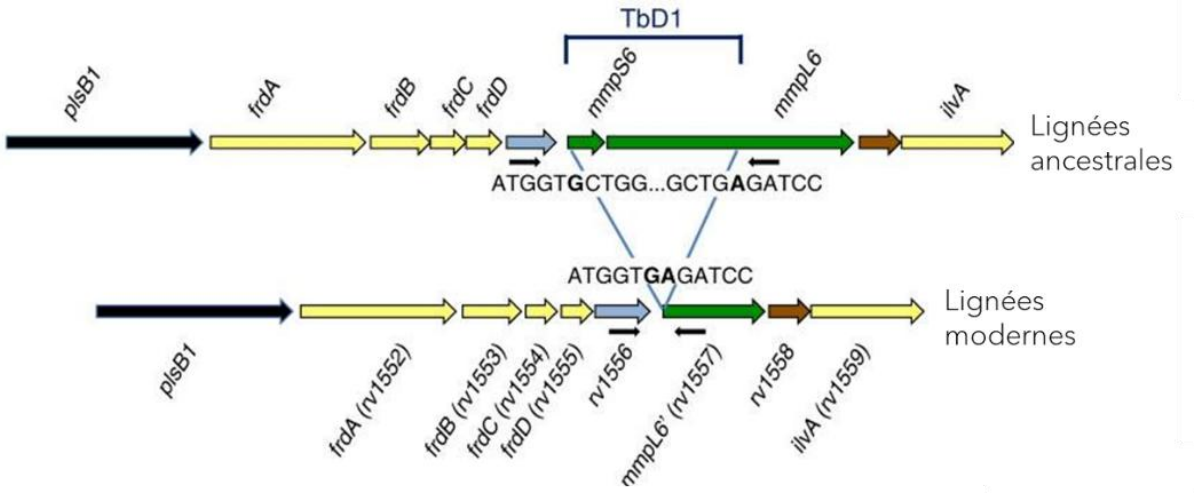


Figure 8 : Représentation du locus TbD1 et des gènes adjacents dans les souches *M. tb* de lignées ancestrales et modernes [51].

Une étude génomique portant sur environ 80% des facteurs de transcription identifiés chez *M. tb* a montré que le régulateur TetR (*Tetracyclin Repressor*) Rv1556 agirait comme régulateur du locus TbD1. Grâce à la méthode de ChIP-seq (*Chromatine Immunoprecipitation sequencing*), les auteurs ont identifié un motif d'ADN reconnu par ce facteur de transcription, localisé dans la région promotrice de *mmpS6/L6* et *rv1556*. De plus, la surexpression de Rv1556 entraîne une répression de *mmpL6*, avec un $\log_2$ fold-change ($\log_2$FC) de -0.53 [56]. Il a également été montré que Rv1556 exerce une régulation négative sur sa propre expression [57].

Des analyses de séquençage suggèrent que *mmpl6* pourrait être transcrit dans la même unité transcriptionnelle que les gènes *rv1558-rv1561* [57]. Ces gènes codent respectivement pour une protéine non caractérisée, la thréonine désaminase IlvA, l'antitoxine VapB11 et

sa toxine associée VapC11 [58]. Cependant, ils possèdent également des promoteurs indépendants [57] et leur expression n'est pas affectée par la surexpression de Rv1556 [56].

d. Protéines MmpL

Les protéines MmpL appartiennent à la famille des transporteurs RND (*Resistance-Nodulation-cell Division*). On en dénombre treize chez *Mycobacterium tuberculosis*. Ces protéines, localisées dans la membrane plasmique, assurent le transport de divers substrats depuis le cytoplasme vers l'espace périplasmique, en utilisant la force proton-motrice [59,60].

Les MmpL sont relativement conservées au sein du MTBC ainsi que chez les bactéries non tuberculeuses [61,62]. Leur organisation structurale est globalement constituée de onze à douze domaines transmembranaires et de deux boucles périplasmiques (**Figure 9**). Certaines protéines présentent des particularités lié au processus évolutif. Ainsi, MmpL6 est retrouvée sous une forme tronquée chez les lignées modernes (**Figure 10**), avec cinq domaines transmembranaires, et MmpL13 est codée en deux parties distinctes, contenant quatre et sept domaines transmembranaires. Par ailleurs, certaines protéines comme MmpL1, 2, 4 et 5 sont associées à des protéines MmpS (*Mycobacterial membrane protein smalll*), qui se retrouvent dans la partie périplasmique, et faciliteraient l'export du substrat de MmpL [59,62]. Chez les lignées ancestrales, la protéine MmpL6 sous sa forme entière (**Figure 10**) est également accompagnée de la protéine MmpS6 [51].

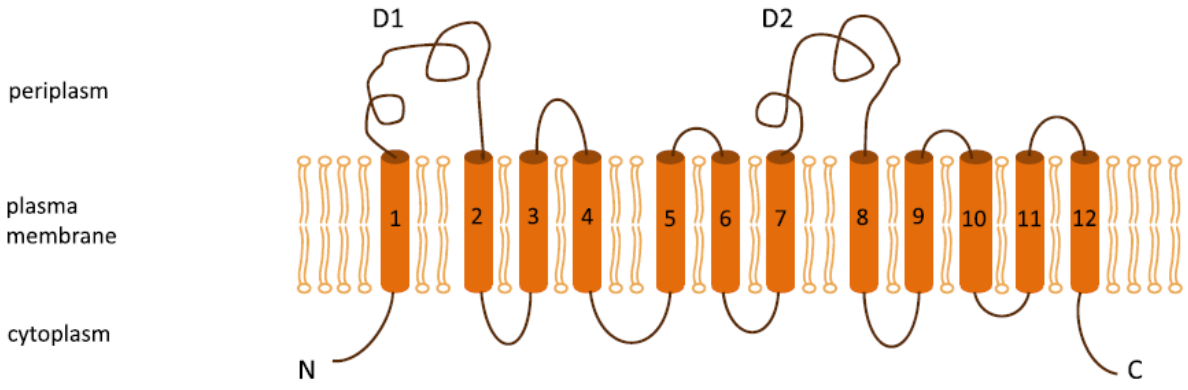


Figure 9 : Représentation schématique de l'organisation des protéines MmpL [60].

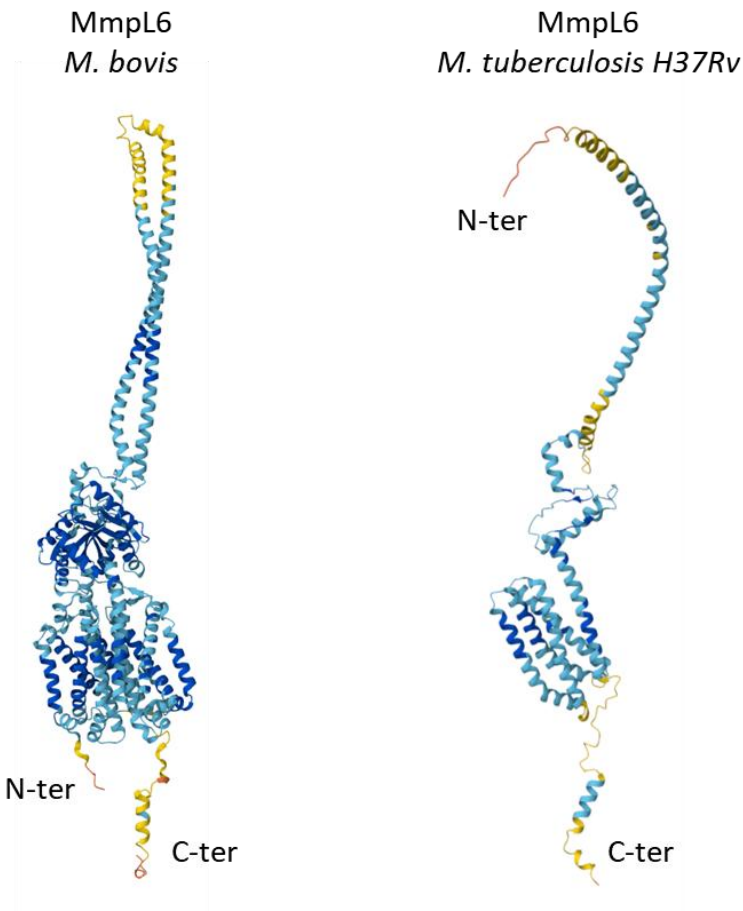


Figure 10 : Structure prédite de la protéine MmpL6 entière et tronquée.
La structure tridimensionnelle de MmpL6 sous sa forme entière (gauche) et tronquée (droite) a été prédite à l'aide d'AlphaFold, à partir des séquences de *M. bovis* (n° accession : A0A0H3M480) et *M. tb* H37Rv (n° accession : P9WJU9), respectivement. Les couleurs indiquent le score pLDDT, reflet du niveau de confiance de la prédiction : en bleu, les régions à forte confiance (pLDDT élevé), et en jaune, les régions à faible confiance (pLDDT bas).

La plupart des protéines MmpL sont impliquées dans le transport des lipides à travers la membrane plasmique. Ce rôle est essentiel pour l'intégrité et la perméabilité de la paroi mycobactérienne, et seule MmpL3 est considérée comme indispensable à la viabilité bactérienne [59]. En exportant des acides gras et des lipides, les MmpL participent également à la virulence de *M. tb*. En effet, plusieurs substrats transportés par ces protéines influencent la survie intracellulaire, la formation de granulomes et la modulation de la réponse immunitaire de l'hôte [59,61].

Divers substrats ont été attribuées à certaines MmpL. MmpL3 exporte notamment les mono- et dimycolate de tréhalose, les acides mycoliques et participe également à l'import de l'hème. MmpL4 et 5 assurent l'export des sidérophores essentiels l'acquisition du fer, et MmpL5 intervient aussi dans l'efflux d'antibiotiques, dont la bédaquiline et la clofazimine. MmpL7 transporte le polykétide phtiocerol dimycocerosate. MmpL8 assure

le tranfert du sulfolipide-1 vers l'enveloppe et MmpL10 est impliquée dans l'export des di- et poly-acyl-thréaloses. Enfin, MmpL11 transporte des lipides de stockages, tels que le monomycolyl-diacylglycérol et le triacylglycérol, ainsi que la cire d'esters de mycolates et est également impliquée dans l'import de l'hème. Toutefois, aucun substrat n'a encore été identifié pour MmpL1, 2, 6, 9 et 12 [59,60,62].

La régulation des protéines MmpL implique plusieurs facteurs transcriptionnels capables de contrôler l'expression de différentes MmpL. Parmi eux, trois appartiennent à la famille TetR (Rv3249c, Rv1816 et Rv0302) et un à la famille MarR (*Multiple antibiotic resistance Regulator*) (Rv0678). Ces régulateurs sont sensibles à la présence des acides gras, auxquels ils se lient, ce qui permet d'ajuster l'expression des MmpL en fonction des conditions environnementales et métaboliques [59,62–64]. L'expression de MmpL6 serait quant à elle régulée par le régulateur TetR Rv1556 [56], pour lequel aucun ligand n'est identifié.

e. Régulateurs transcriptionnels TetR

La plupart des régulateurs de la famille TetR exercent une fonction de répresseur transcriptionnel, en se fixant à leur promoteur cible grâce à un motif hélice-tour-hélice (HTH) conservé, situé à l'extrémité N-terminale (**Figure 11**). La fixation d'un ligand dans la poche de liaison localisée au niveau C-terminal induit un changement conformationnel, qui empêche la fixation du répresseur à l'ADN. Les régulateurs TetR fonctionnent généralement sous forme de dimères se liant à des séquences palindromiques de l'ADN, bien que certains puissent agir seuls ou par association de deux dimères. Cette famille de régulateurs est très répandue chez les bactéries. Ils interviennent dans la régulation de nombreuses fonctions, notamment le métabolisme du carbone et de l'azote, la régulation des pompes d'efflux, la réponse au stress et la communication intercellulaire [65].

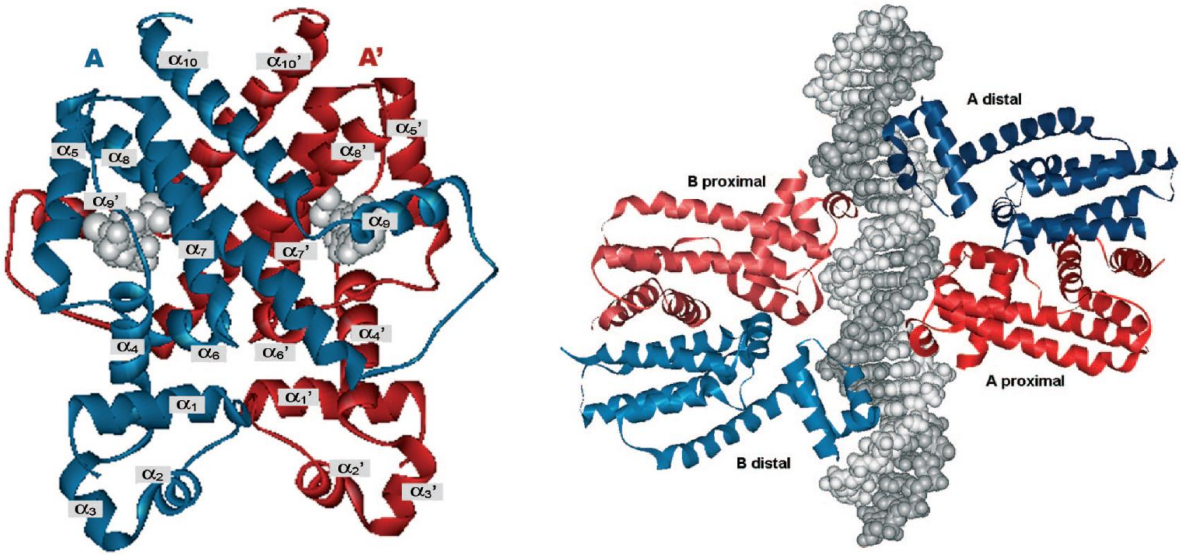


Figure 11 : Représentation structurale de deux membres de la famille TetR [65].
TetR sous forme homodimérique, en présence de son ligand, la tetracycline (gauche). Deux homodimères du régulateur QacR se lient à l'ADN (droite).

Chez les mycobactéries, les TetR constituent la famille de régulateurs transcriptionnels la plus abondante, bien que la majorité d'entre eux reste peu caractérisés. Parmi eux, Rv1556 est présent chez toutes les espèces pathogènes, à l'exception de *M. leprae*. Chez *M. tb*, ils participent principalement au contrôle du métabolisme du carbone et des acides aminés, ainsi qu'à la régulation des pompes d'efflux. Les séquences C-terminales de TetR identifiées chez *M. tb* présentent une similarité inférieure à 10%, bien qu'elles partagent une structure commune, suggérant que les TetR répondent à des ligands différents. A l'inverse, la région N-terminale est plus conservée, avec en moyenne 27% d'identité, constituant un motif hélice-tour-hélice médiant la fixation de ces protéines sur leur promoteur cible [66].

2. Physiopathologie

Après qu'un individu a inhalé les gouttelettes aérosolisées contenant *M. tb* (section I.A.2.), les bacilles traversent les voies respiratoires jusqu'à atteindre les alvéoles pulmonaires.

Plusieurs études montrent que la taille des gouttelettes inhalées influence significativement le devenir de l'infection. En effet, les gouttelettes supérieures à 5 µm ont tendance à se déposer dans les voies respiratoires supérieures, où elles induisent une réponse immunitaire locale, sans toutefois permettre l'établissement d'une infection [18,23]. En revanche, les gouttelettes inférieures à 5 µm peuvent pénétrer plus profondément

dans les voies respiratoires, franchissant des barrières physiques telles que les cellules bronchiales ciliées et le mucus, avant d'atteindre les alvéoles pulmonaires, site privilégié d'infection [18,67].

Ainsi, parmi les individus exposés à *M. tb*, environ 25% à 50% développeront une infection véritable (**Figure 12**), illustrant l'importance des facteurs aérodynamiques et immunologiques dans le contrôle initial de l'infection [25,67,68].

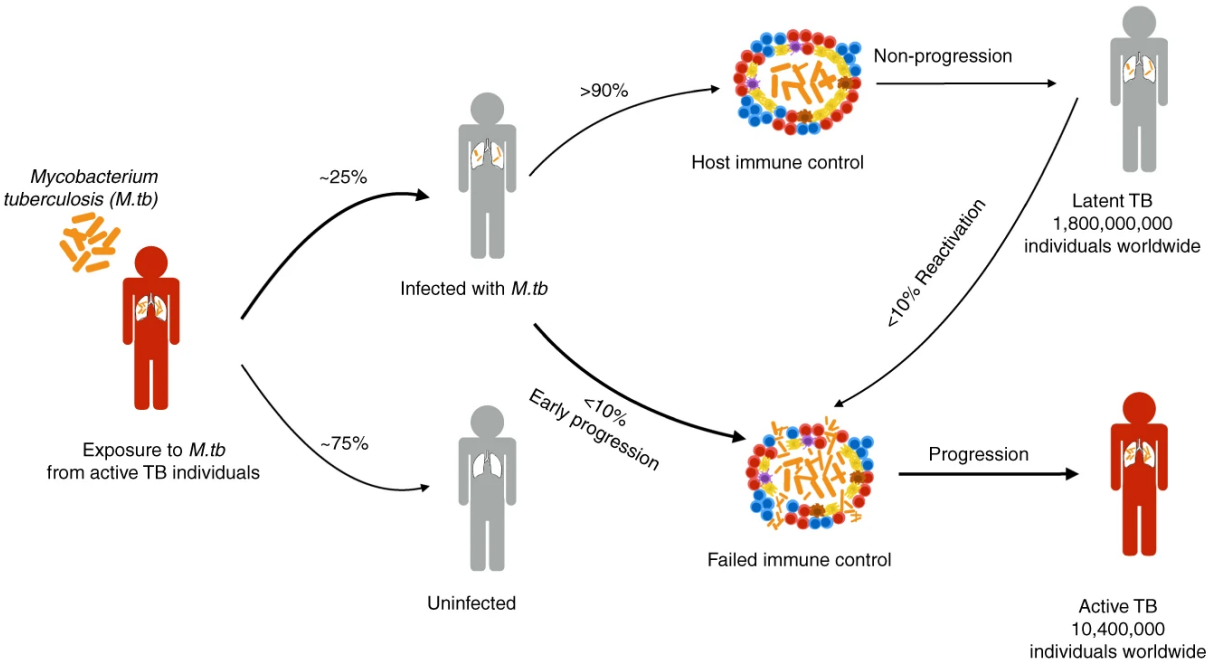


Figure 12 : Phases d'infection par *Mycobacterium tuberculosis* [68].

a. Tuberculose latente

Dès son arrivée dans les alvéoles pulmonaires, *Mycobacterium tuberculosis* entre en contact avec les cellules épithéliales alvéolaires, qui jouent un rôle actif dans la détection précoce de l'infection et le recrutement de cellules immunitaires [69]. Les macrophages alvéolaires constituent la première ligne de défense capable d'éliminer le pathogène, principalement par phagocytose, un processus impliquant plusieurs récepteurs spécifiques présents à leur surface [70]. Cependant, *M. tb* déploie diverses stratégies pour échapper à cette élimination. Le bacille peut notamment inhiber la fusion du phagosome avec le lysosome, empêchant ainsi l'acidification nécessaire à la destruction bactérienne, ce qui lui permet de survivre à l'intérieur du macrophage [71]. De plus, la bactérie est capable de rompre la membrane du phagosome, pour accéder au cytosol, où elle peut se multiplier et induire la mort du macrophage [72,73].

Lorsque les macrophages ne parviennent pas à contenir l'infection, les bacilles échappés ou les macrophages alvéolaires infectés migrent vers l'interstice des poumons, puis vers le parenchyme [69,74]. Par le biais de signaux inflammatoires et de recrutement, d'autres cellules de l'immunité innée, telles que les cellules dendritiques, les monocytes et les macrophages interstitiels, sont attirées sur le site. Ces cellules phagocytent également les bacilles et les transportent au niveau des ganglions lymphatiques pulmonaires, où l'immunité adaptative est activée. Les lymphocytes T et B sont alors recrutés dans le parenchyme et se regroupent autour des phagocytes infectés, pour former une structure multi-cellulaire appelée granulome (**Figure 13**) [69,70,75].

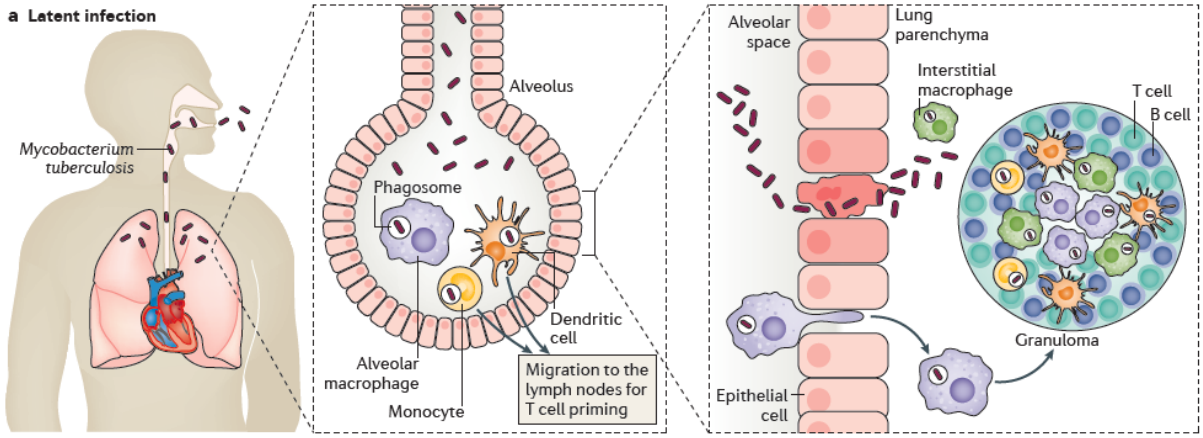


Figure 13 : Progression de *Mycobacterium tuberculosis* dans les voies aériennes jusqu'à la formation d'un granulome [70].

D'un point de vue médical, ce granulome formé lors de la primo-infection est désigné sous le nom de foyer de Ghon. Lorsqu'il est associé à une infection des ganglions lymphatiques médiastinaux ou hilaires, on parle alors de complexe de Ghon (**Figure 14**) [76].



Figure 14 : Radiographie pulmonaire mettant en évidence un complexe de Ghon [76].

Les granulomes sont des structures très organisées (**Figure 13**), dont le rôle principal est de contenir l'infection. Au centre du granulome se trouvent les macrophages infectés par *M. tb*. Autour d'eux, d'autres macrophages accumulent des corps lipidiques dans leur

cytosol et se transforment en macrophages « spumeux » (*foamy macrophages*), caractéristiques des lésions tuberculeuses. Les bactéries exploitent ces macrophages spumeux comme source de lipides pour leur métabolisme [77]. Certains macrophages subissent une « différentiation épithélioïde », s'agrègent et forment de larges cellules multinucléées (cellule de Langhans), qui constituent la base structurale du granulome. Lorsque des macrophages sont détruits par les bacilles, ils forment une zone centrale de nécrose, le plus souvent caséeuse du fait de leur forte teneur en lipide. Toutefois, le centre du granulome peut aussi rester non-nécrotique, avec des bacilles intracellulaires. Autour de ce noyau macrophagique, de nombreuses cellules de l'immunité innée et adaptative sont recrutées pour confiner et contrôler l'infection : notamment les neutrophiles, cellules dendritiques, éosinophiles, cellules NK, lymphocytes T et B [69,70,75].

L'environnement confiné dans lequel se trouve *Mycobacterium tuberculosis* au sein du granulome est défavorable à la croissance du bacille : accès limité aux nutriments, pH acide, faible teneur en oxygène. Pour survivre à ces multiples stress, la bactérie adopte notamment une stratégie de ralentissement métabolique et d'arrêt de sa réplication [78].

Dans le cas d'une infection tuberculose latente (LTBI), le granulome reste stable et bien organisé, empêchant la dissémination bactérienne. Les bacilles se maintiennent dans un état non-réplicatif, tandis que la réponse inflammatoire reste maitrisée, limitant ainsi les lésions tissulaires et les symptômes cliniques. L'infection peut rester sous cette forme pendant des mois, voire des années [79]. Il est estimé qu'environ un quart de la population mondiale serait porteur d'une LTBI [80].

Au fil du temps, le granulome peut soit demeurer actif sur le plan cellulaire, soit évoluer vers une cicatrisation, caractérisée d'abord par une fibrose puis une calcification. Plus de 90% des personnes infectées par *M. tb* présentent cette forme latente de la maladie [70,81].

b. Tuberculose active

Après l'infection par *M. tb*, moins de 10% des individus développent directement une forme active de la maladie (**Figure 12**). La tuberculose active peut également survenir ultérieurement chez un individu porteur d'une LTBI, soit à la suite d'un affaiblissement du système immunitaire qui ne parvient plus à contenir l'infection, soit après une nouvelle

exposition au bacille. Dans la pratique, il est souvent difficile de distinguer une réactivation endogène d'une réinfection exogène, même par analyses génomiques [70,78,82].

Toutefois, certains facteurs connus augmentent le risque d'évolution vers une TB active, notamment une infection par le VIH [83], un changement dans le taux de TNF dû à une thérapie [84], ces deux premiers exemples résultant en une altération du système immunitaire, ou des prédispositions génétiques individuelles [68,85].

Lorsque la tuberculose devient active, cela signifie que *M. tb* a réussi à se répliquer à l'intérieur des macrophages du granulome (**Figure 15**). Les bactéries rompent alors l'environnement confiné dans lequel elles étaient contenues, et se disséminent dans le poumon [81]. De multiples granulomes se forment autour de ces bacilles disséminés. Ces granulomes sont souvent nécrotiques et caséeux, conséquence de la destruction cellulaire provoquée par les bacilles. Avec le temps, le caséum peut se liquéfier et évoluer vers la formation de cavités dans le tissu pulmonaire (**Figure 16**), lesquelles contiennent une grande quantité de bacilles libres [75]. Par ailleurs, les cellules immunitaires déclenchent une réaction inflammatoire aiguë, visant à éliminer *M. tb*, ce qui entraîne une altération du tissu et favorise également la formation de cavités pulmonaire. Dans cet environnement, *M. tb* est moins accessible aux cellules immunitaires ainsi qu'aux antibiotiques et bénéficie d'une concentration élevée en oxygène, favorable à sa survie et multiplication [86].

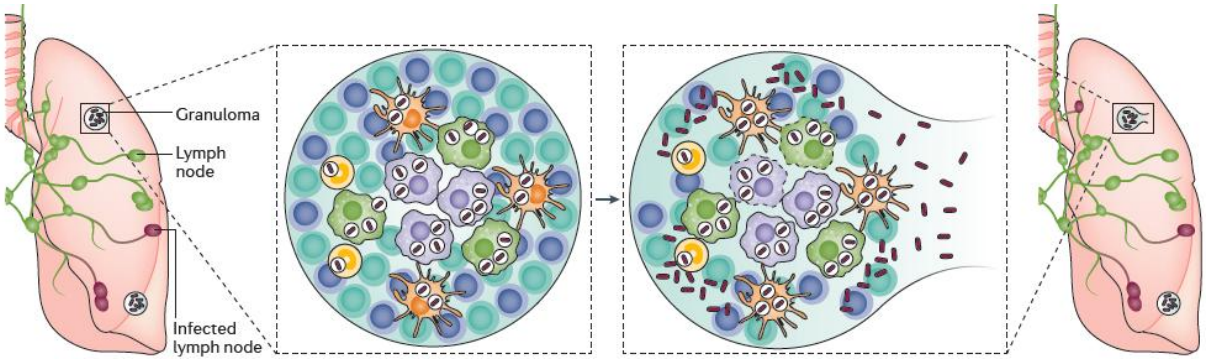


Figure 15 : Dissémination de *M. tb* et progression vers une tuberculosis active [70].

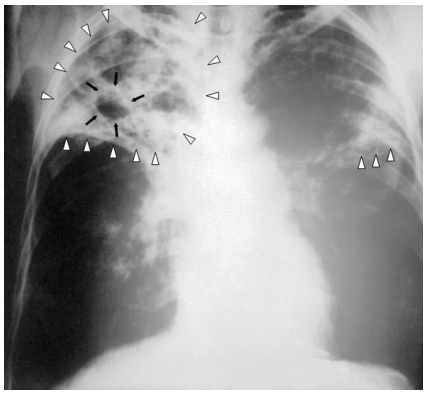


Figure 16 : Radiographie d'un patient présentant une tuberculose pulmonaire bilatérale.
La radiographie révèle la présence d'un infiltrat pulmonaire bilatéral (triangles blancs) et de cavités flèches noires) dans la région apicale droite [76].

À partir de ce stade, l'individu devient contagieux, sa toux libérant des aérosols chargés en bacilles. Les symptômes vont également se manifester, le plus évident étant la toux chronique, qui peut évoluer en hémoptysie, une altération de l'état général, fièvre, perte de poids et sueurs nocturnes [2]. La plupart des symptômes résultent de la réponse immunitaire de l'hôte contre le bacille [25].

c. Tuberculose disséminée et extra-pulmonaire

Bien que la tuberculose pulmonaire soit la forme la plus fréquente et connue, 15 à 20% des cas de tuberculose active se manifestent sous forme extra-pulmonaire (EPTB) [87]. Après la rupture des granulomes pulmonaires, *M. tb* se dissémine dans différents organes par le système lymphatique ou sanguin [88]. Dans les tissus contaminés, *M. tb* infecte les macrophages résidents et induit la formation locale de granulomes, similaires à ceux observés dans le poumon. Les granulomes ont également pour rôle de contenir l'infection mais leur présence induit une inflammation chronique qui peut entraîner des lésions tissulaires, fonctionnelles et parfois cicatricielles.

La tuberculose extra-pulmonaire peut toucher divers organes, et la manifestation clinique dépendra de la localisation [87,89,90]:

- La tuberculose ganglionnaire (lymphadénie ou *Scrofula*) est la forme la plus courante des tuberculoses extra-pulmonaires, représentant 35 à 40%, et est non létale la plupart du temps. Elle est caractérisée par une adénopathie (hypertrophie des ganglions lymphatiques).

- La tuberculose ostéo-articulaire constitue 10 à 15 % des formes EPTB et touche le plus couramment la colonne vertébrale (maladie de Pott) (**Figure 17**). Elle provoque des douleurs, déformations, et parfois une compression neurologique.
- La tuberculose uro-génitale représente jusqu'à 20% des formes extra-pulmonaires. Les bacilles vont d'abord infecter les reins, puis migrent pour infecter le reste du tractus urinaire (vessie, uretères) (**Figure 17**). Cliniquement, cette forme se traduit par une dysfonction rénale et des symptômes urinaires chroniques (douleurs lombaires, hématurie, dysurie).
- La tuberculose méningée est la forme la plus sévère des EPTB (**Figure 17**). Elle est retrouvée chez 5 à 10% des patients, et peut monter jusqu'à 20% en cas d'association avec le VIH. L'inflammation des méninges va entrainer divers symptômes allant des maux de tête jusqu'à une confusion ou changement de la personnalité.
- De nombreuses autres localisations de tuberculose peuvent également être retrouvées : pleurale, oculaire, cutanée, digestive, orale, péricardique, péritonéale, etc.

Lorsque la dissémination est massive, on parle de tuberculose miliaire ou disséminée. Les bactéries passant par la voie hématogène vont infecter à nouveau les poumons. Cette forme est caractérisée par des granulomes très nombreux, peu organisés et de petite taille, et ressemblent à des grains de millet (**Figure 17**). Elle est associée à une infection de multiples sites extra-pulmonaires.

Globalement, quel que soit le site d'infection de *M. tb*, les patients atteint de tuberculose active présenteront des symptômes caractéristiques : altération de l'état général (asthénie, anorexie, perte de poids), fièvre et sueurs nocturnes [87,89,90].

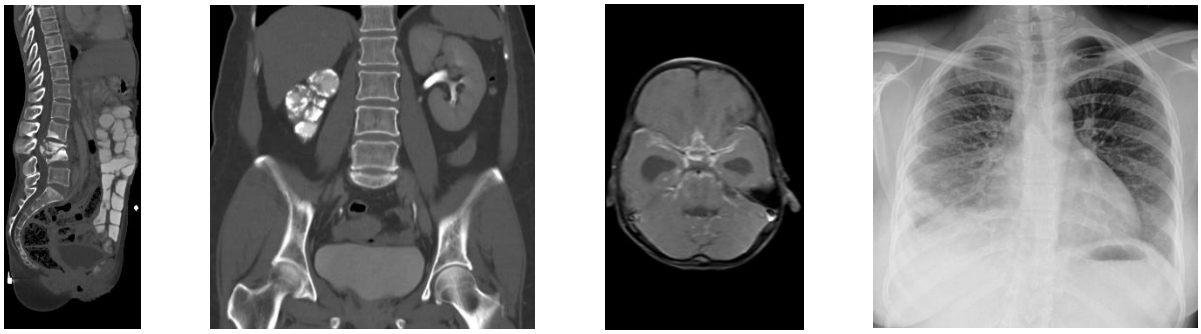


Figure 17 : Imageries de patients atteints de différentes formes de tuberculose extra-pulmonaire.

De gauche à droite : tuberculose ostéo-articulaire au niveau de la colonne vertébrale, tuberculose uro-génitale avec une atteinte au niveau rénal, tuberculose méningée et tuberculose miliaire [91].

d. Interaction hôte-pathogène

M. tb déploie une série de stratégies pour échapper aux défenses de l'hôte et instaurer un environnement favorable à sa survie. Lorsqu'il est phagocyté par les macrophages, le bacille inhibe la formation du phagolysosome [71], perce la membrane du phagosome et déclenche la mort du macrophage [72,73]. Par ailleurs, il retarde la présentation antigénique aux lymphocytes T, ralentissant ainsi l'immunité adaptative, et module l'activation de l'inflammasome pour limiter la libération de cytokines pro-inflammatoires [92].

Un des mécanismes utilisés par les cellules immunitaires pour éliminer les pathogènes est la production d'espèces réactives de l'oxygènes (ROS) ou du nitrogène (RNS). Pour faire face à ces stress oxydatif et nitrosatif, *M. tb* produit des enzymes détoxifiantes, telles que la catalase et les superoxydes dismutases [93]. Sa paroi cellulaire riche en mycolates en association avec des systèmes de régulation spécifiques à ces stress, la protège du pH acide rencontré dans le phagolysosome [94]. Enfin, à l'intérieur du granulome, un environnement hypoxique et appauvri en nutriments induit chez *M. tb* des changements en faveur d'un métabolisme anaérobie. Au lieu d'utiliser des sucres (glucose), la bactérie va utiliser des lipides (cholestérol, acides gras) comme principales sources de carbone [95,96]. Ce changement de métabolisme s'accompagne d'un ralentissement, voire arrêt de la réplication, grâce à l'activation d'un ensemble de gènes du « régulon de dormance ». Cet état, appelé dormance ou état non-réplicatif, permet à la bactérie de survivre en conditions hostiles [97].

C. Dépistage et diagnostic

Plusieurs outils fondés sur des approches complémentaires (imagerie médicale, microscopie, culture, tests moléculaires) permettent de détecter la tuberculose. Le choix du ou des examens dépend de la forme clinique suspectée : tuberculose pulmonaire ou extra-pulmonaire, forme active ou latente, ainsi que des ressources et des infrastructures disponibles dans le système de santé chaque pays [28,70,90,98].

1. Diagnostic par imagerie

L'imagerie permet de visualiser directement ce qu'il se passe dans les organes (les poumons, le plus souvent), en décelant des lésions spécifiques de la tuberculose (infiltrats, complexe de Ghon, cavités, adénopathies). Elle fournit généralement un résultat le jour même, mais ne suffit pas, à elle seule, pour confirmer le diagnostic, qui repose sur la microbiologie.

L'imagerie par rayons-X ou radiographie thoracique est l'examen de diagnostic de base, car il est relativement facile à effectuer et peu coûteux [99]. Le scanner est plus sensible que la radiologie pour détecter les lésions précoces, et notamment détecter la tuberculose miliaire, mais il est plus coûteux et moins disponible [100]. Cependant, l'imagerie ne permet pas d'observer la LTBI, dans laquelle les granulomes sont trop petits. Elle peut montrer des séquelles de tuberculose ancienne, avec la mise en évidence de calcifications ou fibroses. Selon la localisation suspectée, l'échographie (pleurale, abdominale) ou l'imagerie par résonnance magnétique (IRM) (méningée) peuvent compléter l'évaluation.

2. Diagnostic microbiologique

Les techniques de microbiologie s'appliquent à de nombreux types d'échantillons cliniques (expectorations, lavage broncho-alvéolaire, liquide céphalo-rachidien). L'objectif est de détecter directement *M. tb*, pour confirmer ou non sa présence. Ces techniques ne sont pas efficaces pour diagnostiquer une LTBI, car les bacilles ne seront pas présents dans les prélèvements, ou en trop faible quantité.

La microscopie après coloration Ziehl-Neelsen ou auramine O permet de visualiser les mycobactéries. Ces techniques sont simples, peu coûteuses, largement utilisées dans les pays à ressources limitées, mais restent peu sensibles (charge bactérienne > 10^4 CFU/mL), en particulier chez les patients infectés par le VIH ou sans cavitations. L'usage de l'auramine et des microscopes à LED a permis d'améliorer la sensibilité [37,101].

La culture demeure la technique de référence, sur milieu solide (Löwenstein Jensen, Middlebrook 7H11) et milieu liquide (Middlebrook 7H9, *Mycobacteria Growth Indicator tube* [MGIT]). Elle détecte de faibles charges bacillaires. Après décontamination et concentration, il est recommandé d'inoculer les deux types de milieux en parallèle. À cause de la réplication lente de *M. tb*, le délai de positivité est d'environ 1 à 3 semaines en

milieu liquide et 3 à 8 semaines en milieu solide. En outre, les cultures négatives sont conservées plusieurs mois pour s'assurer du résultat. Les milieux solides permettent une visualisation de la morphologie et la détection de contaminants, ainsi qu'une estimation de la quantité. Les milieux liquides commerciaux automatisés (MGIT) offrent une utilisation plus facile et rapide (signal de consommation d'oxygène) [102]. Cependant, des sous-populations de *M. tb* ne sont pas capables de se répliquer dans ces milieux, ce qui peut induire une sous-estimation de la charge bactérienne [103,104]. Ces techniques permettent de détecter des résistances aux antibiotiques, notamment avec des systèmes de culture en milieu liquide réalisés en plaque multi-puits [105]. Ces procédures nécessitent des laboratoires de haut niveau de sécurité biologique (NSB-3). Il est possible de récupérer les cultures pour effectuer d'autres tests (identification de la souche, résistance aux antibiotiques).

La détection urinaire d'antigènes bactérien, plus précisément du lipoarabinomanne (LAM, composant de la paroi), est particulièrement utile pour les personnes co-infectées avec le VIH ou incapables d'expectorer [106]. C'est un test rapide, qui peut détecter différentes formes de TB.

Les tests d'amplification des acides nucléiques (NAAT) accélèrent le diagnostic car ils peuvent être réalisés avant d'obtenir des culture positives. Le test Xpert MTB/RIF (Ultra) est basé sur une amplification en temps réel de l'ARN bactérien par RT-qPCR (Réaction en chaîne par Polymérase quantitative après transcription inverse) [28]. Il détecte *M. tb* et la résistance à la rifampicine, avec une bonne sensibilité et spécificité, y compris sur des échantillons extra-pulmonaires [107]. Le test LPA (Li*ne Probe Assays*, basé sur la PCR) détecte les mutations les plus connues sur les gènes associés à l'antibiorésistance, mais requiert une charge bacillaire suffisante [108]. De façon générale, les NAAT ne distinguent pas les bactéries mortes ou vivantes, sont coûteux, nécessitent un matériel spécifique et doivent être interprétés avec le contexte clinique (pour une faible suspicion d'infection, une confirmation par culture/microscopie est recommandé). Cependant, ils permettent de différencier les souches du MTBC et communiquent des informations sur l'antibiorésistance.

Le séquençage du génome entier renseigne sur l'épidémiologie des souches de *M. tb*, ainsi que l'identification des mutations de résistances aux antibiotiques [109]. C'est une approche coûteuse qui nécessite beaucoup de matériel génomique, souvent obtenu après

culture. À l'inverse, le Deeplex® Myc-TB, est un séquençage ciblé d'un panel de gènes de résistance et détecte les mutations rares/minoritaires, pouvant être réalisé directement sur l'échantillon (selon la charge bacillaire) [110].

3. Diagnostic immunologique

Ces techniques reposent sur la détection de la réponse immunitaire adaptative, consécutive à l'infection par *M. tb*. Un résultat positif traduit une présence de lymphocytes T mémoires spécifiques, mais ne distingue pas une tuberculose latente d'une tuberculose active [70].

Le test cutané à la tuberculine (TST, *tuberculin skin test*/test de Mantoux) consiste en l'injection d'antigènes de *M. tb* (PPD, *purified protein derivative*) en intradermique. Après 48 à 72h, l'observation d'une induration au site de l'injection signifie un contact antérieur avec *M. tb*. Cependant, la vaccination par le bacille de Calmette-Guérin (BCG) ou une exposition à des mycobactéries environnementales peuvent interférer et conduire à des faux-positifs [78]. Également, il n'est pas recommandé chez les patients immunodéprimés ou si la tuberculose est très récente, auxquels cas le test donnera un faux-négatif.

Les tests de libération de l'interféron-gamma (IGRA), mesurent l'IFN-γ produit par les lymphocytes T du patient, après stimulation par des antigènes spécifiques de *M. tb* (ESAT-6 et CFP-10) absents du BCG. Le QuantiFERON-TB Gold Plus dose l'IFN-γ sécrété à l'issu de la stimulation, alors que l'ELISPOT quantifie le nombre de cellules sécrétrices d'IFN-γ. Le résultat de ces tests n'est pas affecté par la vaccination au BCG, mais reste sensible à l'état immunitaire du patient [111]. Ces tests sont coûteux et peu disponibles dans les pays à faible revenus.

Le diagnostic est une étape clé pour réduire l'incidence et la mortalité de la tuberculose. Un dépistage rapide limite la transmission et permet d'adapter le traitement, en particulier face aux souches résistantes aux antibiotiques. Dans cette optique, l'OMS a publié en 2013 des recommandation sur le « dépistage actif des cas » (*Active Case Finding*) visant à identifier de manière proactive les personnes atteintes, notamment chez

les groupes à haut-risque (cas contacts, personnes vivant avec le VIH) afin de raccourcir le délai de diagnostic, limiter la transmission et favoriser l'accès au traitement [112].

En pratique, la combinaison de méthodes permet d'avoir une meilleure vision de l'infection et du profil de résistance. Toutefois, beaucoup des techniques présentées ici sont coûteuses, ou nécessitent des infrastructures souvent indisponibles là où la prévalence de tuberculose est la plus élevée. Il est essentiel de développer des tests rapides, robustes, peu coûteux et utilisables indépendamment des infrastructures.

D. Traitements

Les premières molécules découvertes ayant un effet antituberculeux sont la streptomycine et l'acide para-aminosalicyclique (PAS). Cependant, peu de temps après leur introduction, les premières résistances aux antibiotiques sont apparues. Il a alors été décidé que la tuberculose ne devait pas être traitée avec un seul agent. Quelques années après, l'isoniazide a été découvert. L'association des trois molécules forme la tri-thérapie, qui durait 18 à 24 mois, traitement standard pour la tuberculose pendant 15 ans. Cependant, les effets indésirables et l'augmentation du nombre de patients souffrant d'une forme résistante aux antibiotiques ont encouragé l'emploi de nouvelles molécules, qui ont également permis de réduire la durée du traitement [113]. Les principales molécules utilisés dans les régimes thérapeutiques actuels sont récapitulées ci-dessous (**Tableau 1**).

Tableau 1 : Principaux antibiotiques utilisés dans la thérapie antituberculeuse, avec leur mode d'action, populations bactériennes cibles et concentration minimale inhibitrice (CMI).
Les CMIs ont été déterminées sur *M. tb* H37Rv, dans les conditions standards de culture *in vitro* : milieu liquide Middlebrook 7H9 + OADC ; milieu solide : 7H11 + OADC. Classification de l'OMS (2022) des antituberculeux utilisés pour compléter un régime dans le cas d'une tuberculose multi-résistance. Les molécules sont classées par ordre de priorité décroissante en trois groupes A (en jaune), B (en rose) et C (en bleu).

Nom	Cibles	Populations ciblées *in vitro*	CMI (µg/mL)	Référence
Isoniazide	Synthèse des acides mycoliques	Réplicatives	0,03 - 0,06	[114]
Rifampicine	Transcription	Réplicatives (Non réplicatives)	0,064	[115]

Pyrazinamide	Respiration, Métabolisme	Non réplicatives	75	[115]
Ethambutol	Synthèse de la paroi	Réplicatives	8	[115]
Bédaquiline	Respiration	Réplicatives Non réplicatives	0,02-0,5	[116]
Prétomanide	Respiration, Synthèse de la paroi	Réplicatives Non réplicatives	0,125	[117]
Linézolide	Synthèse protéique	Réplicatives Non réplicatives	0,5 - 2	[116]
Lévofloxacine / Moxifloxacine	Réplication, Transcription	Réplicatives Non réplicatives	0.25	[117]
Clofazimine	Respiration	Réplicatives Non réplicatives	0,125 - 4	[116]
Cyclosérine / Tétrizidone	Synthèse de la paroi	Réplicatives	4 - 16	[118]
Délamanide	Respiration, Synthèse de la paroi	Réplicatives Non réplicatives	0,004 - 0,03	[116]
Imipenem-cilastatin / Méropénème	Synthèse de la paroi	Réplicatives	8 - 32	[119]
Amikacine / Streptomycine	Protéines aberrantes	Réplicatives	1 - 4	[116]
Ethionamide / Prothionamide	Synthèse des acides mycoliques	Réplicatives	1	[115]
Acide *para*-aminosalycilique	Synthèse des acides nucléiques	Réplicatives	0,25-0,5	[120]

1. Traitements de première ligne

Le traitement standard pour un patient atteint de tuberculose active dite « sensible » consiste en l'association de quatre antibiotiques, appelé également traitement HRZE : isoniazide (INH, H), rifampicine (RIF, R), pyrazinamide (PZA, Z) et éthambutol (EMB, E). Il existe plusieurs protocoles de traitement qui peuvent faire varier l'intervalle de prise des antibiotiques et la durée de la thérapie, en fonction de l'âge du patient, la co-infection avec le VIH, nouveau cas ou rechute/réinfection et la région (zone de résistance aux

antibiotiques). Traditionnellement, les quatre antibiotiques sont pris quotidiennement pendant deux mois, puis la rifampicine et l'isoniazide sont pris pendant deux à quatre mois supplémentaires. Les deux premiers mois constituent la phase intensive, pendant laquelle la majorité des bacilles sont éliminés. Les mois suivants correspondent à la phase de consolidation, pour éliminer les bactéries survivantes [121].

L'isoniazide, de son nom chimique hydrazide d'acide isonicotinique est un pilier de la thérapie antituberculeuse depuis les années 1950. Il entre dans la bactérie par diffusion passive. Il fonctionne comme une « *pro-drug* », c'est-à-dire qu'il n'est pas actif en tant que tel, mais requière une activation une fois dans la bactérie. C'est l'enzyme KatG, une catalase-peroxydase, qui active l'INH via son activité peroxydase. En oxydant l'INH, elle génère un radical isonicotinoyl qui va réagir avec le nicotinamide adénine dinucléotide (NAD^+) intracellulaire et former un adduit INH-NAD. Cet adduit remplace par mimétisme le substrat naturel d'InhA, une énoyl-ACP réductase (*enoyl acyl carrier protein reductase*) du système FASII (*Fatty Acid Synthase type II system*), qui est impliquée dans la synthèse des acides mycoliques [122,123]. L'enzyme InhA inactivée, l'élongation des acides mycolique est bloquée et résulte en la déstabilisation de la paroi mycobactérienne [124]. L'INH est ainsi particulièrement actif contre les bactéries en division.

La rifampicine est un dérivé des rifamycines, une famille de métabolites produit par *Amycolatopsis mediterranei* [125]. C'est le deuxième pilier de la thérapie antituberculeuse, introduite en 1968. Elle entre dans la bactérie par diffusion passive. La RIF va se fixer dans une poche de la sous-unité β (codée par le gène *rpoB*) de l'ARN polymérase. Se faisant, elle obstrue le passage de l'ARN nouvellement synthétisé et bloque son élongation [126]. C'est un inhibiteur de la transcription qui a un effet bactéricide très rapide sur *M. tb*.

Le pyrazinamide a un rôle clé dans la thérapie antituberculeuse, car il cible presque exclusivement les bactéries non réplicatives [127]. Dans ce sens, son introduction en 1970 a permis de réduire le traitement de 9 à 6 mois. Le PZA entre dans le bacille par diffusion passive. Tout comme l'isoniazide, le PZA est une « *pro-drug* » et nécessite une activation intracellulaire par la pyrazinamidase/nicotinamidase PncA. Cet analogue du nicotinamide devient actif sous la forme d'acide pyrazinoique (POA). Son mode d'action est encore sujet à débat. La principale hypothèse aujourd'hui est que l'acide pyrazinoique sort de la bactérie par diffusion passive et devient protonée au contact de l'environnement extérieur acide (phagolysosome), puis rentre à nouveau dans la bactérie.

Si l'environnement extérieur est à pH neutre, comme dans des milieux *in vitro*, le POA ne sera pas protoné et restera à l'extérieur de la bactérie [128]. Selon un des modes d'action proposé, il s'accumule et perturbe le potentiel membranaire et de ce fait diminue la production d'adénosine triphosphate (ATP) [129]. Un autre mode d'action propose l'inhibition par le POA de l'enzyme PanD, impliquée dans la biosynthèse du coenzyme A, impliqué à la fois dans le métabolisme cellulaire et la biosynthèse de la paroi [130].

L'éthambutol, depuis son introduction en 1966, joue le rôle de protecteur dans la thérapie antituberculeuse. Son activité bactériostatique permet de limiter la réplication des bacilles, tant que leur sensibilité à l'INH et la RIF ne sont pas connues. Il inhibe la synthèse de l'arabinane seule, et une partie de celle de l'arabinane composant le lipoarabinomannane [131]. L'action de l'EMB est médiée par l'inhibition des arabynosyl-transférases, codées par l'opéron *embCAB*, qui assurent l'élongation de l'arabinane à partir du décaprényl-phospho-D-arabinose [132,133]. L'éthambutol se fixe près du site actif des arabynosyl transférases, inhibant leur action [134]. La paroi cellulaire est désorganisée, elle n'induit pas la lyse des cellules, mais plutôt un arrêt de la croissance [135].

2. Régime BPaLM / BPaL

En 2022, l'OMS a déclaré que le régime BPaLM, pour Bédaquiline, Prétomanide, Linézolide et Moxifloxacine est prioritaire chez tous les patients possédant à minima une résistance à la rifampicine. Si le patient possède une résistance aux fluoroquinolones, dont la moxifloxacine fait partie, le régime BPaL sera utilisé. Ce programme reste un régime court, avec une durée de 6 mois [121].

La bédaquiline (BDQ, B) est un antituberculeux relativement récent, puisqu'il a été approuvé par la *Food and Drug Administration* (FDA) en 2012. C'est un inhibiteur de la F-ATP synthase, qui peut se lier à la sous-unité *c* et ε. Sa fixation sur la pompe à proton inhibe la production d'ATP, ce qui en fait un antibiotique puissant à la fois contre les formes réplicatives et non réplicatives de *M. tb* [136].

Le prétomanide (PA, PA-824) est le dernier antituberculeux à avoir été accepté par la FDA, en 2019. C'est à nouveau une « *pro-drug* » qui doit être réduite par la nitro-réductase Ddn, en présence du co-facteur $F_{420}H_2$, synthétisé par les enzymes FbiA-D. En hypoxie, la réduction du prétomanide va générer des métabolites qui vont libérer de l'oxide nitrique

(NO), qui va empoisonner la chaîne respiratoire. En condition aérobie, le PA réduit la disponibilité des kétomycolates, ce qui inhibe la synthèse de protéines et lipides de la paroi [137]. Une autre cible récemment décrite est DpreE2, impliquée dans la synthèse de l'arabinogalactane. Le PA va former un adduit avec le NAD, qui va se lier à DprE2 et ainsi l'inhiber [138]. Par cette dualité de mécanismes de fonctionnement, le PA est capable de cibler à la fois les bactéries non réplicatives en condition hypoxique, et les bactéries réplicatives en condition aérobie.

Le linézolide (Lzd, L) se fixe sur les deux sous-unités 30S et 50S de l'ARNr. Il inhibe la formation du complexe d'initiation et ainsi la synthèse protéique [139]. Ainsi, le linézolide est capable de cibler à la fois les bactéries réplicatives et non réplicatives [140].

La moxifloxacine (MFX, M) se lie au complexe gyrase-ADN et stabilise l'état « clivé » après coupure des brins. En agissant sur la gyrase, la MOX empêche ainsi la réplication, la transcription et la réparation de l'ADN clivé, ce qui aboutit à une séquence d'ADN erronée. La MFX est active à la fois contre les bactéries réplicatives et non réplicatives [141].

3. Traitements de seconde ligne

Les traitements de seconde ligne vont être utilisés si le régime BPaLM/BPaL n'est pas possible. Cela peut être le cas si la tuberculose est extra-pulmonaire, si le patient a déjà été traité avec de la bédaquiline ou du linézolide, ou bien s'il présente une résistance ou une intolérance aux antibiotiques précédemment mentionnés. La plupart de ces antibiotiques induisent des effets secondaires plus grave que les antibiotiques de première ligne (toxicité élevée), sont disponibles uniquement sous forme injectables, ou ont une efficacité plus faible et requièrent une durée de traitement plus longue [142]. Ce sont des antibiothérapies plus longues que les deux précédentes, qui durent en moyenne 9 mois. Ces traitements sont proposés sous la forme de groupes (**Tableau 1**), qui permettent de composer des schémas individuels pour les patients, selon différents critères (âge, zone géographique, profil de résistance) [121].

4. Résistance aux antibiotiques

L'antibiorésistance représente un des défis majeurs dans la lutte contre la tuberculose. En 2023, le nombre de nouveaux cas de tuberculose présentant au moins une résistance à un

antibiotique a été estimé à environ 400 000, ce qui en fait un véritable problème de santé publique [26]. En raison de la difficulté accrue à éliminer ces souches résistantes, leur présence est défavorable au pronostic et serait responsable de 15 à 20% des décès liés à la tuberculose [143].

L'émergence de souches résistantes aux antibiotiques est exacerbée par la surutilisation des agents thérapeutiques, leur usage inapproprié lié à des diagnostics erronés ou le non-respect des durées de traitement recommandées. Si la polythérapie a permis de limiter l'apparition de résistances, leur émergence reste favorisée par l'usage prolongée de monothérapies par le passé, la durée des traitements et la présence de formes latentes. En moyenne, les premières résistances apparaissent 2 à 3 ans après l'introduction d'une thérapie, y compris lorsqu'il s'agit de combinaison. Les mutations responsables de la résistance peuvent affecter quatre mécanismes : surexpression des pompes d'efflux, altération de l'activation des « *pro-drugs* », mutation de la cible ou sa surexpression (**Figure 18**) [144]. Différents niveaux de résistance aux antibiotiques sont décrits et définis par l'OMS [145].

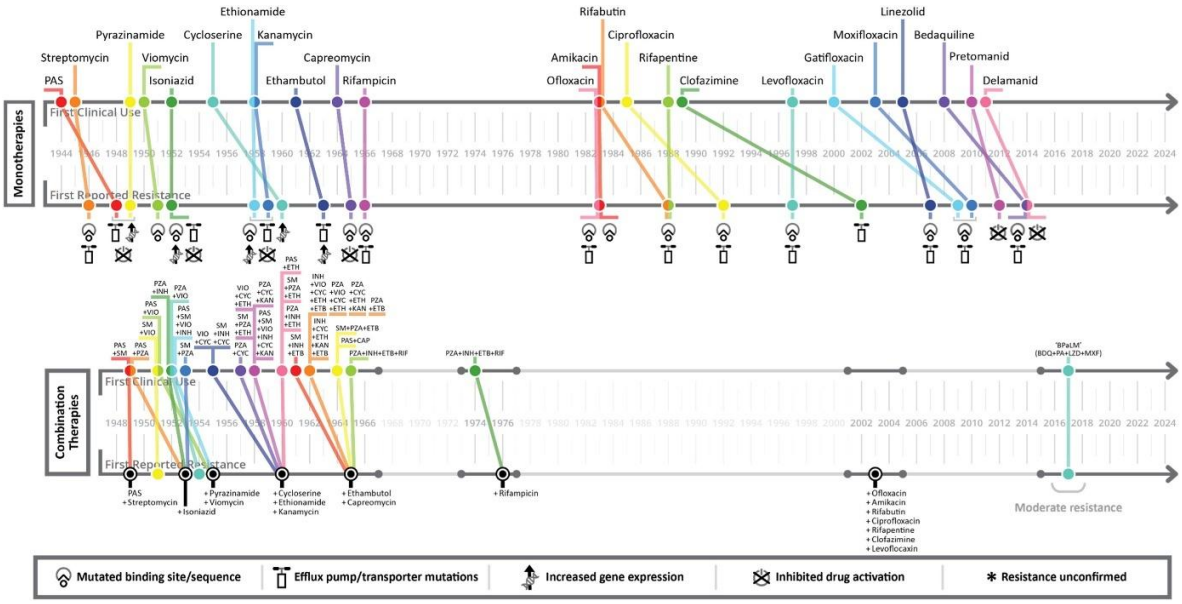


Figure 18 : Première utilisation clinique et émergence de résistances rapportées pour les thérapies contre *M. tb*.
Chaque ligne colorée relie l'année de premier essai chez des patients TB positifs à l'année où une résistance a été rapportée, pour une monothérapie (haut) ou une combinaison (bas). Les mécanismes de résistance identifiées pour les monothérapies (lorsqu'ils sont connus) sont représentés par les symboles indiqués dans la légende. Les thérapies combinées sont abrégées et regroupées sous la plus large combinaison testée l'année correspondante. L'année de résistance indiquée correspond à celle où une souche résistante à l'ensemble des antibiotiques de la combinaison a été rapportée. Les points noirs cerclés représentent l'accumulation progressive de nouvelles souches comprenant les résistances listées, ains que toutes les précédentes.

La **RR-TB (*Rifampicin-Resistant tuberculosis*)** décrit une résistance à la rifampicine seule. Dans la très grande majorité des cas, la résistance à la rifampicine est due à une mutation ponctuelle du gène *rpoB*, codant pour la protéine cible de l'antibiotique [145].

La **tuberculose multirésistante (MDR-TB, *Multidrug-Resistant tuberculosis*)** est définie comme une résistance aux deux antibiotiques de première ligne les plus puissants : l'isoniazide et la rifampicine [145]. Dans le cas de l'isoniazide, des mutations dans le gène *katG* empêchent la bioactivation de la « *pro-drug* » en composé actif, inhibant de fait son activité [146]. Des mutations dans le gène *inhA*, codant pour la cible de l'antibiotique, peuvent également être retrouvées [146].

Une **tuberculose pré-XDR (*Pre-Extensively Drug-Resistant*)** est causée par un bacille répondant aux critères des RR-TB ou MDR-TB, et qui est également résistant à n'importe quelle fluoroquinolone (par exemple moxifloxacine ou lévofloxacine) [147]. Des mutations dans les gènes codant pour la gyrase, *gyrA* et *gyrB*, sont communément recherchées pour détecter des bactéries résistantes aux fluoroquinolones [143]. D'autres mécanismes de résistance ont également été décrits, sur des pompes d'efflux ou la régulation de l'expression de la gyrase [148].

Enfin, la **tuberculose ultrarésistante (XDR-TB)** englobe les résistances déjà décrites pour les pré-XDR-TB, en complément d'une résistance à la bédaquiline et/ou au linézolide [147]. Les mécanismes conduisant à la résistance de ces deux antibiotiques sont encore assez peu connus. Une méta-analyse publiée en 2023 a permis de répertorier différentes mutations dans différents gènes comme *rrl* ou *atpE* dans des souches résistantes au linézolide ou à la bédaquiline respectivement. Cependant, la faible fréquence de ces mutations rend difficile leur association avec le phénotype de résistance [149].

5. Échecs thérapeutiques et rechutes

L'échec thérapeutique correspond à une tuberculose qui reste diagnostiquée positive à l'issu du traitement, ou par la nécessité de modifier le schéma thérapeutique en raison d'une résistance aux antibiotiques. La rechute désigne un nouvel épisode de tuberculose due à une élimination incomplète des bacilles, et est à différencier de la réinfection qui résulte d'une nouvelle exposition au pathogène [150,151].

Une mauvaise adhésion au traitement est une cause fréquente d'échec, en raison du nombre conséquent de molécules impliquées et de la durée particulièrement longue des schémas thérapeutiques. En outre, la présence de comorbidité comme le diabète ou une infection par le VIH augmentent le risque de rechute ou de réactivation d'une LTBI [80,150]. Environ 5% des patients atteints d'une tuberculose sensible développent une rechute à la suite du traitement standard [152].

Contrairement aux modèles *in vitro* ou *in vivo*, où certains antituberculeux peuvent obtenir une stérilisation complète en ciblant à la fois les bactéries réplicatives et non réplicative, la situation chez l'humain est plus complexe. Les populations sont plus diverses que celles mimées en laboratoire. La maladie peut se présenter sous plusieurs formes : LTBI, TB active, TB débutante ou TB sub-clinique (**Figure 19**) ; chacune est caractérisée par des micro-environnement variés : extracellulaires ou intracellulaires, granulomes avec ou sans zone caséeuse, ou cavités pulmonaire. L'accès et l'efficacité des antibiotiques diffèrent selon ces niches. De plus, *M. tb* adopte différents états physiologique, allant du bacille réplicatif, à des formes non réplicatives, métaboliquement ralenties, pouvant résulter en une tolérance aux antibiotiques [80,153–155]. La charge bacillaire est également corrélée au pronostic. Ces éléments soulignent la nécessité d'adapter la durée et la combinaison des traitements à chaque situation clinique à l'aide d'une approche de stratification des cas [154]. Un traitement inadapté se traduit par une stérilisation incomplète, qui favorise la rechute et contribue à l'échec global de la prise en charge.

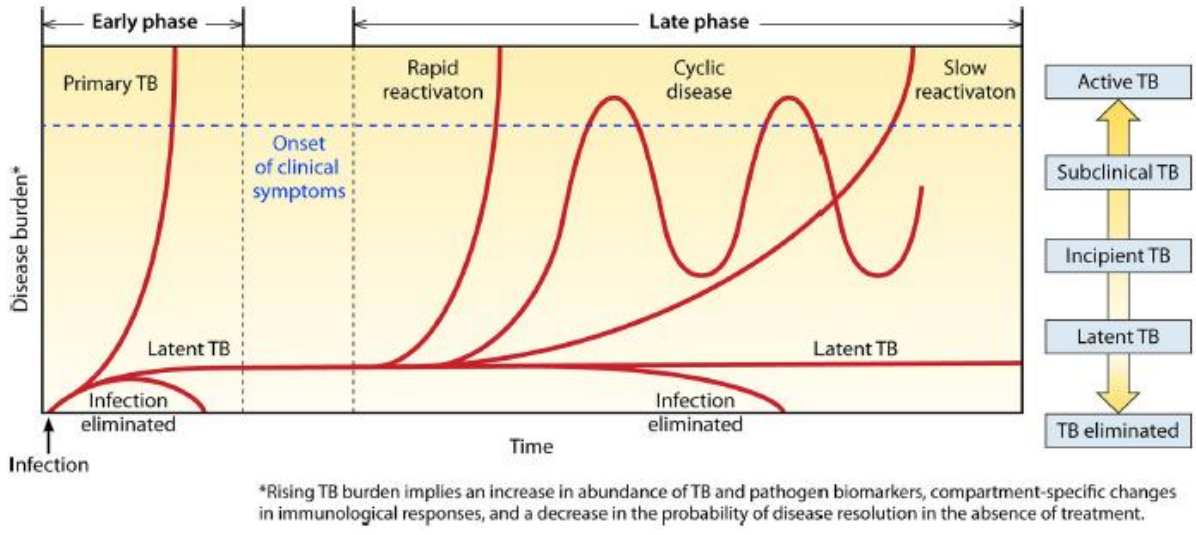


Figure 19 : Devenir de l'infection tuberculeuse [155].

Après l'infection, *M. tb* peut être éliminée, persister sous forme latente ou évoluer vers une tuberculose active. L'infection peut rester stable, progresser lentement ou rapidement vers une forme active, passer par des stades débutants ou sub-cliniques ou se résoudre spontanément.

E. Vaccin

En 1921, le vaccin Bacille Calmette-Guérin (BCG) a été mis au point par les scientifiques éponymes, marquant une avancée majeure dans la lutte contre la tuberculose. Ce vaccin vivant atténué est le résultat d'une série de 96 passages successifs de *Mycobacterium bovis* sur milieu de culture solide [156]. Bien que protégeant assez peu de la colonisation et des formes pulmonaires de tuberculose, il est relativement efficace contre les formes sévères comme les tuberculoses méningées et disséminées [157]. Ce vaccin a permis une réduction significative des décès liés à la tuberculose, en particulier chez les enfants. Selon l'étude de Harris et al. [158], la vaccination par le BCG permet de prévenir environ 117 000 décès dus à la tuberculose par cohorte de naissance dans les 15 premières années de vie. En France, la vaccination par le BCG n'est plus obligatoire pour les nourrissons depuis 2007 mais il reste recommandé aux enfants dès le premier mois de vie. Aujourd'hui encore, il reste le seul vaccin commercialisé dans le monde [157]. Néanmoins, plus d'une dizaine de nouveaux vaccins contre la tuberculose sont actuellement en essai clinique, basés sur différentes stratégies comme les germes vivants atténués, les vaccins inactivés, les protéines recombinantes ou encore *via* des vecteurs viraux [159].

II. *M. tb* dans un état non réplicatif

Il a longtemps été admis que les formes non réplicatives de *Mycobacterium tuberculosis* étaient réservées à la tuberculose latente et les formes réplicatives à la tuberculose active. Cependant, la réalité est bien plus complexe, puisque les différentes populations de *M. tb* sont retrouvées dans les différentes formes de la maladie. Bien que la forme LTBI reste associée à une proportion plus importante de bacilles dans un état non-réplicatif [160], des études d'imagerie et d'analyses post-mortem ont révélé la coexistence de niches tissulaires hétérogènes, avec la présence de lésions à des stades variables abritant des populations de *M. tb* distinctes [78].

Les micro-environnements multiples (zones extracellulaires ou intracellulaires, granulomes caséeux ou non, cavités pulmonaires) exposent *M. tb* à une variété de stress

(hypoxie, pH acide, carence nutritive, pression immunitaire). Ainsi, au sein d'un même hôte, *M. tb* adopte différents états physiologiques allant du bacille réplicatif aux formes non réplicatives, avec des adaptations métaboliques variées, qui lui permettent de survivre à des conditions hostiles et de tolérer le traitement antituberculeux [80,153].

A. Concepts et définitions

La survie bactérienne en présence d'antibiotiques peut résulter de trois phénomènes distincts : la résistance, la tolérance et la persistance. Si ces termes sont parfois employés de manière interchangeable dans la littérature, ils renvoient à des mécanismes biologiques distincts. En 2018, un consortium de 121 scientifiques, issus de 21 pays différents, a proposé des définitions universelles, dans l'objectif de clarifier ces différents mécanismes [161].

1. Résistance aux antibiotiques

Une bactérie résistante aux antibiotiques est capable de survivre et de se multiplier malgré la présence d'un antibiotique, grâce à un facteur génétique de résistance qui lui confère la capacité de se développer à des concentrations d'antibiotiques inhibitrices pour les souches sensibles. Ce phénotype se traduit par une augmentation de la concentration minimale inhibitrice (CMI) du ou des antibiotiques concernés [161]. Les différents mécanismes impliqués dans la résistance aux principaux antituberculeux, ainsi que les classifications de résistance ont déjà été détaillés plus haut (section I.D.4).

2. Persistance et tolérance

La persistance et la tolérance sont deux phénomènes souvent confondus, puisqu'ils sont très proches d'un point de vue mécanistique et phénotypique. Contrairement à la résistance, les phénomènes de tolérance et de persistance aux antibiotiques ne s'accompagnent pas d'une modification de la CMI. Les bactéries dites tolérantes ou persistantes, aussi appelées *persisters*, ne prolifèrent pas en présence de l'antibiotique, mais survivent temporairement à son action. Une fois le stress levé, elles retrouvent une sensibilité identique à celle de la population initiale. Ces états physiologiques se

traduisent par une augmentation de la concentration minimale bactéricide (CMB) et une cinétique d'élimination (*killing*) plus lente [161].

Dans certains cas, la tolérance et la persistance peuvent être favorisées par des mutations génétiques, rendant ces phénotypes partiellement héritables. Cependant, même en présence d'une mutation, les *persisters* ne prennent pas le dessus sur la population, contrairement aux bactéries résistantes, puisqu'ils ne se répliquent pas ou peu. Cette caractéristique est souvent liée au fait que les bactéries tolérantes et persistantes se trouvent dans un état non réplicatif, mais ce n'est pas toujours le cas. Ces bactéries restent sensibles aux traitements, mais nécessitent plus de temps pour être éliminées. C'est véritablement la dimension temporelle qui distingue la tolérance et la persistance des autres phénomènes de résistance [161].

Les définitions présentées ici concernant principalement les phénomènes relatifs aux antibiotiques, mais elles sont également applicables à d'autres stress auxquels la bactérie peut être exposée.

a. Persistance

La persistance correspond à la survie d'une sous-population minoritaire de bactéries au sein d'une population clonale, lors d'une exposition à un antibiotique bactéricide. Elle se manifeste classiquement par une courbe de *killing* biphasique, caractéristique de ce phénotype, qui illustre la coexistence de deux sous-populations : l'une est sensible et rapidement éliminée, l'autre est constituée de bactéries dites persistantes, capables de survivre plus longtemps (**Figure 20A**) [161].

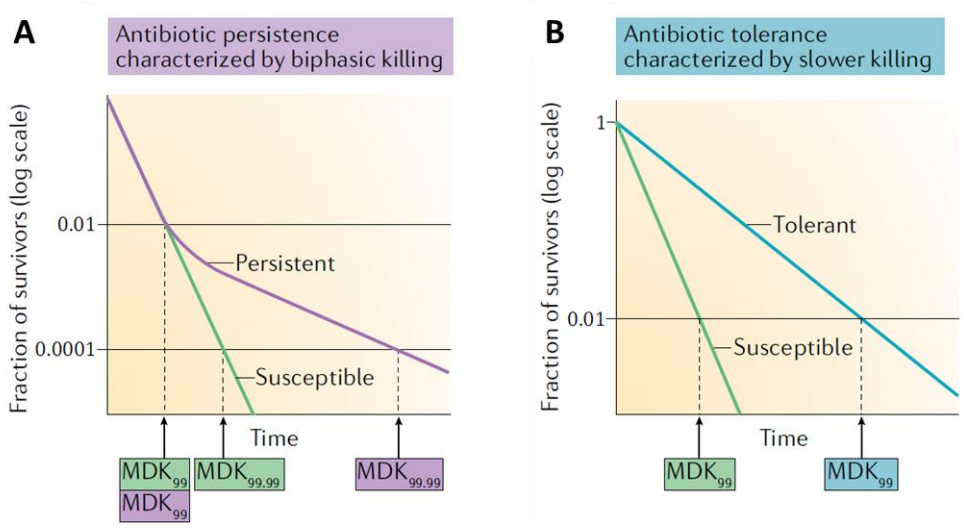


Figure 20 : Représentation graphique de la tolérance et persistance aux antibiotiques.
(A) La persistance conduit à une durée minimale d'élimination (MDK : *minimum duration for killing*) pour 99% de la population (MDK_{99}), similaire à celle d'une culture sensible dans un premier temps, puis la présence de *persisters* entraîne une MDK_{99} plus importante pour cette sous-population. (B) La tolérance conduit à une augmentation de la MDK_{99} par rapport aux bactéries sensibles. Les données présentées sont uniquement des illustrations et non des mesures réelles. Figure issue de Balban et al. [161]

Les *persisters*, peuvent être classés dans deux catégories. Les *persisters* de type 1 sont générés à la suite d'un stress. Les *persisters* de type 2 sont préexistants dans la population, et apparaissent de façon stochastique dans une culture en phase exponentielle de croissance [162].

Les *persisters* sont génétiquement identiques aux cellules sensibles [160], mais s'en distinguent par leur physiologie : réduction du métabolisme, ralentissement ou arrêt de la réplication, et activation de mécanismes de protection intracellulaires tels que les pompes d'efflux ou la réponse stringente [163]. Chez *M. tb*, ces cellules persistent dans des micro-environnement défavorables (hypoxie, pH acide, stress oxydant, carence nutritive), retrouvés notamment dans les macrophages et les granulomes et sont également générés lors de la phase stationnaire *in vitro* [160]. Plusieurs sous-populations de *persisters* peuvent co-exister, ce qui peut induire différentes cinétiques d'élimination bactérienne dans une même culture [161]. Bien que cet état semble idéal pour la survie, toutes les cellules en phase stationnaire de croissance ne sont pas des *persisters*, ce qui signifie que cet état n'est pas la stratégie de survie la plus avantageuse à l'échelle individuelle [164].

b. Tolérance

La tolérance se distingue de la persistance par son caractère populationnel. Alors que la persistance concerne une sous-population minoritaire de bactéries, la tolérance désigne une réduction transitoire de la sensibilité aux antibiotiques qui affecte l'ensemble de la population (**Figure 20B**). Ainsi, la persistance est un cas spécial de tolérance dans laquelle une sous-population de persisters peuvent survivre au traitement antibiotique plus longtemps que la majorité de la population [161].

D'autres facteurs que les antibiotiques peuvent induire la persistance et la tolérance, tels que la carence en nutriments, le stress acide, des facteurs immunitaires ou la phase stationnaire d'une culture, cette dernière étant spécifique aux *persisters*. Les mécanismes adoptés par la bactérie pour survivre à ces stress incluent la dormance, un métabolisme ralenti, une diminution du taux d'ATP et une surexpression des pompes d'efflux [161]. Des

formes plus complexes existent également, notamment des bactéries dépourvues de paroi (*L-forms*, sphéroplastes), qui présentent une tolérance accrue aux antibiotiques ciblant la paroi [163,165].

La persistance et la tolérance aux antibiotiques sont souvent liées à un état non réplicatif de la bactérie, mais ce n'est pas toujours le cas. Des approches de cytométrie en flux ont montré que des bactéries se divisant avant l'exposition aux antibiotiques peuvent devenir des *persisters*, et qu'une croissance ou un métabolisme réduits avant le traitement augmentent la probabilité qu'une bactérie devienne *persister*, sans toutefois garantir cet état [166,167]. Toutefois, la tolérance et la persistance peuvent survenir indépendamment d'un état de dormance [161,167]. Il ne s'agit donc pas simplement d'un arrêt de croissance pour survivre, mais d'une adaptation physiologique impliquant notamment des modifications transcriptionnelles et métaboliques [168].

Ainsi, la tolérance et la persistance constituent des mécanismes essentiels de survie pour *Mycobacterium tuberculosis* sous pression antibiotique ou immunitaire. Elles représentent un état intermédiaire entre la croissance active et la dormance (**Figure 21**). L'existence de ces populations constitue l'une des principales raisons de la durée prolongée du traitement antituberculeux [80].

3. Dormance

La dormance désigne un état physiologique réversible dans lequel la bactérie cesse de se répliquer. Elle se distingue des phases stationnaires classiques par une activité métabolique fortement réduite et par une absence de réplication, même dans des conditions favorables à la croissance. Les bactéries dormantes sont souvent tolérantes à de nombreux antibiotiques, principalement en raison du ralentissement ou de l'arrêt de la division et des processus métaboliques ciblés par ces molécules [161].

De manière générale chez les bactéries, certaines voies moléculaires induisent l'entrée en dormance, tels que les systèmes toxines-antitoxines, la réponse stringente médiée par le ppGpp, la réponse SOS et la diminution du niveau intracellulaire d'ATP. Ces mécanismes entraînent une réduction globale de la synthèse protéique, de la réplication de l'ADN et de la biosynthèse de la paroi, assurant une survie prolongée dans un état énergétique minimal [163].

La dormance est un concept large d'état de ralentissement du métabolisme et de la réplication bactérienne. Dans ce concept, on retrouve les formes transitoires telles que les *persisters*, caractérisés par un arrêt temporaire de la division, et également les bactéries viables mais non cultivables (VBNC : *Viable But Not-Culturable*), dans lesquels les cellules conservent un métabolisme actif mais ne parviennent plus à se développer sur des milieux de culture standard [169].

Chez de nombreuses espèces bactériennes, la majorité du temps de vie bactérien serait passé dans un état de faible activité métabolique et réplicative, entrecoupé de phases de croissance lorsque les conditions sont favorables [169]. La dormance constitue une stratégie universelle d'adaptation et de survie bactérienne, dont la profondeur varie en fonction du degré de réplication et de ralentissement métabolique.

4. Bactéries viables mais non cultivables (VBNC)

a. Définition

Les VBNC représentent une forme de dormance dans laquelle les bactéries demeurent viables et métaboliquement actives, mais incapables de se multiplier dans des milieux de culture standards, où elles se développent habituellement (**Figure 21**). Elles peuvent également être désignées sous le terme de NGMA (*Non Growing but Metabolically Active*), soulignant la présence d'une activité métabolique en l'absence de croissance. Cet état n'est pas spécifique aux conditions expérimentales de laboratoire, et est observé dans l'environnement et au cours d'infections [169,170].

Cette incapacité à se développer est transitoire, mais les facteurs conduisant à la reprise de croissance demeurent mal définis. Certains auteurs considèrent que les VBNC sont capables de reprendre leur croissance dès la levée du stress [171], alors que d'autres réservent ce terme aux bactéries nécessitant un signal spécifique pour leur réveil [170].

Les VBNC se distinguent des autres formes de survie bactérienne. Contrairement aux spores, qui sont des structures déshydratées, métaboliquement inertes et morphologiquement très distinctes des bactéries réplicatives, les VBNC conservent une morphologie proche des cellules réplicatives, bien que leur paroi puisse être modifiée. Elles sont également une catégorie distincte des bactéries dormantes au sens large, qui

englobent des bactéries avec une activité métabolique quasi inexistante. Les VBNC maintiennent au contraire un métabolisme résiduel [170].

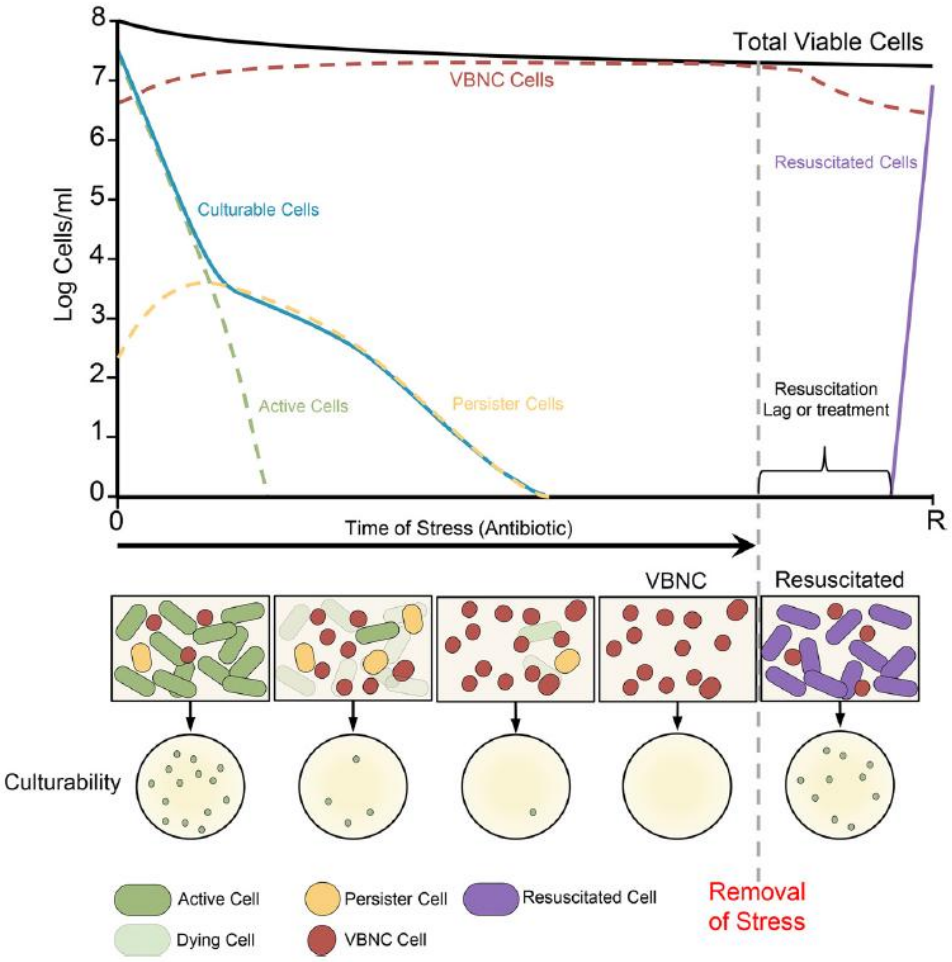


Figure 21 : Dynamiques de croissance des différentes populations en réponse à un stress [169].

b. Mécanismes

L'entrée dans l'état VBNC est généralement induite par des conditions de stress, telles qu'une carence nutritive, des variations du pH, de la température ou de l'oxygénation, ou l'exposition aux antibiotiques. Les bactéries adaptent leur métabolisme en réduisant leurs besoins énergétiques, modifiant leur physiologie et leur structure. De la même manière que chez les *persisters* ou les bactéries dormantes en général, un changement dans certaines voies de réponse au stress (réponse stringente, réponse à l'oxydation, expression des transporteurs transmembranaire), un déséquilibre du système toxine-antitoxine, ou plus largement une diminution de l'activité métabolique, participent à l'induction et au maintien de cet état [171–173]. Il est difficile d'établir une voie commune

d'entrée dans l'état VBNC, car les signatures transcriptionnelles observées vont dépendre du stress rencontré [172]. Les VBNC peuvent également être générés de manière stochastique dans une culture en phase de croissance exponentielle, où elles représenteraient une population plus importante que celle des *persisters* [169].

Sur le plan physiologique et morphologique, les VBNC peuvent présenter différentes modifications caractéristiques, telles qu'une diminution de la taille, un épaississement de la paroi, un changement dans la composition membranaire, une modification du métabolisme et une compaction du nucléoïde [174,175]. L'état VBNC n'implique pas forcément une perte de la virulence, plusieurs bactéries pathogènes vont continuer à exprimer leur système de virulence et restent pathogènes [171,172].

À ce jour, plus de 100 espèces bactériennes, appartenant à 50 genres différents, ont été décrites dans un état VBNC, incluant aussi bien des bactéries pathogènes de l'Homme (*Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, Salmonella spp*), de l'animal (*Vibrio shiloi*), des plantes (*Ralstonia solanacearum*), mais aussi des bactéries commensales ou environnementales (*Bifidobacterium longum*) [171,172,174]. Cependant, la capacité de réveil n'a été montré que pour un nombre restreint d'espèces [169].

Dans la plupart des cas, les bactéries retrouvent une activité réplicative lorsque le stress est enlevé, mais certaines bactéries requièrent la présence de signaux spécifiques pour redevenir cultivables, comme des nutriments, le contact avec l'hôte, des molécules auto-inductrices ou du surnageant de culture [170]. Certains déterminants moléculaires ont été identifiés, notamment les enzymes Rpfs chez *Mycobacterium tuberculosis* [176,177], la protéase YeaZ chez *Vibrio harveyi* [178] et les molécules auto-inductrices chez *Salmonella typhimurium* [179].

Ces observations suggèrent que le réveil des VBNC repose sur des mécanismes multiples, dépendants de l'espèce et liés à la nature du stress initial.

c. Détection

La détection des bactéries VBNC repose sur des approches permettant d'étudier la viabilité indépendamment de la capacité de croissance. Les techniques moléculaires, en particulier la détection d'ARNm spécifiques, permettent de mettre en évidence la transcription qui reflète le métabolisme présent chez cette population. Les approches

métaboliques servent à montrer la viabilité de la bactérie, avec des outils basés sur la détection de la production de métabolites ou l'activité enzymatique. Enfin, des techniques de marquage utilisent des sondes ou des fluorochromes capables de réagir en présence de la respiration cellulaire, représentatives de l'activité métabolique [172,174].

Les approches de microfluidique couplées à la microscopie *time-lapse* permettent aujourd'hui de mieux comprendre la dynamique de population dans un état non-réplicatif. Une étude réalisée sur *Mycobacterium smegmatis* exposé à l'INH a montré que la population de *persisters* apparemment stable est en fait une balance entre mort cellulaire et division, et que les différences de tolérance peuvent être transmises entre générations [180]. Par ailleurs, cette même approche utilisée sur *M. tb* a révélé qu'en phase stationnaire avancée, en condition de carence nutritive ou lors d'infection, les populations présentent une hétérogénéité de croissance et une activité de transcription de l'ARN ribosomique fluctuante [166]. Ces fluctuations soulignent la nature dynamique, non synchronisée et réversible des états non-réplicatifs, plutôt qu'un arrêt stable et uniforme de la croissance.

B. Modèles d'étude des bactéries non réplicatives

La mise en évidence de formes dormantes de *M. tb* a conduit au développement de nombreux modèles expérimentaux visant à reproduire ces états *in vitro* ou *in vivo*, notamment en exposant le bacille aux conditions de stress qu'il rencontre chez l'hôte. Ces modèles constituent des outils essentiels pour analyser les adaptations physiologiques qui en résultent, décrypter les mécanismes moléculaires impliqués et évaluer l'efficacité des antituberculeux sur ces formes non réplicatives.

1. *In vitro*

Modèle de Wayne

Le modèle de Wayne est l'un des modèles *in vitro* le plus utilisé pour étudier la dormance de *M. tb*. Ce modèle s'appuie sur la consommation progressive d'oxygène par les bacilles dans un milieu clos, entrainant la transition vers un état non réplicatif observé en conditions hypoxiques. Cette déplétion graduelle d'oxygène reproduit, dans une certaine mesure, les conditions rencontrées par *M. tb* dans le granulome tuberculeux [181,182].

Dans le modèle original, les cultures sont maintenues en conditions statiques, entrainant la formation d'une zone supérieure riche en oxygène, contenant des bacilles réplicatifs et d'une zone inférieure anaérobie, où les bacilles deviennent non réplicatifs. Au cours de cette transition, deux états successifs de « *Non Replicating Persistance* » (NRP) sont observés : NRP-1, correspondant à des conditions micro-aérophiles (~1% O_2), dans lesquelles les bacilles présentent encore une activité métabolique et une sensibilité partielle à certains antibiotiques ; NRP-2, correspondant à des conditions d'anaérobie stricte (<0,06% O_2), caractérisées par un métabolisme très ralenti, une absence de réplication et une tolérance accrue à plusieurs antituberculeux, notamment à l'isoniazide. Lorsque l'oxygène est réintroduit, les bactéries peuvent reprendre une croissance active, traduisant le caractère réversible de ces deux états [182].

Plusieurs adaptations du modèle de Wayne ont été développées, afin de faciliter l'isolement de bacilles non réplicatifs uniquement, et de le rendre compatible avec des applications à plus grande échelle. Une variante consiste à contrôler le taux d'oxygène et homogénéiser la culture, en maintenant les tubes sous agitation [183]. D'autres variantes ont été conçues pour permettre le criblage à haut débit de molécules sur les populations non réplicatives [184–186]. Parmi elles, le système HyRRA (*Hypoxic Resazurin Reduction Assay*) repose sur la capacité des bacilles métaboliquement actifs à réduire la rézasurine en résofurine, qui passe de bleu à violet et peut être utilisé comme un indicateur de viabilité [187,188]. De manière similaire, le système LORA (*Low Oxygen Recovery Assay*) utilise une souche exprimant la luciférase (système *luxAB*). La luminescence produite est le reflet d'un métabolisme redox actif (respiration, cofacteurs sous forme réduite), indicateur d'une activité métabolique [185]. Ces adaptations ont considérablement élargi les applications du modèle, permettant d'étudier la physiologie des états non réplicatifs et l'activité de composés sur ces populations.

L'adaptation à l'hypoxie est médiée par des réseaux de régulation transcriptionnelle et de changements métaboliques. Dans ce contexte, le système à deux composantes DosR/DosS (ou DevR/DevS) joue un rôle central en contrôlant l'expression d'une cinquantaine de gènes impliqués dans la réponse initiale à l'hypoxie et la transition vers un état métaboliquement ralenti. Les gènes qu'il contrôle sont d'ailleurs appelés régulon de dormance DosR. Cette première réponse est suivie de l'activation du régulon EHR (*Enduring Hypoxic Response*), qui permet la survie prolongée dans les conditions

hypoxiques [189–191]. Sur le plan métabolique, l'hypoxie induit un changement important dans le métabolisme du carbone, en favorisant la synthèse de triglycérides (TAG) et l'activation de la voie de shunt du glyoxylate, à la place du cycle de l'acide tricarboxylique (TCA), ce qui limite la perte d'atomes de carbone sous forme de CO_2 [96,192,193]. Ce métabolisme reproduit ce qui est observé *in vivo*, où *M. tb* utilise les lipides de l'hôte (acides gras, cholestérol) comme source principale de carbone, qu'il métabolise par le shunt du glyoxylate, et qu'il accumule sous forme de TAG, constituant une réserve énergétique utilisée lors de la sortie de dormance [194–196].

Les bacilles du modèle de Wayne présentent une tolérance à plusieurs antituberculeux, principalement ceux ciblant la paroi, comme l'isoniazide, l'éthambutol et la cyclosérine, tandis qu'ils restent sensibles à la capréomycine, la moxifloxacine et le métronidazole [192,197,198].

Ce modèle a permis d'identifier des gènes et voies métaboliques essentiels à la survie en hypoxie, et reste largement utilisé pour l'étude de la dormance mycobactérienne. Cependant, la critique principale émise contre ce modèle est qu'il reproduit plus la phase de transition vers la dormance, plutôt qu'un état de dormance stable [199,200]. De plus, cet état est facilement réversible, puisque *M. tb* est capable de former des colonies (CFU, *colony forming units*) en présence d'oxygène signifiant que la population n'est pas non réplicative, mais plutôt dans un état de latence [198].

Modèle de carence en nutriments

Au sein du granulome, *M. tb* se retrouve dans environnement au clos où la disponibilité en nutriments est limitée. En 1933, Loebel et al. ont pour la première fois décrit un modèle de dormance basé sur la carence en nutriments. Ces cultures de *M. tb* maintenues en condition de carence présentaient un ralentissement progressif de la respiration et un arrêt de croissance. Lorsque les bacilles étaient réintroduits dans un milieu riche, la croissance redémarrait. C'est la première description d'un état non réplicatif mais viable chez *M. tb.*[201].

Betts et al. se sont inspirés de ces travaux pour en faire un modèle standardisé. Une culture en phase exponentielle de *M. tb* est transférée dans une solution de tampon-

phosphate (PBS, *phosphate-buffered saline*), dépourvue de sources de carbone et d'azote. Le transfert dans ce milieu entraîne un arrêt de la croissance [202].

Des études transcriptomiques ont montré qu'en réponse à la carence, les bacilles subissent une diminution globale des activités métaboliques, rapportée par la répression des enzymes impliquées dans le cycle des TCA, la glycolyse et par une diminution de plus de cinq fois du niveau d'ATP intracellulaire [202–204]. Par ailleurs, le facteur sigma SigB est surexprimé et joue un rôle dans la réponse au stress et l'entrée en phase stationnaire, tandis que les acteurs de la réponse stringente (dont RelMtb) sont également induits et requis pour la survie en condition de carence [205].

Des approches de mutagénèse par transposon (Tn-seq) réalisées sur ce modèle ont permis d'identifier des gènes cibles essentiels à la survie de *M. tb* dans l'état non réplicatif en condition de carence. De façon cohérente, ces gènes comprennent ceux dont nous avons cités le rôle dans ces conditions [206,207].

Les bacilles soumis à la carence en nutriments acquièrent une tolérance à plusieurs antituberculeux, notamment l'isoniazide, la rifampicine, le métronidazole, la streptomycine et la moxifloxacine [202,203].

Néanmoins, les bacilles restent cultivables sur milieu solide [202], comme ceux obtenus dans le modèle de Wayne.

Modèle de carence en potassium

Le potassium (K^+) est un ion important pour la physiologie bactérienne, intervenant dans le maintien du gradient électrochimique, de la force proton-motrice, de la pression osmotique et du pH intracellulaire [208]. Les systèmes de transport du potassium chez *M. tb* sont le système à faible affinité Trk et le système à haute affinité Kdp [209]. Bien qu'aucune preuve d'une carence en potassium dans les macrophages ou les granulomes n'a été rapportée, un défaut d'importation de cet ion entraîne une diminution de la survie en macrophage [210]

Dans ce contexte, Salina et al. ont découvert qu'une carence en potassium permet d'obtenir des bactéries dans un état non cultivable. Dans ce modèle, les culture de *M. tb* sont transférérs dans un milieu Sauton, dépourvu de K^+. Cette carence entraîne une perte progressive de la formation des CFU par *M. tb*, jusqu'à devenir presque indétectables

après 40 jours dans le milieu. La croissance est reprise lorsque des ions potassium sont rajoutés dans le milieu, avec une activité métabolique mesurable après 10 à 24h de réveil [211].

D'un point de vue transcriptionnel, la carence en potassium entraîne une répression de la voie du cycle des TCA et des gènes associés à la respiration aérobie, tandis que les gènes impliqués dans la respiration anaérobie sont induits. Une induction partielle du régulon DosR est également observée, probablement due au métabolisme anaérobie de la bactérie [211].

Les bacilles présentent une sensibilité réduite à l'isoniazide, mais restent sensibles à la rifampicine [211].

Ce modèle présente l'intérêt de générer une population de bacilles presque entièrement non cultivables sur milieu solide.

Modèle de stress acide

La survie de *M. tb* dans le macrophage repose sur sa capacité à s'adapter à un environnement acide, rencontré dans le phagosome puis le phagolysosome [212].

Les études de Baker et al. ont montré que *M. tb* arrête sa croissance lorsque le pH extracellulaire est inférieur à 5,7, de manière dépendante de la source de carbone disponible. En présence de glycérol ou de glucose, la croissance est arrêtée, alors que l'utilisation de substrats situées à l'intersection entre le cycle des TCA et la glycolyse, comme le pyruvate ou l'acétate, permet de maintenir la croissance dans ce milieu acide. De même, le catabolisme du cholestérol, source de carbone dans l'hôte qui génère du pyruvate et de l'acétyl-coA, permet la réplication du bacille dans des conditions acides [213].

Sur le plan transcriptionnel, la réponse au stress acide est régulée par le système à deux composantes PhoP/PhoR, dont l'expression est essentielle pour maintenir la bactérie dans un état non-réplicatif stable. Le régulon de PhoP est constitué de gènes impliqués dans le maintien de l'homéostasie rédox. Le facteur SigB est également induit [213]. De plus, les enzymes du shunt du glyoxylate sont surexprimées et essentielles pour l'adaptation à ces conditions. La bactérie dans cet état non-réplicatif demeure métaboliquement active, capable de remodeler sa paroi et de synthétiser de l'ATP [214].

En milieu acide, la bactérie est tolérante à l'isoniazide et conserve une sensibilité à la rifampicine [214].

M. tb conserve sa capacité à former des CFU [213]. De façon intéressante, l'inhibition de PhoP/R entraîne une augmentation de la croissance de *M. tb* en présence de pyruvate à pH 5,7. Cette observation suggère que l'entrée dans un état faiblement ou non-réplicatif est une stratégie d'adaptation [214].

Une variante de ce modèle a été décrite par Shleeva et al., dans laquelle des cultures de *M. tb* en phase stationnaire avancée s'acidifient spontanément à un pH inférieur à 5. Dans ces conditions, les cellules adoptent une morphologie ovoïde, un épaississement de la paroi et perdent leur capacité à former des CFU. Cette morphologie est également observée dans des infections *in vivo*. Les bacilles peuvent reprendre leur croissance lorsqu'ils sont transférés dans du milieu frais, mais cette capacité se perd progressivement après environ 40 jours, au-delà desquels le réveil nécessite des facteurs de croissance exogènes contenus dans du surnageant de culture de *M. tb*. Dans cette étude, les bactéries sont tolérantes à la rifampicine [175].

Modèle de stress multiples

Chez l'hôte, *M. tb* fait face à plusieurs stress simultanés dont une hypoxie, une acidification de l'environnement, une carence nutritionnelle et l'exposition à des gaz réactifs tels que le monoxyde de carbone [78].

Pour reproduire cette complexité, Deb et al. ont développé un modèle *in vitro* combinant ces différents stress physiologiques : une faible quantité en oxygène (5%), une forte concentration en monoxyde de carbone (10%), un pH acide (5) et une faible concentration en nutriments [215].

Dans ces conditions, *M. tb* entre dans un état non-réplicatif, accompagné d'une importante réponse transcriptionnelle. Les analyses d'expression génique ont montré une activation des voies de respiration aérobie, une surexpression de la voie du shunt du glyoxylate, des mécanismes de réponses spécifiques à chacun des stress et une accumulation intracellulaire de TAG dans des corps lipidiques. Il y a également une activation du régulateur *dosR.* Les bacilles deviennent tolérants à l'isoniazide, et montrent une

sensibilité réduite à la rifampicine. Cependant, ils conservent leur capacite à former des CFU [215].

Modèle de phase stationnaire prolongée

L'entrée en phase stationnaire constitue une réponse naturelle de *M. tb*, et des bactéries en général, lors de l'épuisement des nutriments dans le milieu de culture. Dans ces conditions, le taux de croissance reste stable, mais le taux de CFU est inférieur au nombre total de bactéries [216].

Dans le modèle initialement décrit, *M. tb* H37Ra est cultivée pendant plusieurs mois, sans renouvellement du milieu. Après 8 mois de culture, le nombre de CFU chute. Lorsqu'un aliquot de cette culture vieille est transféré dans un milieu frais pendant quelques jours, le nombre de CFU augmente d'un facteur 10^3, et jusqu'à $2x10^4$ fois si du surnageant d'une autre culture en phase exponentielle est ajouté au milieu frais. De même, de faibles inocula (dilution de 10^{-3}) d'une culture de 8 mois réinoculés dans du milieu frais ne forment pas de CFU, alors qu'en présence de surnageant, des CFU sont observées jusqu'à une dilution de 10^{-5} [216]. Ces résultats indiquent qu'en phase stationnaire avancée, la majorité des bactéries sont viables mais non cultivables, dont la croissance peut être retrouvée en présence de signaux extracellulaires présents dans le surnageant.

Des observations similaires ont été rapportés dans d'autres études, où après 4 à 5 mois de cuture, les bacilles deviennent non cultivables sur milieu solide, bien qu'ils restent réplicatifs dans un milieu liquide, jusqu'à 10^5 b/mL, confirmant leur viabilité et la réversibilité de cet état [217]. Ces bactéries possèdent une morphologie ovoïde, une réduction de la taille cellulaire et une paroi plus épaisse [218].

Leur profil protéomique montre un enrichissement de protéines impliquées dans la protection contre le stress oxydant, des chaperonnes et des protéines de stabilisation de l'ADN. Les bactéries présentent également un faible niveau de métabolisme [218].

Les bactéries en phase stationnaire prolongée présentent une tolérance accrue à certains antibiotiques, notamment l'isoniazide et la rifampicine [219].

Des adaptations du modèle original ont permis d'améliorer la reproductibilité en contrôlant plusieurs paramètres, comme l'oxygène, le pH ou la température, afin qu'ils restent stables sur la période de culture. Cette variante montre également une diminution

de la croissance au cours du temps, qui serait attribuée à la carence en nutriments. En effet, le métabolisme du carbone est orienté vers la β-oxydation des acides gras [220].

Le modèle de phase stationnaire prolongée représente un système simple mais physiologiquement pertinent, dans lequel *M. tb* entre spontanément dans un état non réplicatif. Néanmoins, la transition lente et non contrôlée entre la phase de croissance et la phase de dormance, ainsi que la variabilité entre les expériences constituent les principales limites de ce modèle.

Autres modèles

Au sein du macrophage infectés, *M. tb* est exposée à l'oxyde nitrique (NO), un radical libre produit par les macrophages activés comme un mécanisme de défense antibactérien [196]. Le NO inhibe la respiration aérobie en ciblant les cytochromes de la chaine respiratoire et entraîne un ralentissement de la croissance. Il agirait de concert avec l'hypoxie. L'exposition au NO *in vitro* induit une surexpression du régulon DosR/DosS [196,221].

Les lipides constituent une source de carbone majeure pour *M. tb* lors de l'infection. En présence d'acides gras à longues chaines (acide oléique, acide palmitique et acide stéarique), la croissance bactérienne est ralentie, accompagnée d'une accumulation de gouttelettes lipidiques intracellulaires et d'une surexpression du régulon DosR. Par ailleurs, le métabolisme est réorienté vers la voie du shunt du glyoxylate, permettant l'utilisation efficace des acides gras [222].

Hu et al. ont développé un modèle reposant sur des cultures prolongées de 100 jours, menant à une carence nutritionnelle et une hypoxie. Ces cultures sont par la suite transférées dans du milieu frais en présence de rifampicine, qui induit une population tolérante [127,223]. Les bacilles deviennent incapables de former des CFU, mais peuvent reprendre leur croissance après inoculation dans du milieu frais [224].

La souche clinique *M. tb* ss18-b, isolée d'un patient atteint de tuberculose, présente un phénotype de dormance spontanée. En absence de streptomycine, cette souche entre dans un état non-réplicatif stable, qui peut être réversible lors de l'ajout de l'antibiotique. Cette souche est très utilisée pour étudier l'efficacité d'antibiotiques sur des bactéries non réplicatives [225].

L'ensemble de ces modèles *in vitro* permet d'explorer les adaptations de *M. tb* face aux stress rencontrés dans l'hôte. Bien qu'ils diffèrent par les stress utilisés et la profondeur de l'état non réplicatif induit, ils convergent vers un état de ralentissement métabolique et une tolérance accrue aux antibiotiques, en particulier à l'isoniazide. Par ailleurs, plusieurs modèles relatent la transition du métabolisme du carbone vers le shunt du glyoxylate et l'accumulation de lipides intracellulaires, ainsi qu'une réponse à l'hypoxie médiée par le système DosR/DosS et l'induction de la réponse stringente.

Cependant, aucun ne reproduit parfaitement la complexité du microenvironnement pulmonaire lors de l'infection, où plusieurs stress agissent simultanément et de manière fluctuante. Ces limites ont conduit au développement de modèles *in vivo*, qui offrent la possibilité d'observer *M. tb* face au système immunitaire de l'hôte, élément central dans l'établissement et le maintien de l'infection latente.

2. *In vivo*

Modèle du granulome sous-cutané

Le modèle d'induction d'un granulome sous-cutané a été développé pour étudier la physiologie de *Mycobaterium tuberculosis* dans un environnement *in vivo* contrôlé. Dans ce dispositif, les bacilles sont enfermés dans des fibres creuses semi-perméables (*hollow fiber*), qui permettent le passage des nutriments et de petites molécules, mais retiennent les cellules bactériennes et immunitaires. Ces capsules sont implantées en sous-cutanée chez la souris, déclenchant la formation d'un granulome localisé autour du dispositif [226].

Bien que ce granulome contenant *M. tb* ne soit pas dans les poumons, il reproduit des caractéristiques très similaires, comme un environnement hypoxique. Les bactéries présentent une réduction de l'activité métabolique, ainsi que l'induction de DosR et d'une partie de son régulon. Les comptages CFU restent stables et reflètent un état de faible réplication, avec une balance entre réplication limitée et mort cellulaire. Les bacilles sont peu sensibles à l'isoniazide, mais restent sensibles à la rifampicine [226].

La principale limite de ce modèle réside dans le fait que la bactérie est confinée dans la capsule, et ne peut pas interagir avec les cellules immunitaires du granulome.

Modèle de caséum *ex vivo*

Le caséum constitue un niche physiologique importante de *M. tb*, au sein des granulomes nécrotiques des patients atteints de tuberculose. Cet environnement formé suite à la dégradation cellulaire est très riche en lipides et protéines. Il présente une hypoxie et une carence en nutriment et contient des bacilles souvent dans un état non-réplicatif. Cependant, les antibiotiques n'ont pas une bonne pénétration dans cet environnement [227].

Le caséum est rarement produit dans les modèles animaux standards (souris), ce qui complique l'étude de cette niche. Pour pallier cette limitation, Sarathy et al. ont développé un modèle *ex vivo* de substitut de caséum en utilisant des macrophages spumeux humains lysés et dénaturés, mimant la composition lipidique et la structure du caséum retrouvé chez les lapins. *M. tb* est cultivé puis mis au contact de ce substrat. Les bacilles adoptent un état non-réplicatif, avec une accumulation de lipides intracellulaires, formant des corps lipidiques similaires à ceux dans les bacilles isolés de lésions pulmonaires humaines [228].

La signature transcriptionnelle des bacilles cultivés dans le substitut de caséum est très similaire à celle retrouvée dans le caséum du lapin. Les bactéries présentent également une tolérance aux antituberculeux similaire à celle observée dans le caséum du lapin et relativement similaire à celle retrouvée chez l'Homme [228].

Le modèle de caséum *ex vivo* peut facilement être standardisé et adapté à des criblages à haut débit. De plus, ce modèle constitue un très bon outil de prédiction de la réponse bactérienne aux antibiotiques, et de la pénétration des molécules dans cet environnement singulier [228].

Modèle de Cornell

Le modèle de Cornell constitue l'un des modèles murins les plus utilisés pour l'étude de la tuberculose latente et les rechutes post-traitement.

Dans ce modèle, les souris sont infectées par voie intraveineuse avec *M. tb*, puis traitées pendant trois mois avec une combinaison isoniazide et pyrazinamide. A l'issue du traitement, aucun bacille n'est détectable par culture sur milieu solide [229–231]. Cependant, après l'arrêt du traitement une rechute spontanée survient chez environ un tier des animaux[230] et l'administration d'agents immunosuppresseurs (cortisone) augmente ces rechutes [229]. Néanmoins, tous les bacilles sont sensibles aux deux antibiotiques

administrés. Ainsi, ces observations suggèrent la présence de bactéries non cultivables à l'issue du traitement, et capables de se réveiller lorsque les conditions redeviennent favorables.

Le modèle de Cornell reproduit une infection paucibacillaire après le traitement antibiotiques, comparable à celle observée chez l'Homme dans le cas d'une tuberculose latente [199].

Le modèle apparait pertinent pour étudier les mécanismes de persistance et de rechute chez l'hôte, ainsi que l'efficacité de stratégie de stérilisation. Cependant, il présente plusieurs limites. Tout d'abord, la latence induite résulte de l'exposition aux antibiotiques, et non exclusivement à une adaptation de la bactérie au système immunitaire. Ensuite, le modèle est fortement dépendant des conditions expérimentales : durée de traitement aux antibiotiques, dose infectieuse initiale, délai entre l'infection et le début du traitement. Ces divergences de protocoles se traduisent en phénotypes variés : rechute spontanée, mycobactéries altérées morphologiquement, difficulté d'induction de la rechute [232]. Même en suivant des protocoles identiques, le taux de rechute varie énormément entre les groupes [232,233].

Modèle d'infection à faible dose

Le modèle murin à faible dose infectieuse a été développé afin de reproduire une infection plus proche de celle induite chez l'Homme.

Dans ce modèle, les souris sont infectées par voie aérosol, avec un faible inoculum, compris entre 5 et 10 CFU de *M. tb*. Après l'infection initiale, la charge pulmonaire augmente jusqu'à atteindre une phase stable. Cette phase de latence peut se maintenir pendant 12 à 18 mois, avant une réactivation spontanée qui conduit à une progression rapide de la maladie et le décès des souris [234].

Ainsi, le modèle ne reproduit pas une véritable latence comme celle retrouvée chez l'Homme. Néanmoins, il permet d'étudier les mécanismes immunologiques du contrôle de l'infection [234].

Des ajustements du protocole ont permis d'améliorer ce modèle. Lorsque l'inoculum est réduit à 1-3 CFU, les souris développent des granulomes mieux organisés, présentent une structure plus proche de cellules observée chez les primates non humains et chez les

patients atteints de tuberculose. De plus, la charge bactérienne est hétérogène entre les lobes pulmonaires, ce qui reflète la variabilité naturelle de la maladie [235].

Des analyses transcriptomiques ont montré la présence d'une signature transcriptionnelle au niveau sanguin, prédictive du devenir de l'infection et corrélée directement à la charge bactérienne pulmonaire. Cette signature est conservée entre les souris, les primates non humains et l'Homme, suggérant une homologie des réponses immunitaires au cours du contrôle de l'infection [235].

Modèle murin de Kramnik

Les modèles murins standards d'infection à *M. tb* présentent des limites majeures. L'infection se caractérise par une charge bactérienne très élevée, qui est répartie uniformément dans les lobes pulmonaires, avec une inflammation et des granulomes faiblement organisés qui ne présentent ni nécrose, ni fibrose, ni hypoxie. Ces caractéristiques sont très peu représentatives de l'hétérogénéité observée chez l'humain [236].

Dans ce contexte, le modèle Kramnik utilisant les souris C3HeB/FeJ a été développé pour correspondre plus fidèlement à la physiopathologie humaine. Ces souris ont une mutation génétique sur le locus sst1 (*super-susceptibility to tuberculosis* 1) qui module la réponse immunitaire et les rendent très sensibles à *M. tb*. Les infections à forte dose en intraveineuse et à faible dose par aérosol aboutissent à la formation de granulomes nécrotiques et hypoxiques, très organisés, pouvant être caséeux et fibreux [237,238].

Ces lésions présentent une hypoxie confirmée notamment par la surexpression de DosR [239]. L'infection est également hétérogène dans ces souris, indépendamment du temps d'incubation avec *M. tb*, avec une corrélation entre charge bacillaire élevée et lésions étendues [238].

Le modèle de Kramnik permet d'observer la pénétration des antituberculeux au sein des différentes lésions pulmonaires. Le pyrazinamide présente une activité réduite dans les régions caséeuses liquéfiées, où le pH est neutre, ce qui corrèle avec son mode d'action [238]. Un traitement combiné de rifampicine, isoniazide et pyrazinamide conduit à des cultures négatives après 12 jours, mais environ 20% des souris ont rechuté après l'arrêt du traitement [239], traduisant la présence de bactéries non réplicatives et tolérantes.

Malgré la multitude de lésions qu'il peut générer, le modèle de Kramnik présente une progression de l'infection trop rapide et importante pour pouvoir y étudier la latence. Cependant, il constitut un modèle particulièrement intéressant pour l'étude de la pénétration et de l'efficacité des antibiotiques sur les bacilles retrouvés dans les lésions [238].

Modèles cochon d'Inde et lapin

L'utilisation du lapin et du cochon d'Inde permet de reproduire plus fidèlement la physiopathologie de la tuberculose, notamment en raison de leur capacité à former des granulomes structurés et hypoxiques. Les lésions observées chez ces animaux peuvent être solides ou caséeuses, avec une proportion très similaires à celles retrouvées chez le primate non humain [240].

Chez le cochon d'Inde, l'infection par *M. tb* se traduit par une charge pulmonaire élevée, qui entraîne une tuberculose rapidement progressive, même après une infection à faible dose. Cela rend le modèle peu adapté pour étudier la LTBI. Les animaux développent des granulomes caséeux bien organisés, avec un centre nécrotique entouré de macrophages, cellules géantes multinucléées, lymphocytes et d'une capsule fibreuse, très similaire à ce que l'on observe chez l'Homme. Dans certains cas, des cavitations pulmonaires peuvent également être observées [241].

Chez le lapin, l'infection est très hétérogène. Après inoculation, les bacilles se répliquent dans les poumons, avant que le nombre de CFU ne diminue progressivement, en parallèle d'une résolution partielle des granulomes. Les lapins peuvent présenter différents stades de la maladie, allant de la tuberculose active à une forme latente, et à la réactivation en présence d'immunosuppresseurs [242]. Ce modèle est également très utilisé pour évaluer la distribution des antibiotiques dans les différentes lésions [243].

Modèle du primate non humain (NHP)

Le primate non-humain est le modèle le plus fidèle de la physiopathologie humaine de la tuberculose.

Chez ces animaux, l'infection à *M. tb* reproduit l'ensemble des formes cliniques observées chez l'Homme, allant de la tuberculose active à une forme latente, avec des états intermédiaires de contrôle immunitaire. Lors d'une infection à faible dose, environ la moitié des animaux développent une infection latente, caractérisée par l'absence de symptômes cliniques, une réaction positive au test tuberculinique et la présence de granulomes organisés et hypoxiques avec des zones caséeuses et fibreuses [244,245].

Cependant, ce modèle d'un point de vue éthique, temps et coût ne peut être utilisé que pour évaluer les antibiotiques ou vaccins candidats lorsqu'ils sont en développement clinique [236].

Les modèles *in vitro* permettent de reproduire de manière contrôlée les conditions de stress que peuvent rencontrer les bacilles, et permettent de comprendre comment les bactéries s'adaptent et comment cela se traduit en présence d'antibiotiques. Les modèles *in vivo* permettent chacun d'étudier des aspects précis de la maladie (réponse immunitaire, différentes lésions, LTBI, TB active). Chaque modèle présente des avantages et des limites, en termes de pertinence physiologique, de reproductibilité, contrôlabilité et de complexité de mise en œuvre [80].

C. Bacilles Tuberculeux Différentiellement Cultivables (DCTB)

1. Définition

Les bacilles tuberculeux différentiellement cultivables (DCTB, *Differentially Culturable Tubercle Bacilli*) représentent une catégorie particulière des bactéries VBNC. Comme leur nom l'indique, le terme DCTB est réservé aux souches de *Mycobacterium tuberculosis*, même si des bactéries différentiellement cultivables peuvent être retrouvées dans d'autres espèces de mycobactéries, chez *Escherichia coli* et certaines espèces de *Vibrio* [170].

Contrairement aux VBNC, qui englobent des bactéries dont la reprise de croissance peut être obtenue par la simple levée du stress, les DCTB requièrent la présence de facteurs exogènes, notamment retrouvés dans le surnageant de culture de *M. tb*, pour redevenir cultivables dans des milieux de culture standards [104]. Dans certaines études, les bactéries capables de se répliquer uniquement en milieu liquide, alors qu'elles ne forment pas de CFU, sont également considérées comme une population de DCTB [246].

Les bactéries non réplicatives générées dans la plupart des modèles peuvent redevenir cultivables à la levée du stress, et ne correspondent pas à l'état DCTB. Néanmoins, la présence des DCTB a pu être mise en évidence sur des modèles *in vitro* [247], chez la souris [248,249], puis chez les humains [103,104].

Concernant les modèles *in vitro*, c'est principalement dans le modèle en phase stationnaire avancée que sont générés les DCTB, même s'ils sont parfois détectés dans les autres modèles de dormance [173].

2. Facteurs de réveil

Les DCTB nécessitent des facteurs exogènes pour restaurer leur croissance, qui sont notamment retrouvés dans le surnageant de culture (CF : *culture filtrate*) de *M. tb*. En effet, le surnageant de culture permet d'augmenter considérablement la détection des bacilles issus d'échantillons cliniques [103,104,250]. Ces facteurs sont d'origine protéique, lipidique et métabolique, et interagissent entre eux pour relancer la croissance de *M. tb*.

a. Protéines Rpfs (*Resuscitating-Promoting Factor*)

La découverte de ces molécules trouve son origine dans les travaux de Mukamolova et al, sur *Micrococcus luteus*, où une molécule sécrétée par des cellules en croissance a été identifiée comme nécessaire au réveil de bactéries dormantes. Cette protéine, nommée Rpf (*Resuscitating-Promoting Factor*), est active à des concentrations picomolaires et indispensable à la croissance de très faibles inocula de *M. luteus* [251].

Des homologues de cette protéine ont été retrouvés chez d'autres Actinobacteria, comme *Mycobacterium, Corynebacterium* et *Streptomyces* [251]. *M. tb* et *M. bovis*, codent pour cinq genes homologues (RpfA-E), tandis que *M. smegmatis* ne code que pour quatre [252]. Elles sont requises pour initier la croissance de mycobactéries issues de culture en phase stationnaire prolongée [177].

Les protéines Rpfs partagent un domaine conservée de 70 acides aminés, qui correspond au domaine catalytique (**Figure 22**). Certaines ont également une séquence signal, un domaine transmembranaire et un domaine d'attache au peptidoglycane, suggérant que

certaines d'entre elles peuvent être sécrétées et d'autres attachées à la surface de la paroi [252].

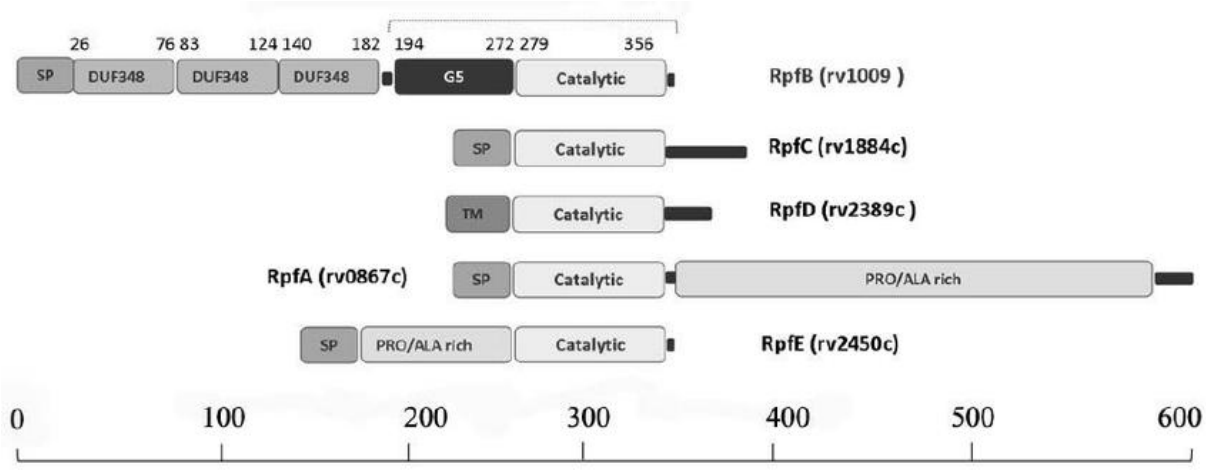


Figure 22 : Protéines Rpfs retrouvées chez *M. tb* [177].
L'organisation des domaines des protéines Rpfs a été définie par la base de données PFAM. Le domaine catalytique est le domaine conservé parmi les protéines Rpf.

La délétion individuelle des gènes *rpfA-E* n'affecte ni la croissance *in vitro*, ni la survie de *M. tb* chez la souris [248,249,253]. Toutefois, des mutants combinant trois gènes *rpf* délétés sont atténués pour leur virulence chez la souris et présentent une incapacité à se réveiller spontanément après une hypoxie prolongée, suggérant que ces protéines agissent de manière collective, et ne sont pas strictement redondantes [248]. Certaines protéines Rpf ont des importances différentes selon le stress rencontré. RpfE semble plus importante que RpfD pour la survie et la réplication *in vivo*, tandis que RpfB et RpfE sont essentielles pour le réveil [249]. Dans une autre étude, la délétion de *rpfB* entraîne une incapacité de réactivation de *M. tb* chez la souris [253], de même le double mutant *rpfA/B* est aussi affecté pour sa capacité à persister dans un modèle d'infection chronique et présente des colonies moins rugueuses [254]. D'ailleurs, les Rpfs sont exprimées au moment de la phase de réveil des bactéries, puis leur expression diminue [211,255]. Elles sont également induites pendant l'infection [211].

Les souches de *M. tb* qui sont délétées pour les 5 gènes Rpfs présentent une sensibilité accrue à certains antibiotiques, dont la vancomycine et l'érythromycine [256]

Les protéines Rpfs ont une activité muralytique, avec un domaine catalytique similaire à celui des lysosymes et transglycosylases lytiques. Elles peuvent cliver le peptidoglycane au niveau des liaisons β-1,4 glycosidiques, situées entre la N-acétylglucosamine et l'acide N-acétylmuramique [257]. La protéine RpfB peut se fixer à l'enzyme RipA, une L,D-

endopeptidase qui clive entre le pont peptidique entre le D-glutamate et l'acide mésodiaminopimelique du peptidoglycane. Leur action conjointe libère des muropeptides, tels que l'anhydroGMDP qui peut induire le réveil de *M. smegmatis* dans un état dormant [257].

Ainsi, deux modes d'action des Rpfs peuvent être proposés. Le premier pourrait être le clivage des bacilles à la fin de leur division. Le deuxième concerne les muropeptides générés par l'action des Rpfs sur le peptidoglycane, qui pourraient eux-mêmes agir en tant que molécules inductrices du réveil [246,258]. En faveur de cette deuxième hypothèse, le domaine extra-cytoplasmique de la kinase PknB de *M. tb* est capable de se lier à des muropeptides. Le rôle de cette kinase pourrait être d'activer une voie impliquée dans la division cellulaire ou la synthèse de la paroi [259].

Néanmoins, un surnageant généré par une souche délétée des cinq gènes *rpfs* est toujours capable de stimuler l'induction du réveil, ce qui suggère l'existence d'autres facteurs [103,250].

b. Facteurs lipidiques

Plusieurs composants lipidiques participent au réveil de *M. tb*. Zhang et al. ont montré que des phospholipides, tels que la phosphatidyl-L-sérine, la phosphatidylcholine et la phosphatidyléthanolamine pouvaient augmenter de cent à mille fois la formation de CFU dans des cultures âgées de *M. tb* H37Ra, alors que la présence des phospholipases A2 et C inhibe cet effet. Des peptides dérivés de la protéine Rv1174 ont également un effet sur ce phénotype [260].

Chez *M. smegmatis*, l'ajout d'acides gras insaturés (acide arachidonique, acide linoléique, acide oléique) favorisent le réveil dans un modèle de carence en potassium [261].

c. L'AMPc

Chez *M. smegmatis*, l'ajout d'acides gras insaturés entraîne une augmentation de l'AMPc intracellulaire. Chez *M. smegmatis* et *M. tb*, l'addition d'AMPc ou dibutyryl-AMPc entraîne le réveil dans un modèle de carence en potassium. En revanche, un mutant déficient en

adényl-cylase perd la capacité de réveil induite par les acides gras insaturés, mais conserve celle induite par l'ajout d'AMPc exogène [261].

La surexpression de l'adényl-cyclase Rv2212 empêche l'induction d'un état non réplicatif, accélère la reprise de croissance après la phase stationnaire et entraîne une virulence accrue chez la souris [262]. Par ailleurs, un inhibiteur des Rpfs empêche le réveil induit par les acides gras [261,262].

Les régulateurs transcriptionnels Cmr et CPRMt, agissant respectivement sur l'expression des gènes du régulon DosR et l'expression de la biosynthèse des acides aminés et de *rfpA* sont sensibles à la concentration d'AMPc intracellulaire [246].

L'ensemble de ces études suggèrent une connexion entre le réveil induit par les Rpfs, les acides gras et l'AMPc.

d. Métabolisme énergétique

Le réveil s'accompagne d'une mobilisation des réserves énergétiques accumulées pendant la dormance. Dans le modèle d'hypoxie, la dégradation des triglycérides est essentielle à la reprise de croissance, tandis que l'inhibition des lipases empêche le réveil chez *M. bovis* [263].

De même, la dégradation du tréhalose, grâce à la tréhalase, fournit une source de carbone et d'énergie à la bactérie lors du réveil. Une construction de *M. smegmatis* bloquée pour l'hydrolyse du tréhalose a un réveil retardé dans le modèle de stress acide [264].

e. Théories sur le réveil

Pour expliquer les phénomènes de réveil spontané, Epstein a proposé que le réveil soit un phénomène stochastique. Une fraction aléatoire de cellules sort de dormance, si l'environnement n'est pas permissif elles meurent, alors que si l'environnement est permissif elles se multiplient et sécrètent des molécules pour réveiller les autres [265].

Certains suggèrent que les bactéries non cultivables ne vont être réveillables que pendant une période déterminée après l'entrée dans cet état. Au-delà, elles restent viables mais ne sont plus réveillables [170].

3. En clinique

a. Chez les patients

Les DCTB ont été détectés pour la première fois chez l'Homme par Mukamolova et al. [104]. Cette population représente en réalité la majorité des bacilles retrouvés dans le *sputum* (expectorations) des patients atteints de tuberculose. En effet, entre 80 et 99,99% des bacilles présents dans les expectorations de patients avant la thérapie antituberculeuse se révèlent dépendants de l'ajout de CF ou de Rpfs pour leur détection [103,104]. Cette proportion augmente au cours du traitement, traduisant leur sensibilité réduite à la thérapie antituberculeuse [104,266,267].

Les DCTB sont également présents dans les aérosols des patients, représentant parfois la seule population détectable dans ces échantillons [268]. Ces bactéries sont retrouvées dans les diverses formes cliniques de la tuberculoses (pulmonaire et extrapulmonaire) [269] et sont générées par diverses souches et lignées de *M. tb* [270,271], y compris les souches multi-résistantes [272].

Les expectorations de patients ressemblent à une forme de biopsie, avec des bacilles issus de plusieurs micro-environnements pulmonaires (cavités, lésions, granulomes). C'est un mélange hétérogène, qui peut se traduire chez les DCTB par leur dépendance à différents facteurs de réveil [273]. La détection et quantification des populations DCTB s'effectue par le test de MPN (*Most Probable Number*), qui correspond à une méthode de dénombrement bactérien en milieu liquide [103,274].

Ainsi, différentes sous-populations de DCTB peuvent être distinguées en fonction des facteurs de réveils nécessaires à leur croissance (**Figure 23**) : i) les CF-dépendants, qui dépendent de l'ajout de surnageant de culture ; ii) les Rpf-indépendants, qui se développent dans un surnageant de culture dépourvu des cinq protéines Rpfs ; iii) une population mixte avec des CF-dépendants et Rpf-indépendants (majoritaire) ; iv) les CF-indépendants, qui initient leur croissance dans un milieu liquide standard, sans ajout de CF ; et celles qui ne forment pas de DCTB [103,273].

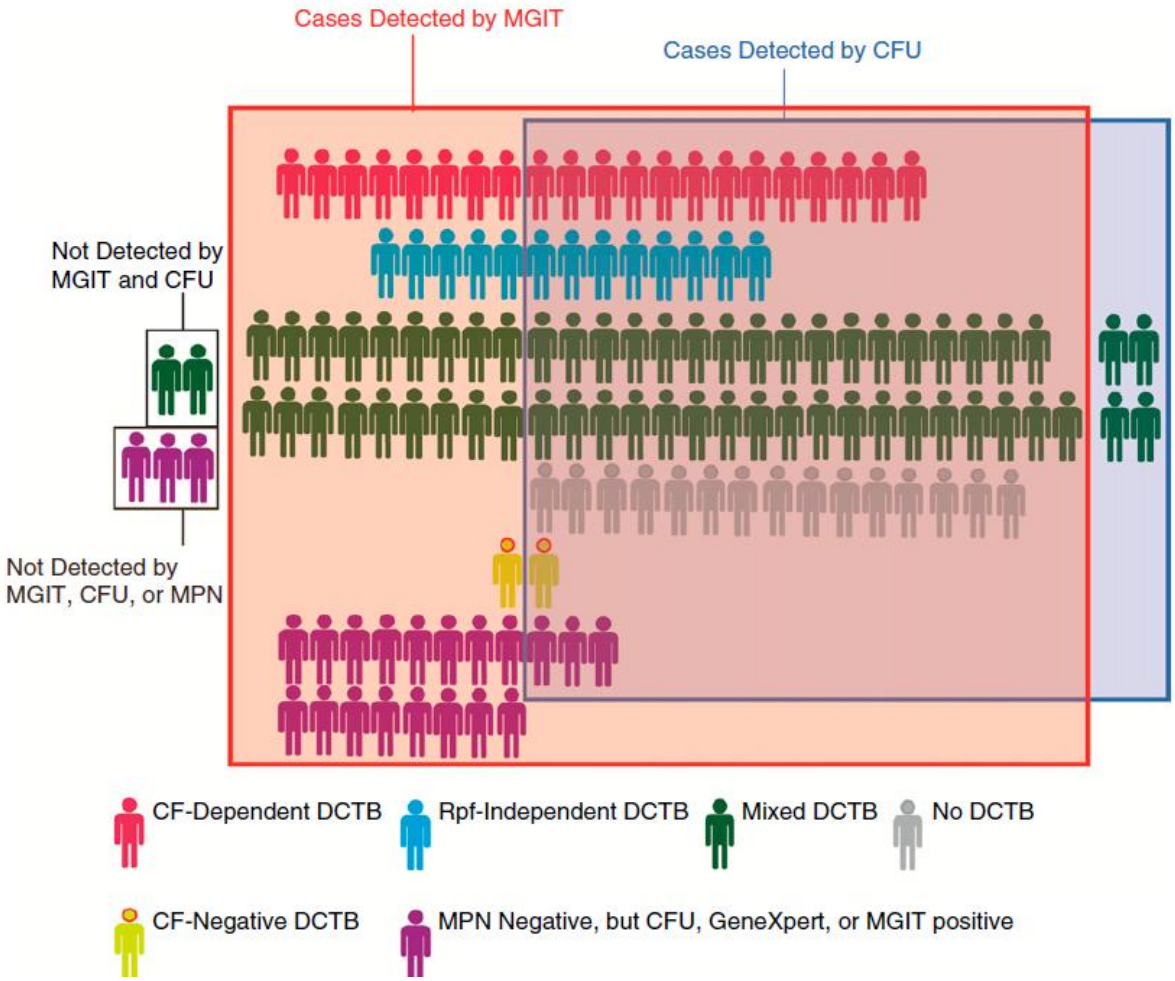


Figure 23 : Représentation de la multitude de populations de DCTB pouvant être détectée chez les patients [273].
CF-Dependant DCTB : qui dépendent de l'ajout de surnageant de culture ; Rpf- Independant DCTB : qui se développent dans un surnageant de culture dépourvu des cinq protéines Rpfs ; Mixed DCTB : qui comprend des CF-dépendants et Rpf-indépendants ; CF-Negative : qui initient leur croissance dans un milieu liquide standard, sans ajout de CF ; No DCTB : qui ne forment pas de DCTB.

Les bacilles issus des *sputa* sont peu sensibles aux antituberculeux de première ligne. Concernant les DCTB spécifiquement, ils présentent une tolérance accrue à l'isoniazide, la streptomycine et la rifampicine [104,275].

b. Risques associés à la présence de DCTB

La présence de bacilles tuberculeux différentiellement cultivables chez les patients pose plusieurs problèmes en clinique, notamment en lien avec le diagnostic, la tolérance aux traitements, le risque de rechutes et le développement de résistances.

Les DCTB sont une cause importante de sous-estimation de la détection bacillaire dans les échantillons cliniques. Un des tests standards utilisé pour le diagnostic est la culture

liquide MGIT, qui ne permet pas de détecter ces populations puisqu'elles nécessitent l'ajout de facteurs exogènes pour croître. Ainsi, une étude rapporte qu'à la fin du traitement antituberculeux 93% des patients sont déclarés négatifs, alors qu'un test MGIT réalisé en présence de CF ou de Rpfs permet de détecter des DCTB dans 74% de ces mêmes patients [276]. En effet, l'ajout de filtrat de culture améliore significativement la sensibilité des tests diagnostiques, en permettant la réduction du temps de détection (TTP, *Time to Positivity*) dans les tests MGIT ou le nombre de cycles requis dans le test GeneXpert [103,271].

La majorité des études sur les DCTB sont réalisées chez des patients culture ou *smear* (détection par microscopie) positifs, mais il serait intuitif de penser que les patients porteurs d'une LTBI contiennent une proportion encore plus élevée de bacilles non cultivables. Cependant, aucune corrélation n'a été montrée entre la présence de DCTB et le statut de positivité des échantillons chez les patients [271].

La présence des DCTB est considérée comme l'une des principales causes de la durée prolongée du traitement antituberculeux [200]. Bien que les traitements permettent l'élimination de cette population, celle-ci est plus lente que pour les populations formant des CFU [272]. Ainsi, les DCTB constituent une population plus tolérante aux antibiotiques, qui pourrait favoriser l'évolution vers la résistance. Des travaux réalisés sur *Escherichia coli* ont montré que la tolérance précède et favorise l'émergence de résistances aux antibiotiques [277]. Chez *M. tb*, des mécanismes liant tolérance et résistance ont été suggérés : des variations de phase dans *glpk*, une mistraduction protéique, des modifications du métabolisme du propionate et un changement de l'utilisation des sources de carbone en réponse à l'hypoxie. Par ailleurs, l'inhibition de l'activation du régulon de dormance de DosR supprime la tolérance à l'isoniazide. Le système immunitaire peut lui aussi favoriser l'apparition de la tolérance créant des micro-environnements peu favorables à la croissance de *M. tb*, favorisant son entrée dans des états non réplicatifs [80].

Néanmoins, bien que les DCTB soient retrouvés aussi bien chez des patients infectés par des souches sensibles que résistantes, leur physiologie pendant l'état DCTB semble différer. Les DCTB issus de souches multi-résistantes semblent plus facilement réveillables sans ajout de CF ou de Rpfs, et leur proportion n'augmente pas au cours du traitement, contrairement aux souches sensibles [267,272]. De plus, les DCTB formés par des

souches MDR seraient plus facilement éliminés à l'issue du traitement que ceux des patients sensibles [267].

Plusieurs études suggèrent que la présence de DCTB à l'issue du traitement pourrait être à l'origine des rechutes. Cependant, les données cliniques restent trop limitées dans le nombre de patients suivis pour établir un lien clair [267,276]. Néanmoins, dans le modèle de Cornell, des souris traitées ne présentant plus de DCTB à la fin du traitement antituberculeux n'ont présenté aucune rechute, contrairement à celles chez lesquelles les DCTB étaient encore détectables [278].

Dans l'ensemble, les DCTB constituent un réservoir de bactéries important chez les patients avant ou après thérapie, difficiles à détecter par les méthodes de diagnostic standards, réagissant faiblement aux traitements et potentiellement impliqués dans la rechute et l'émergence de résistances. Une meilleure compréhension et caractérisation de cette population, ainsi qu'une amélioration de leur détection pourrait permettre de mieux diagnostiquer les patients, prédire la réponse au traitement et adapter la durée thérapeutique à chaque patient [80].

D. Stratégies ciblant les bactéries non réplicatives

L'association des formes non réplicatives de *M. tb* à la persistance lors du traitement représente l'un des principaux obstacles à la stérilisation complète de l'infection. Certains patients porteurs d'une infection latente présentent un fort risque de rechute, notamment en cas de co-infection par le VIH, de traitement immunosuppresseur ou chez les enfants de moins de cinq ans cas contacts. Au-delà de ces populations à risque priorisées pour recevoir un traitement, des approches combinant imageries cliniques et marqueurs de réponse immunitaire sont explorées afin de prédire l'évolution vers une infection active. Des stratégies préventives ciblant les cas contacts de tuberculose MDR ou les porteurs de LTBI sont également explorées, avec des régimes plus courts à base d'un seul antibiotique [80].

Historiquement, les antibiotiques présentant la meilleure activité de stérilisation, évaluée dans des modèles murins, sont la rifampicine et le pyrazinamide. Aujourd'hui, de nouveaux antituberculeux comme la bédaquiline, le délamanide, le prétomanide et la moxifloxacine montrent une bonne efficacité contre les formes non réplicatives, et sont

ajoutés dans les schémas thérapeutiques. Une stratégie thérapeutique alternative proposée serait de réveiller les bacilles dormantes tout en traitant avec un antibiotique à activité bactéricide rapide, comme l'isoniazide [78].

De nouvelles molécules efficaces contre les formes non réplicatives de *M. tb* sont en phase de développement pré-clinique [279].

- CPZEN-45 : inhibiteur de la synthèse de l'arabinogalactane
- Nitrobenzothiazinone (BTZ-043) : cible DprE1, enzyme impliquée dans la synthèse de l'arabinogalactane.
- Thioquinazoline (CBR3465) et 2-mercaptoquinazolinones : inhibiteurs de la NADH déshydrogénase-2, impliquée dans le maintien de l'équilibre redox.
- Allylaminométhanone-A et 7-methoxy-2-naphthol : inhibiteurs de la biosynthèse des ménaquinones, intermédiaires essentiels de la chaine respiratoire.
- Salicylanilide esters : inhibiteurs de l'isocitrate lyase (ICL), enzyme clé du shunt du glyoxylate, surexprimée dans les modèles de dormance de *M. tb*,
- HC106A : inhibe le système DosR/S/T, impliqué dans la réponse à l'hypoxie.
- Analogues du PDKA : ciblent la synthèse du malate, impliqué dans la seconde étape du shunt glyoxylate.

Parallèlement, des criblages de molécules sont toujours effectués sur les modèles de bactéries non réplicatives pour identifier des molécules actives contre ces populations [160].

Le développement de vaccins utilisant des antigènes induit pendant la dormance pourrait également être une stratégie prometteuse. Le vaccin RUT1, administré après le début de la thérapie vise à stimuler l'immunité pour faciliter l'élimination de bacilles persistants [78]. Il est composé d'un fragment de *M. tb* cultivé en conditions de stress et carence, donc enrichi en antigènes de dormance [279]. A l'inverse, le vaccin H56 composé des antigènes Ag85B, ESAT-6 (induits pendant la phase réplicative) et Rv2660c (induit lors de la carence en nutriments) a été conçu pour empêcher le réveil des formes latentes [78]. Malheureusement, il n'a pas démontré d'efficacité lors des premières phases cliniques [280].

Des nouvelles approches dites de *Host-Directed Therapy* (HDT) visent à moduler la réponse immunitaire de l'hôte, par exemple en désorganisant le granulome afin de permettre un meilleur accès des antibiotiques au bacille [80,160]

Enfin, des stratégies de profilage transcriptomique des bactéries dormantes dans leur niche cible, combinées à des modèles prédictifs *in silico*, sont aussi utilisées, pour permettre d'identifier de nouvelles cibles thérapeutique et d'optimiser la pénétration et la puissance des antituberculeux en fonction de leur environnement cible [80].

L'ensemble de ces stratégies, qu'elles visent à éliminer, réveiller ou prévenir la formation des formes non réplicatives de *M. tb* ont un même objectif qui est d'atteindre une stérilisation complète de l'infection. En ciblant spécifiquement les bacilles dormants, ces approches ont également pour objectif de raccourcir les traitements extrêmement longs utilisés dans le cadre de la thérapie antituberculeuse.

OBJECTIFS DE LA THESE

L'analyse microbiologique des expectorations de patients atteints de la tuberculose montre que la majorité de la population de *Mycobacterium tuberculosis* se trouve dans un état différentiellement cultivable, pouvant parfois représenter plus de 99,99% des bacilles présents [103,104]. Cette population est d'autant plus importante à étudier qu'elle présente une tolérance accrue aux antibiotiques [104,275] et peut rester présente à l'issue du traitement antituberculeux, entravant la stérilisation complète des patients (**Figure 24**) [276]. Aujourd'hui, les seuls modèles *in vitro* permettant d'obtenir cette population sont très long à mettre en place et peu standardisés.

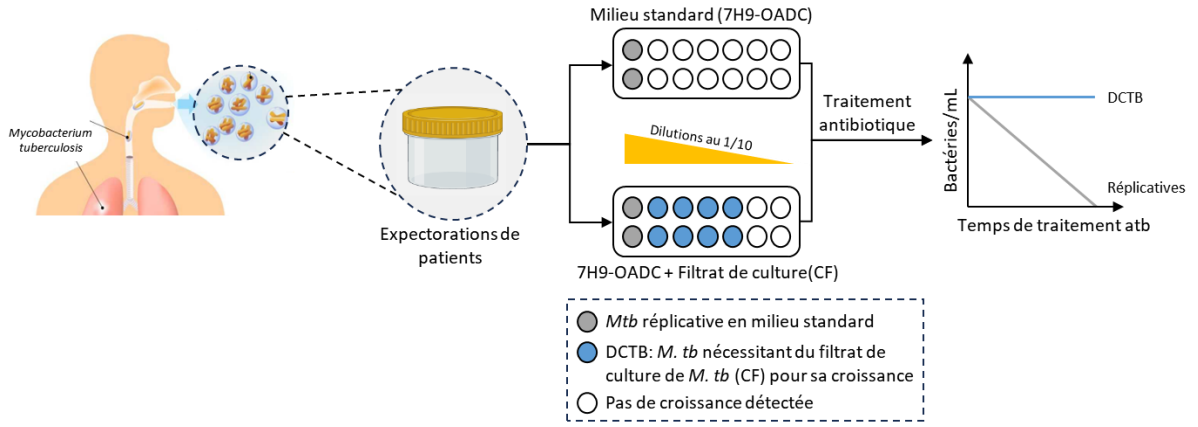


Figure 24 : Représentation schématique des différentes populations de *M. tuberculosis* présentes dans le *sputum* des patients et de leur profil de sensibilité aux antibiotiques.
Mycobacterium tuberculosis a été isolée à partir des expectorations de patients, puis diluée et cultivée dans un milieu standard (7H9-OADC) seul, ou supplémenté avec 50% de filtrat d'une culture de *M. tb* H37Rv (CF). Les bactéries réplicatives (gris) sont celles capables de pousser dans le milieu standard seul, tandis que les mycobactéries différentiellement cultivables (DCTB, bleu) ne révèlent leur croissance qu'en présence de CF. Lorsqu'elles sont testées *in vitro*, les bactéries réplicatives apparaissent sensibles aux antibitiques, alors que les DCTB présentent une tolérance globale. Schéma adapté de Chengalroyen et al., 2016 [103].

Dans ce contexte, le premier objectif de cette thèse est de développer un modèle *in vitro* de *Mycobacterium tuberculosis* différentiellement cultivable. Ce modèle doit permettre de générer des bacilles non cultivables dans les milieux standards de culture, mais capables d'initier leur croissance au contact du surnageant d'une culture de *M. tb*, reproduisant ainsi les caractéristiques des populations observées chez les patients. Ce modèle, une fois développé, sera optimisé afin d'être miniaturisable, robuste et stable, pour constituer un outil solide pour l'étude des mécanismes de dormance et de réveil de *M. tuberculosis*.

S'appuyant sur ce modèle, le second objectif est d'en réaliser une caractérisation, à la fois phénotypique et génétique. La cytométrie en flux permettra d'examiner de plus près les marqueurs phénotypiques des DCTB et les dynamiques de la population au cours du

temps. En parallèle, une approche de criblage génétique à grande échelle, basée sur la technologie CRISPRi (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats interference*), sera mise en œuvre afin d'identifier des déterminants génétiques impliqués dans le maintien et le réveil de ces bacilles différentiellement cultivables. En complément, un criblage de composés à haut-débit sera réalisé afin d'identifier des petites molécules capables d'induire le réveil DCTB. Les composés sélectionnés pourraient présenter un double intérêt : i) améliorer la sensibilité des tests diagnostiques en favorisant la détection de bacilles non cultivables ; et ii) être potentiellement capables de restaurer la pleine sensibilité des bacilles aux antituberculeux, en les amenant dans un état pleinement réplicatif.

Enfin, au cours du développement du modèle DCTB, nous avons observé des différences marquées dans la capacité de formation des bacilles différentiellement cultivables entre des souches de *M. tuberculosis* appartenant à différentes lignées phylogénétiques. Le troisième objectif vise à caractériser les déterminants génétiques susceptibles d'expliquer ces variations interlignées observées.

CHAPITRE 1

DEVELOPPEMENT D'UN MODELE *IN VITRO* DE DCTB

Le premier objectif du projet est le développement d'un modèle *in vitro* permettant l'obtention d'une population de *Mycobacterium tuberculosis* différentiellement cultivable (DCTB : *Differentially culturable Mycobacterium tuberculosis*), suffisamment robuste et facile à mettre en œuvre pour étudier l'effet de perturbations chimiques ou génétiques de cet état. Pour qu'une population de *M. tuberculosis* soit considérée dans un état DCTB, elle doit répondre à deux caractéristiques : 1) ne pas se répliquer dans un milieu de culture standard des mycobactéries ; 2) être capable de se répliquer à nouveau si l'on ajoute du surnageant provenant d'une culture indépendante de *M. tb* (CF : *culture filtrate*) dans le même milieu.

En 1999, Sun et Zhang ont mis en évidence l'existence de cette population dans une culture de *Mycobacterium tuberculosis* maintenue en phase stationnaire avancée pendant plus de huit mois. Après dilution de cette culture, les différents inocula ne présentaient plus de croissance en milieux liquide et solide, au-delà d'une dilution supérieure à cent fois. Cependant, un contact de deux semaines avec du surnageant de culture permettais de restaurer la capacité de croissance, y compris à partir d'inocula dilués plus de 10 000 fois [216]. Depuis cette observation, quelques travaux ont utilisé des cultures en phase stationnaire prolongée pour obtenir des bacilles à l'état non réplicatif en milieu standard, redevenant réplicatifs en présence de CF, correspondant ainsi à la définition de DCTB. Ce modèle reste toutefois peu utilisé pour étudier les formes non réplicatives, sa principale limite étant sa durée, puisqu'il faut des mois pour obtenir les bactéries. Ainsi, la plupart des travaux privilégient le modèle de dormance de Wayne, où l'hypoxie induit un état non réplicatif réversible à la réoxygénation [182]. Ce modèle ne reflète cependant pas exactement les DCTB cliniques, car il ne requiert par l'ajout de CF pour restaurer la réplication.

I. Principe du modèle

A. Cinétique d'obtention des DCTB

La génération de DCTB dans une culture en phase stationnaire prolongée, telle que mis en évidence par Sun et Zhang [216], est une approche intéressante mais peu compatible avec un projet de thèse, à cause du temps qu'il faut pour obtenir ces bacilles. Toutefois, ces travaux ont montré que *M. tb* peut entrer dans un état non réplicatif naturellement dans une culture *in vitro*, sans l'ajout d'un stress externe. En partant de cette observation, nous nous sommes interrogés sur la possibilité raccourcir la durée de la culture. Ainsi, une cinétique de comptage des DCTB nous permettra de regarder l'apparition de cette population en fonction de l'âge de la culture.

Le test MPN (*Most Probable Number*) est utilisé pour distinguer les bactéries réplicatives des DCTB dans la culture. C'est une méthode de comptage en milieu liquide qui se base sur des dilutions en séries de l'échantillon de départ, effectuées en réplicat, et qui suit le postulat que la présence d'une bactérie dans la dilution entraînera une croissance détectable après incubation [274]. Ainsi, effectuer ce test dans le milieu standard, 7H9-OADC, donne une quantification des bactéries réplicatives uniquement, alors qu'en présence de surnageant d'une culture indépendante de *M. tb* l'ensemble de la population, dont les DCTB, sera énumérée (**Figure 25**). L'enrichissement de la culture en DCTB peut être calculé en divisant le nombre de *M. tb* total (milieu + CF) par le nombre de *M. tb* réplicatifs (milieu).

Le surnageant de culture utilisé tout au long de ce projet est issu de cultures de *M. tb* H37Rv, sauf indication contraire. Filtré deux fois à travers une membrane de 0.22 µm, sa stérilité est ensuite vérifiée par incubation sur milieu solide et en milieu liquide pendant 2 mois.

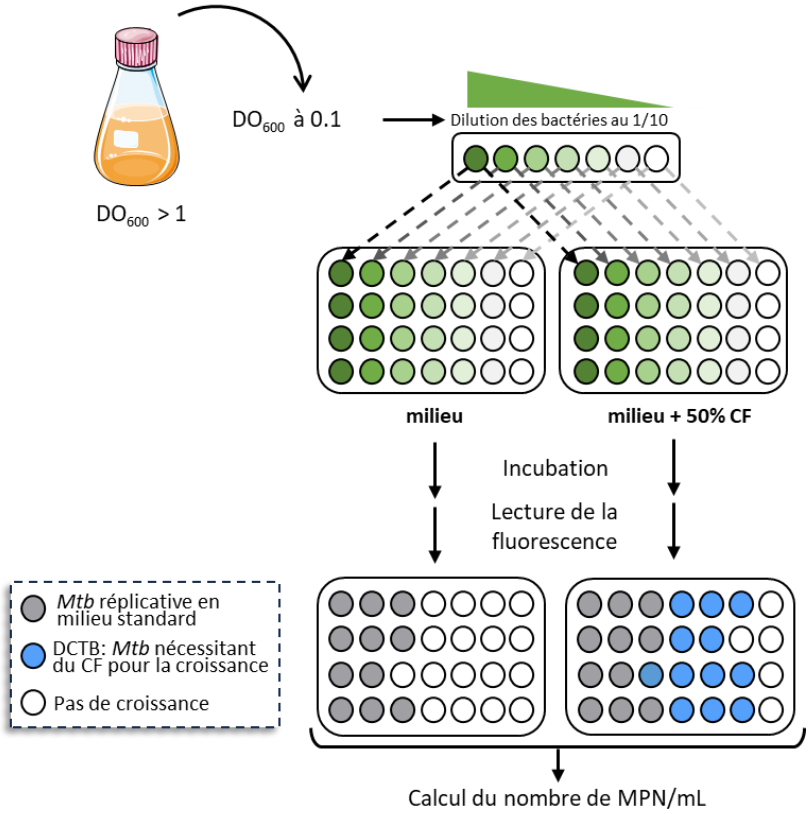


Figure 25 : Méthode d'évaluation de la cultivabilité et d'estimation de la proportion de bactéries réplicatives et DCTB dans une culture de *Mycobacterium tuberculosis*.
Une culture de *Mycobacterium tuberculosis* est ajustée à une DO_{600} de 0,1 afin de permettre la comparaison entre différentes expériences. L'échantillon est ensuite dilué en série (vert) et cultivé dans un milieu standard (7H9-OADC) seul ou supplémenté avec 50% de surnageant (CF) d'une culture indépendante de *M. tb*, avec 4 à 6 réplicats techniques par condition. Les plaques sont incubées pendant 28 à 35 jours, puis la croissance est mesurée par lecture de la fluorescence GFP. Les bactéries réplicatives (gris) poussent dans le milieu standard seul, tandis que les bactéries différentiellement cultivables (DCTB, bleu) ne révèlent leur croissance qu'en présence de CF. Les puits sans croissance détectée apparaissent en blanc. Le comptage des puits positifs dans chaque condition permet d'estimer le nombre de MPN/mL pour chacune des populations.

La cinétique de comptage des bactéries réplicatives et DCTB a été menée sur la souche avirulente *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra. Pour cette expérience, le surnageant utilisé a été produit par *M. tb* H37Ra. Le comptage des MPN a été calculé après 35 jours de culture, correspondant au moment où aucun nouveau puit ne devenait positif entre deux lectures successives, espacées d'une semaine, suggérant que l'ensemble des puits contenant des bactéries réplicatives a été détecté, même pour les dilutions les plus faibles. Au cours des quatre premières semaines de culture, le nombre de DCTB est environ 10 fois supérieur à celui des bactéries réplicatives (**Figure 26**). Entre la cinquième et la sixième semaine, cet écart s'accentue pour atteindre un facteur d'enrichissement d'environ 1 000 fois. À partir de la septième semaine, la proportion se stabilise, avec environ 100 000 DCTB pour une bactérie réplicative. Ainsi, nous avons reproduit

l'obtention de DCTB dans une culture en phase stationnaire avancée, en utilisant une culture âgée de seulement 7 à 8 semaines. Cette expérience montre que la proportion de DCTB identifiée par Sun et Zhang dans les cultures âgées de 8 mois est en réalité déjà équivalente dans une culture âgée de seulement 7 à 8 semaines. Nous montrons d'ailleurs que le nombre de DCTB dans nos cultures ne progresse plus au cours des 4 semaines suivantes.

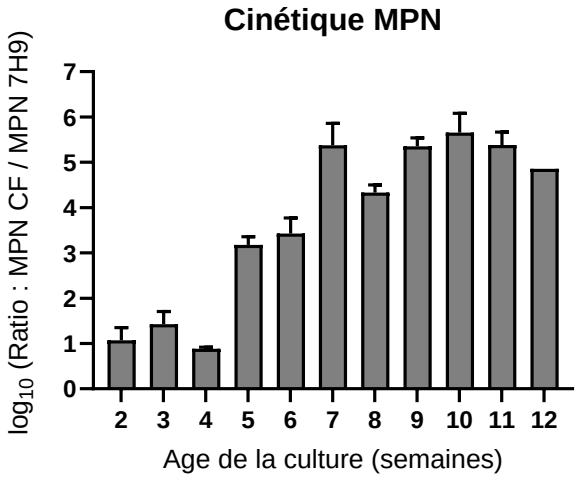


Figure 26 : Enrichissement en DCTB d'une culture de *M. tuberculosis* H37Ra au cours du temps.
Les cultures de *M. tuberculosis* H37Ra âgées de 2 à 11 semaines ont été diluées et inoculées dans un milieu 7H9-OADC ou 7H9-OADC supplémenté avec du surnageant (CF), afin de dénombrer respectivement les bacilles réplicatifs et totaux. Le nombre de bacilles a été déterminé à l'aide de la méthode du nombre le plus probable (MPN) après 35 jours d'incubation. Le rapport entre le MPN dans le milieu 7H9-OADC + CF et le MPN dans le milieu 7H9-OADC a été calculé afin d'estimer l'enrichissement en DCTB au fil du temps. Les données sont présentées sous forme de moyenne + écart-type de deux à quatre réplicats biologiques.

Nous avons ensuite répété cette procédure avec la souche *M. tuberculosis* H37Rv. Une culture a été incubée pendant huit semaines, et en parallèle une culture en fin de phase exponentielle (1 à 2 semaines) de croissance a également été testée. Comme précédemment, un comptage MPN a été réalisé, avec ou sans ajout de CF, permettant d'évaluer la proportion de DCTB dans les deux cultures. Pour la culture âgée de huit semaines, le facteur d'enrichissement en DCTB atteint environ 10 000 fois (**Figure 27**). En revanche, la culture en phase exponentielle de H37Rv semble beaucoup plus dépendante du surnageant que celle de H37Ra, avec un enrichissement de 2,5 logs en DCTB (**Figure 27**), contre 1 log chez H37Ra (**Figure 26**). Ainsi, notre modèle de DCTB peut être utilisé avec la souche virulente *M. tb* H37Rv.

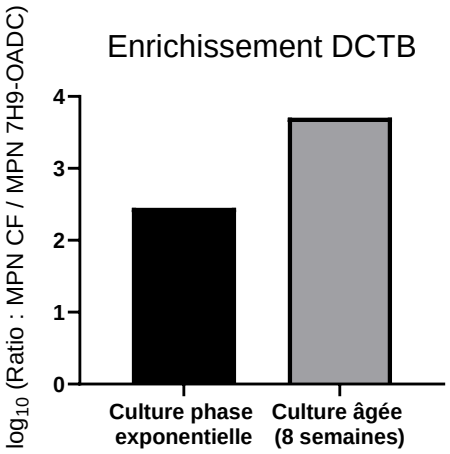


Figure 27 : Enrichissement en DTCB d'une culture de *M. tuberculosis* H37Rv en phase exponentielle de croissance ou âgée de 8 semaines.
Les cultures de *M. tuberculosis* H37Rv en phase exponentielle ou âgées de 8 semaines ont été diluées et inoculées dans un milieu 7H9-OADC ou 7H9-OADC supplémenté avec du surnageant (CF), afin de dénombrer respectivement les bacilles réplicatifs et totaux. Le nombre de bacilles a été déterminé à l'aide de la méthode du nombre le plus probable (MPN) après 28 jours d'incubation. Le rapport entre le MPN dans le milieu 7H9-OADC + CF et le MPN dans le milieu 7H9-OADC a été calculé afin d'estimer l'enrichissement en DCTB.

B. Obtention des DCTB par dilution

Comme les DCTB constituent la population majoritaire dans les cultures en fin de phase exponentielle de *M. tb* H37Rv (**Figure 27**), il devrait ainsi être possible de sélectionner cette population par simple dilution de ces cultures. Cette hypothèse est renforcée par des études indiquant qu'une culture initiée à partir d'un inoculum très faible présente une incapacité de croissance [281].

Nous avons donc utilisé une culture en fin de phase exponentielle de *M. tb* H37Rv (DO_{600} ~ 1), ajustée à une DO de 0.1, soit environ 10^7 bactéries/mL, puis réalisé une dilution sérielle au 1/10ème. Les inocula, allant de 10^7 à 10^2 bactéries/mL, ont été mis en culture dans du milieu 7H9-OADC, avec ou sans CF. Après 21 jours de culture, le signal GFP a été mesuré pour quantifier la croissance (**Figure 28**). Le surnageant de culture permet la croissance de tous les inocula, alors que les inocula inférieurs ou égaux 10^4 bactéries/mL présentent un défaut de croissance dans le milieu standard. Pourtant, en s'appuyant sur le fait que *M. tb* a un temps de génération de 24h, la croissance de tous les inocula aurait dû être détectée après 21 jours. Cette observation nous conforte dans le fait que nous avons correctement accumulé des DCTB dans nos cultures.

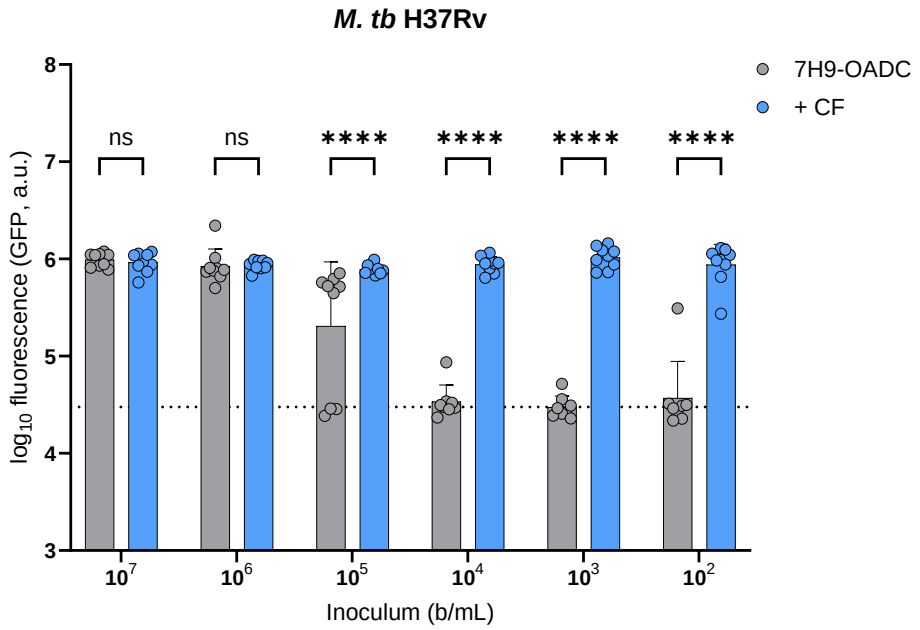


Figure 28 : Croissance de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv en milieu 7H9-OADC ou 7H9-OADC + 50% CF à différents inocula de départ.
L'intensité de fluorescence de la GFP a été quantifiée pour mesurer la croissance de divers inocula provenant de cultures en phase exponentielle de *M. tuberculosis* H37Rv dans du milieu 7H9-OADC ou du milieu 7H9-OADC supplémenté avec du surnageant de culture (+ CF), après 21 jours d'incubation. Chaque point représente la mesure issue d'un puit individuel. Les données sont présentées sous forme de moyenne + écart-type de trois réplicats biologiques. L'analyse statistique a été réalisée à l'aide d'une ANOVA à deux facteurs suivis d'un test de comparaisons multiples Sidak : ****, $p < 0{,}000001$; ns, non significatif.

II. La lignée 1, plus propice pour la formation des DCTB

Le complexe de *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC) est divisé en 9 lignées [42,52,54]. La souche de référence utilisée en laboratoire est *M. tb* H37Rv, qui appartient à la lignée 4. Cependant, il est établi que les différentes lignées du MTBC présentent des différences qui influent sur leur physiologie et leur pathogénicité [45,282].

Des travaux indépendants menés dans notre laboratoire ont montré que l'initiation des cultures des souches de lignée 1 nécessitait un inoculum plus important comparativement à *M. tb* H37Rv. Afin d'explorer si cette particularité pouvait être liée à une proportion plus élevée de DCTB dans ces cultures, nous avons testé la souche *M. tuberculosis* L1-500960 (collection BCCM, catalogue n°500960) selon le même schéma expérimental utilisé pour *M. tb* H37Rv, décrit ci-dessus. Comme observé pour *M. tb* H37Rv, tout inoculum situé dans une gamme de 10^7 à 10^2 bactéries/mL peut initier sa croissance lorsque le milieu est supplémenté en CF (**Figure 29**). En absence de CF, plus aucune croissance de *M. tb* L1-500960 n'est observée pour les inocula inférieurs à 10^6 bactéries/mL. Ainsi, la

concentration limite de l'inoculum permettant l'initiation de la croissance d'une culture de *M. tb* L1-500960 sans CF est 10 fois supérieure à celle observée pour *M. tb* H37Rv.

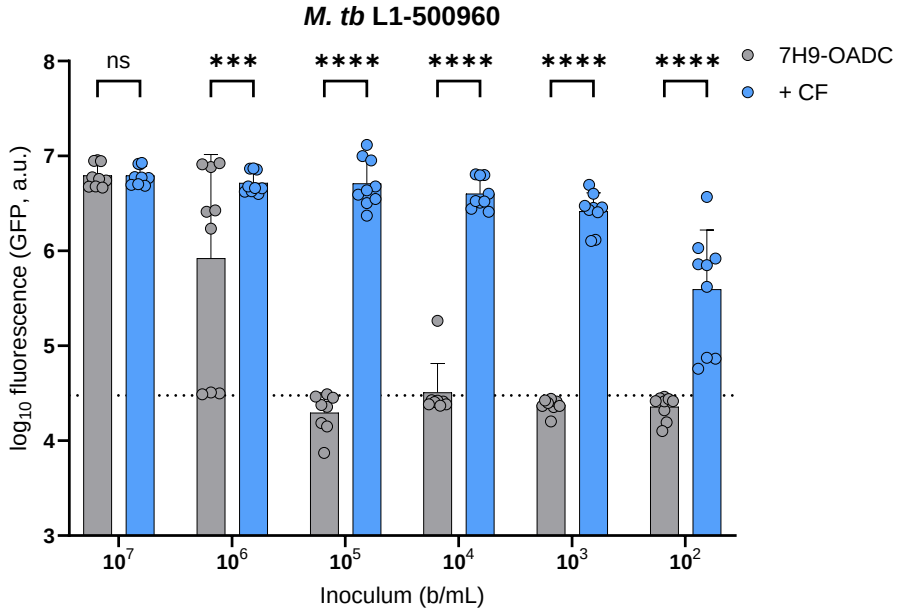


Figure 29 : Croissance de *Mycobacterium tuberculosis* L1-500960 en milieu 7H9-OADC ou 7H9-OADC + 50% CF à différents inocula de départ.
La fluorescence GFP a été utilisée pour mesurer la croissance de divers inocula provenant de cultures en phase exponentielle de *M. tuberculosis* L1-500960 dans du milieu 7H9-OADC ou du milieu 7H9-OADC supplémenté avec du surnageant de culture (+CF), après 21 jours d'incubation. Chaque point représente la mesure issue d'un puit individuel. Les données sont présentées sous forme de moyenne + écart-type de trois réplicats biologiques. La ligne pointillée représente le seuil de croissance positive, calculée comme suit : $(\text{médiane}_{\text{ctlr.négatif}} + 3*\text{SEM}_{\text{ctlr.négatif}})*2$. L'analyse statistique a été réalisé à l'aide d'une ANOVA à deux facteurs suivis d'un test de comparaisons multiples Sidak : ***, $p < 0{,}00001$; ****, $p < 0{,}000001$; ns, non significatif.

Nous avons ensuite réalisé des comptages des sous-populations bactériennes (réplicatives et DCTB) pour les deux souches H37Rv et L1-500960. Lorsque l'on énumère les populations réplicatives et DCTB dans des cultures en fin de phase exponentielle de *M. tb* H37Rv et L1-500960, il apparaît nettement que cette dernière est beaucoup plus propice à la formation de DCTB (**Figure 30**). En effet, l'enrichissement en DCTB atteint environ 10^5 pour *M. tb* L1-500960, contre 10^3 pour *M. tb* H37Rv.

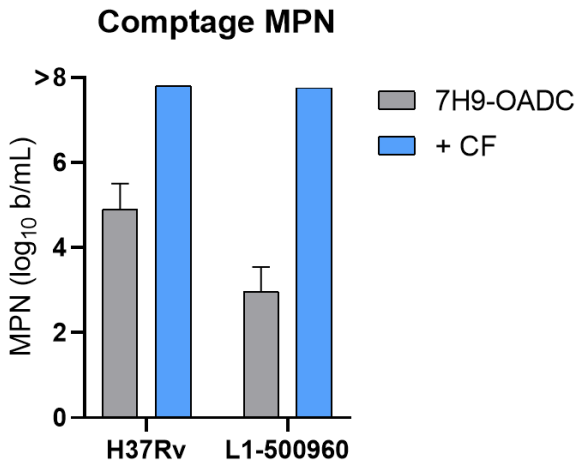


Figure 30 : Comptage MPN dans une culture en phase exponentielle de *M. tb* H37Rv et L1-500960. Comptages MPN issues des dilutions des souches de *M. tb* H37Rv et L1-500960 présentées dans les Figures 28 et 29 respectivement. Les données sont présentées sous forme de moyenne + écart-type de trois réplicats biologiques.

En conclusion, nos expériences indiquent que des cultures en fin de phase exponentielle de *M. tb* diluées sous la concentration de 10^5 bactéries/mL pour L1-500960 et 10^4 bactéries/mL pour H37Rv sont incapables de d'initier leur croissance en absence de CF. Ainsi, pour un même inoculum de départ, la culture de L1-500960 est plus enrichie en DCTB que celle de H37Rv, et devrait permettre de faciliter leur sélection par la méthode de dilution. En outre, aucun puit parmi les réplicats techniques ne montre de réveil pour une culture de *M. tb* L1-500960 inoculée à 10^3 ou 10^2 bactéries/mL en absence de CF (**Figure 29**), alors que dans ces mêmes conditions, quelques puits se sont réveillés dans le test effectué avec *M. tb* H37Rv (**Figure 28**). C'est pourquoi, *M. tb* L1-500960 semble être un outil plus robuste, présentant moins de réveil spontané en l'absence de CF et sera utilisé pour la mise au point du modèle d'obtention des DCTB. La dilution de 10^3 bactéries/mL est sélectionnée, puisqu'aucun puit ne montre de croissance en 7H9-OADC alors qu'en présence de CF, le signal atteint le maximum de fluorescence.

III. Mise au point des conditions

A. Standardisation du surnageant de culture

Tout d'abord, nous nous sommes intéressés au surnageant de culture, afin de standardiser son usage tout au long du projet.

Plusieurs études ont utilisé du surnageant de culture sur des échantillons cliniques ou sur une culture en phase stationnaire avancée, pour révéler la présence des DCTB. Dans ces études, le CF a été prélevé en milieu de phase exponentielle, jusqu'en début de phase stationnaire [104,216,247]. La phase de croissance influe très certainement sur la composition du surnageant. Ainsi, il est intéressant de regarder le réveil de nos DCTB en présence de surnageants prélevés à différents moments de la phase de croissance.

L'objectif est de déterminer la densité optique (DO) optimale à laquelle prélever le surnageant pour obtenir une efficacité de réveil maximale sur les DCTB. Pour cela, les CF ont été prélevés dans des cultures à différentes valeurs de densité optique à 600 nm (**Figure 31A**), puis dilués au ½, pour titrer les facteurs qu'ils contiennent. Chaque dilution de CF a été associée à une valeur de « DO correspondante », afin de pouvoir comparer l'efficacité des CF entre eux. Ensuite, chaque échantillon de surnageant a été testé sur *M. tb* L1-500960 en condition DCTB pour son activité de réveil pendant 35 jours, dans l'objectif d'observer leur efficacité maximale. Tous les CF issus de cultures avec une DO_{600} comprise entre 0.25 à 1 permettent un réveil maximal de la population DCTB (**Figure 31B**). Cette efficacité semble dépendante de la concentration en surnageant ajoutée, puisqu'un surnageant dilué entraîne une croissance plus faible des DCTB. On peut également suggérer que les facteurs de croissance présents dans les surnageant de cultures en phase exponentielle ont un potentiel de réveil similaire, puisque les courbes de réveil obtenues sont superposables. Le surnageant prélevé en phase stationnaire (DO_{600} = 2) permet également de réveiller les DCTB. Néanmoins, la courbe est décalée d'une dilution vers la droite, ce qui signifie qu'à « DO correspondante » équivalente, le potentiel de réveil de ce CF est diminué. Il est possible que ce CF contienne moins de facteurs de croissance, ou que des facteurs inhibiteurs de la croissance soient présents pendant cette phase. Le CF prélevé à DO_{600} 0.125 n'est quant à lui pas analysable, car le phénotype DCTB n'a pas été correctement maintenu dans les conditions contrôles.

Ainsi, pour les expériences présentées dans ce projet, nous utiliserons un surnageant issu d'une culture de DO_{600} 0.5 à 1, à une concentration finale de 50%, qui a montré la meilleure activité de réveil.

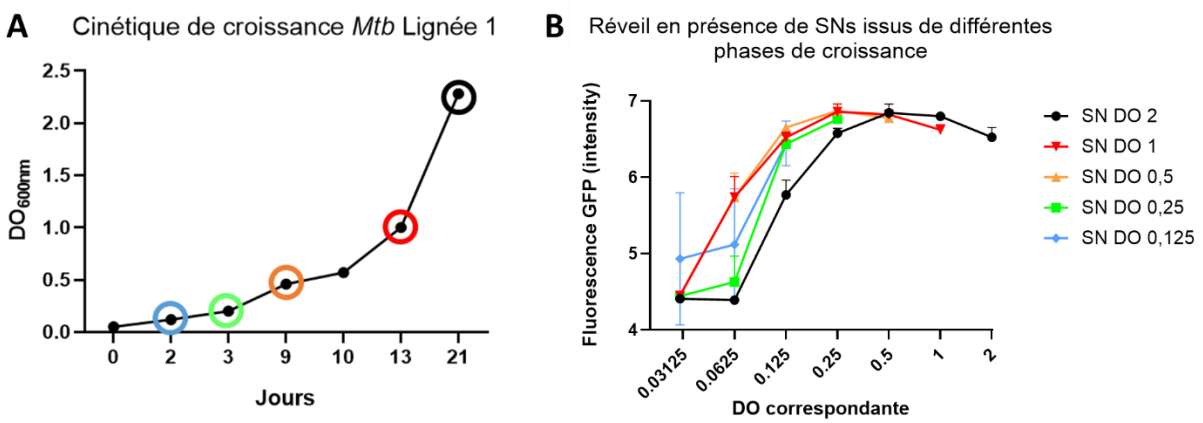


Figure 31 : Effet de la phase de croissance du surnageant sur le réveil des DCTB.
(A) Le surnageant d'une culture de *M. tb* L1-500960 a été collecté a différentes densités optiques (DO_{600}), puis stocké à -80°C. (B) Les surnageants ont été décongelées puis dilués. Chaque dilution a été testée pour son activité de réveil sur une culture de *M. tb* L1-500960 induite dans un phénotype DCTB à partir d'un inoculum de 10^5 bactéries/mL, dans un milieu 7H9-OADC. Après 35 jours de contact avec les surnageants, l'intensité du signal GFP a été mesuré. Les données sont présentées sous forme de moyenne + écart-type de trois réplicats techniques.

Par ailleurs, nous n'avons pas constaté de différence d'efficacité de réveil entre les surnageants de culture produits par *M. tb* H37Rv et ceux produits par la souche L1-500960, ce qui permet d'exclure cette variable des expériences qui suivent.

Le CF est capable de réveiller efficacement les DCTB lorsqu'il est prélevé à différentes phases de croissance et utilisé après dilution. Toutefois, l'impact de la taille de l'inoculum sur l'efficacité de ce réveil n'a pas encore été évaluée. Dans cette optique, et comme dans l'expérience précédente, des DCTB ont été générés dans une population de *M. tb* L1-500960 cultivée en milieu 7H9-OADC, à partir de différents inocula. Le CF, produit dans ce même milieu en phase exponentielle de croissance, a ensuite été mis en contact avec des DCTB pendant 21 jours, avant mesure de la croissance bactérienne. Les résultats suggèrent que le réveil des DCTB dépend à la fois de l'inoculum initial et de la quantité de facteurs de croissance présents dans le CF (**Figure 32**). Ainsi, plus la densité bactérienne est élevée, moins la quantité de facteurs de croissance nécessaires au réveil est importante. En utilisant 50% de CF, les différentes tailles d'inocula testés sont toutes capables d'initier leur croissance, confirmant notre choix pour l'utilisation de cette concentration dans les futures expériences.

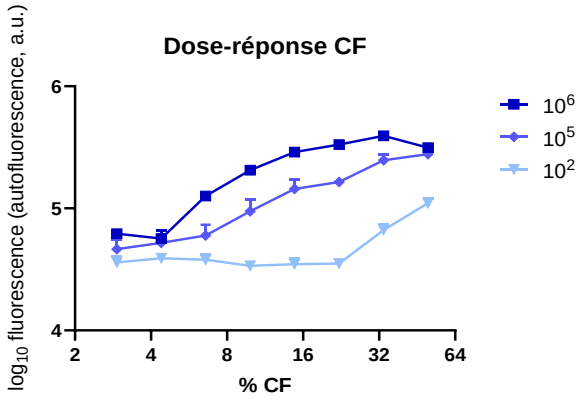


Figure 32 : Effet de l'inoculum et de la concentration en surnageant sur le réveil des DCTB.
M. tb L1-500960 a été induite dans un phénotype DCTB à partir d'inocula de 10^6, 10^5 et 10^2 bactéries/mL, cultivés dans un milieu 7H9-OADC. Des surnageants de culture en phase exponentielle de *M. tb* H37Rv, produits dans le même milieu, ont été dilués avant d'être ajoutés aux DCTB. Après 21 jours de contact avec les différentes dilutions de CF, le signal d'auto-fluorescence à 475 nm a été mesuré. Les données sont présentées sous forme de moyenne + écart-type de six réplicats techniques.

B. Instabilité du modèle DCTB en milieu standard

Induction de DCTB dans un test à haut débit

Ce modèle de sélection de DCTB a pour vocation d'être utilisé dans un test de criblage à haut-débit. L'objectif du test de criblage est de trouver des molécules capables de mimer l'effet du CF, c'est-à-dire induire la croissance des DCTB. L'un des principaux défis consiste à s'assurer que le phénotype DCTB, c'est-à-dire la dépendance stricte au CF pour initier la croissance des bacilles en culture, est strictement maintenu lorsque l'on répète l'expérience plusieurs milliers de fois, comme cela sera le cas dans un test de criblage à haut débit. Ainsi, nous avons testé la stabilité du phénotype sur plusieurs centaines de cultures miniaturisées dans un format de plaques 384 puits.

Le test d'évaluation du phénotype DCTB consiste en l'utilisation d'une culture de *M.tb* L1-500960 amenée à une DO_{600} entre 1 et 1,5, qui est aliquotée et stockée à -80°C, afin de standardiser le test. Pour chaque test, un aliquot a été décongelé et lavé trois fois dans du milieu 7H9-OADC, afin d'enlever le CF issu de la culture initiale. Cet échantillon a ensuite été transféré à une concentration finale de 10^3 bactéries/ml dans du milieu 7H9-OADC avec ou sans CF. Les plaques ont été incubées à 37°C pendant 28 jours, à l'issue desquels le signal GFP a été mesuré comme indicateur de la croissance. Comme attendu, quasiment tous les puits montrent une reprise de croissance en présence de CF (**Figure 33A, Tableau 2**). Cependant, une proportion faible (~5%), mais non-négligeable, de puits

n'ayant pas été supplémentés en CF montrent également une reprise de croissance. Dans le cadre d'un criblage visant à identifier des molécules induisant spécifiquement cette reprise de croissance, ces événements de réveils spontanés, même s'ils sont minoritaires, vont constituer des faux positifs. Il est donc essentiel de tenter de réduire ces événements parasites.

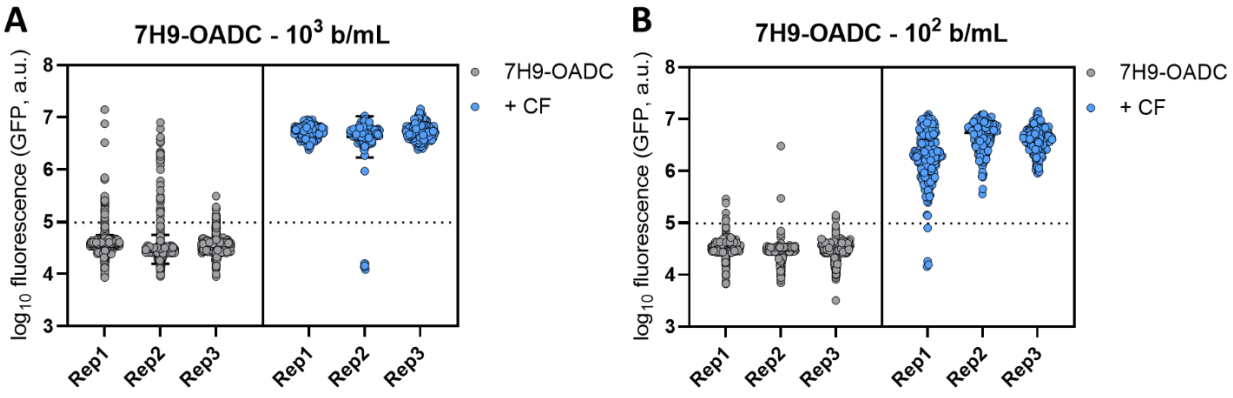


Figure 33 : Induction du phénotype DCTB dans le milieu 7H9-OADC.
Un aliquot de *M. tuberculosis* L1-500960 a été dilué à 10^3 (A) ou 10^2 (B) bactéries/mL et cultivé soit dans un milieu 7H9-OADC, soit dans un milieu 7H9-OADC additionné de 50% de surnageant de culture (CF). L'intensité de fluorescence de la GFP a été mesurée après 28 jours d'incubation. Chaque point représente la mesure issue d'un puit individuel. Trois réplicats biologiques (Rep1, 2, 3) sont représentés. La ligne pointillée représente le seuil de croissance positive, calculé comme suit : ($médiane_{ctlr.négatif}$ + $3*SEM_{ctlr.négatif}$)*2.

Notre première hypothèse était que, lors de la préparation du volume plus important de bactéries, un manque de précision dans l'inoculum avait pu survenir. Or, nous avons montré précédemment que ce paramètre est crucial pour l'obtention du phénotype de DCTB. Nous avons choisi de réaliser nos tests à partir d'un inoculum plus faible, 10^2 bactéries/mL, qui permet également l'obtention du phénotype chez la lignée 1 (**Figure 29**). Cependant, cela n'a pas permis de réduire substantiellement la fréquence de réveil spontané des DCTB dans les plaques (**Figure 33B, Tableau 2**).

Impact de l'oxygénation sur le phénotype DCTB

Nous avons observé que les puits se trouvant en bordure de plaque montraient fréquemment une reprise spontanée de la croissance des DCTB en absence de CF. L'incubation des bactéries s'étendant sur plusieurs semaines, il a pu se créer des gradients de disponibilité en oxygène entre les différents puits de la plaque, ce qui expliquerait pourquoi une croissance est observée dans certains puits et pas dans d'autres. Cette idée est cohérente avec le modèle de Wayne déjà décrit, dans lequel l'hypoxie induit un état

non réplicatif chez les bactéries [182]. Pour tester cette hypothèse, nous avons répété l'expérience dans des plaques scellées par un film aluminium (protocole standard) ou par un film respirant. Nous n'avons pas observé de différence entre les deux conditions sur le réveil spontané des DCTB (**Figure 34, Tableau 2**). De plus, le film respirant a entrainé une évaporation des puits en présence de CF, ce qui entrave la lecture des résultats pour cette condition. La disponibilité en oxygène ne semble donc pas être le facteur responsable du réveil spontané des DCTB.

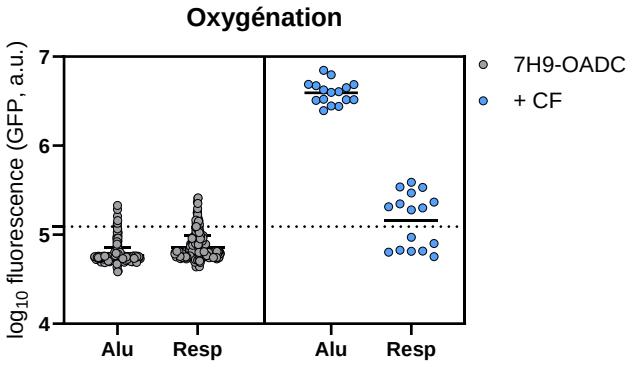


Figure 34 : Induction du phénotype DCTB dans des plaques différentiellement oxygénées.
Un aliquot de *M. tuberculosis* L1-500960 a été dilué à 10^3 bactéries/mL et cultivé soit dans un milieu 7H9-OADC, soit dans un milieu 7H9-OADC additionné de 50% de surnageant de culture (CF). Les plaques ont été scellées par un film aluminium (Alu) qui est totalement hermétique ou respirant (Resp) qui est poreux. L'intensité de fluorescence de la GFP a été mesurée après 28 jours d'incubation. Chaque point représente la mesure issue d'un puit individuel. La ligne pointillée représente le seuil de croissance positive, calculé comme suit : $(\text{médiane}_{\text{ctlr.négatif}} + 3*\text{SEM}_{\text{ctlr.négatif}})*2$.

Recherche de marqueurs prédictifs du phénotype DCTB

Au-delà des épisodes de réveil spontané retrouvés dans certains puits au sein d'une même plaque, nous avons observé des variations entre différentes expériences. En effet, pour une concentration initiale en bactéries identique, le phénotype de DCTB peut être obtenu sur une expérience, mais pas sur l'autre.

Malgré la standardisation avec l'utilisation d'un même lot de stock de culture pour chaque test, il est possible qu'il subsiste de la variabilité entre les aliquots, par exemple par la présence d'agrégats qui pourraient modifier la taille de l'inoculum. Nous avons ainsi cherché à déterminer si des différences dans la taille de l'inoculum bactérien ou l'activité métabolique des bactéries au début du test existent entre les aliquots et peuvent ainsi prédire la variabilité observée entre différentes répétitions. Deux expériences indépendantes ont été menées, dans lesquelles les aliquots d'une même culture de *M. tb*

L1-500960 ont été dilués en série, puis marqués et observés au microscope à fluorescence (**Figure 35A**) et en parallèle utilisés dans le test phénotypique (**Figure 35B**). Un marquage a été effectué avec du SYBR Gold, un intercalant d'ADN qui quantifie l'ensemble de la population bactérienne, et de l'iodure de propidium (PI), qui colore spécifiquement les bacilles dont la paroi cellulaire est endommagée, une sous-population généralement considérée comme morte. Aucune différence n'a été observée dans la taille de l'inoculum ou la proportion de cellules PI positives entre les deux expériences (**Figure 35A**). Les bactéries ont également été marquées avec du diacétate de fluorescéine (FDA), qui reflète l'état métabolique des bactéries par l'activité enzymatique estérase. Là encore, aucune différence n'a été observée entre les deux expériences (**Figure 35A**). Cependant, à l'issue du test de sélection des DCTB effectué comme ci-dessus, de la croissance a été détectée à l'inoculum 10^3 bactéries/mL dans quelques puits de l'expérience A en l'absence de surnageant de culture, contrairement à l'expérience B (**Figure 35B**). Ainsi, aucun des marqueurs évalués au début du test ne s'est avéré prédictif du devenir du phénotype de DCTB. Ces techniques, révélant des caractéristiques à l'échelle populationnelle, ne sont peut-être pas suffisamment discriminantes pour mettre en lumière la relative rareté des évènements de réveil spontané observés.

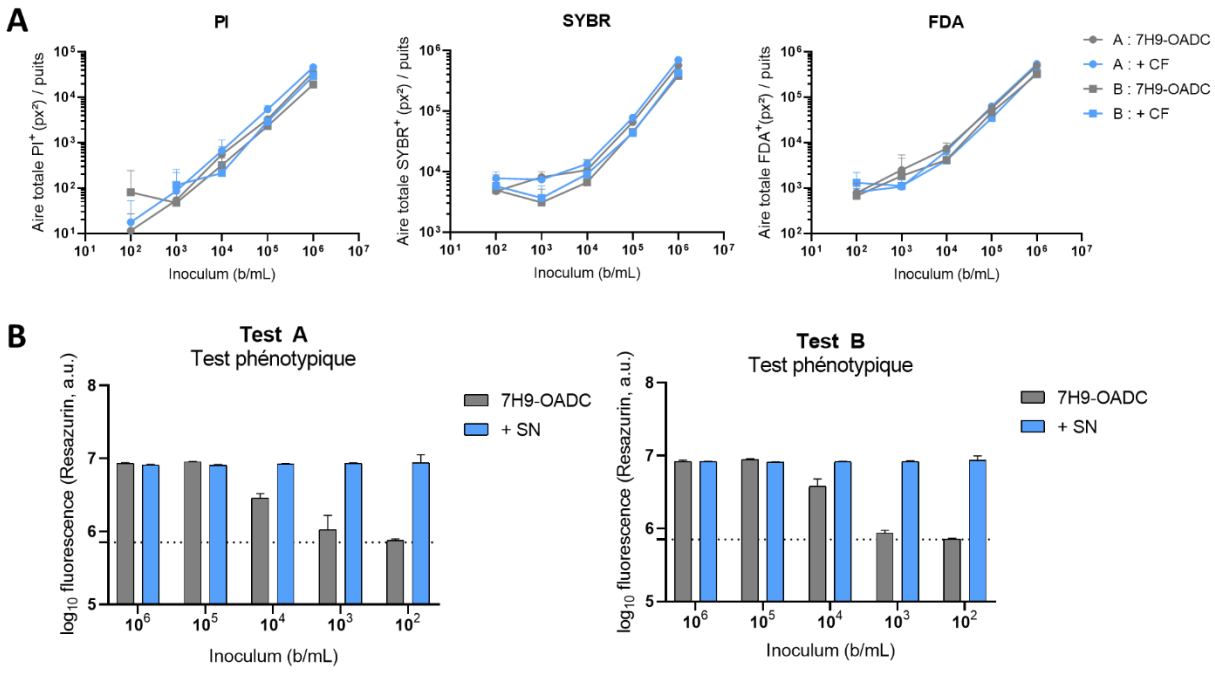


Figure 35 : Observation du phénotype de DCTB, après caractérisation de la culture initiale.
Un aliquot de *M. tuberculosis* L1-500960 ne portant pas le plasmide codant pour la GFP a été dilué à différents inocula. Deux expériences indépendantes, nommées Test A et Test B ont été réalisées. (A) Les bactéries ont été marquées à l'iodure de propidium (PI) à 4 µg/mL pendant 10 min à température ambiantes ; au SYBR Gold à 10X pendant 5 min, à température ambiante ; ou au fluorescéine diacétate (FDA)

à 25 µg/mL, pendant 15 min à 37°C. Les images ont été acquises à l'aide du microscope IN Cell Analyzer 6500, à Ex488-Em550 pour le FDA et le SYBR Gold et Ex561-Em630 pour le PI, et quantifié à l'aide du logiciel Columbus. (B) Les inoculas sont cultivées dans un milieu 7H9-OADC ou dans un milieu 7H9-OADC additionné de surnageant de culture (CF) pendant 14 jours. A l'issue du test, de la résazurine est ajoutée dans chaque puit pendant 24h à 0,005% final et la fluorescence mesurée (Ex535-Em585) est directement corrélée à la croissance bactérienne.

Formation et maintien du phénotype DCTB à l'échelle individuelle

Afin d'obtenir une image plus précise de l'état individuel des bactéries au sein de notre modèle de DCTB, nous avons utilisé la cytométrie en flux. Les marqueurs FDA et PI ont de nouveau été utilisés pour distinguer, cette fois à l'échelle individuelle et non à l'échelle populationnelle, les cellules vivantes (PI^-), des mortes, (PI^+), et pour évaluer l'activité métabolique (FDA) individuelle.

Cette technique a été utilisée pour comparer l'état des DCTB ainsi que leur évolution au cours de la stimulation par le CF. Un premier marquage FDA a été réalisé sur des bactéries en phase exponentielle de croissance, afin de déterminer le seuil de positivité (**Figure 36A**). Tout au long de la cinétique la majorité des bactéries DCTB issues de nos dilutions affichent une viabilité identique à celles cultivées en présence de CF (phénotype PI^-) (**Figure 36B**). La culture supplémentée en CF, montre une forte augmentation du nombre de bacilles (**Figure 36C**) associée à un déplacement massif des bactéries vers un marquage FDA^+ (**Figure 36B**) En début de cinétique (J3), les bactéries DCTB affichent un phénotype majoritairement FDA^+, mais avec une intensité de fluorescence plus faible que les bactéries exposées au CF (**Figure 36B**), que nous qualifierons de marquage FDA intermédiaire (FDAi). Ce phénotype persiste jusqu'à 10 jours dans la culture sans CF (**Figure 36B et D**), associé à une faible augmentation des événements de comptage, c'est-à-dire une faible multiplication bactérienne (**Figure 36B et C**). À partir de 14 jours, on observe une augmentation de la population, associée au phénotype FDA^+ comparable à celui des bactéries en présence de CF. Cette population émergente pourrait correspondre aux événements de croissance spontanée observés en l'absence de CF dans nos plaques 384 puits.

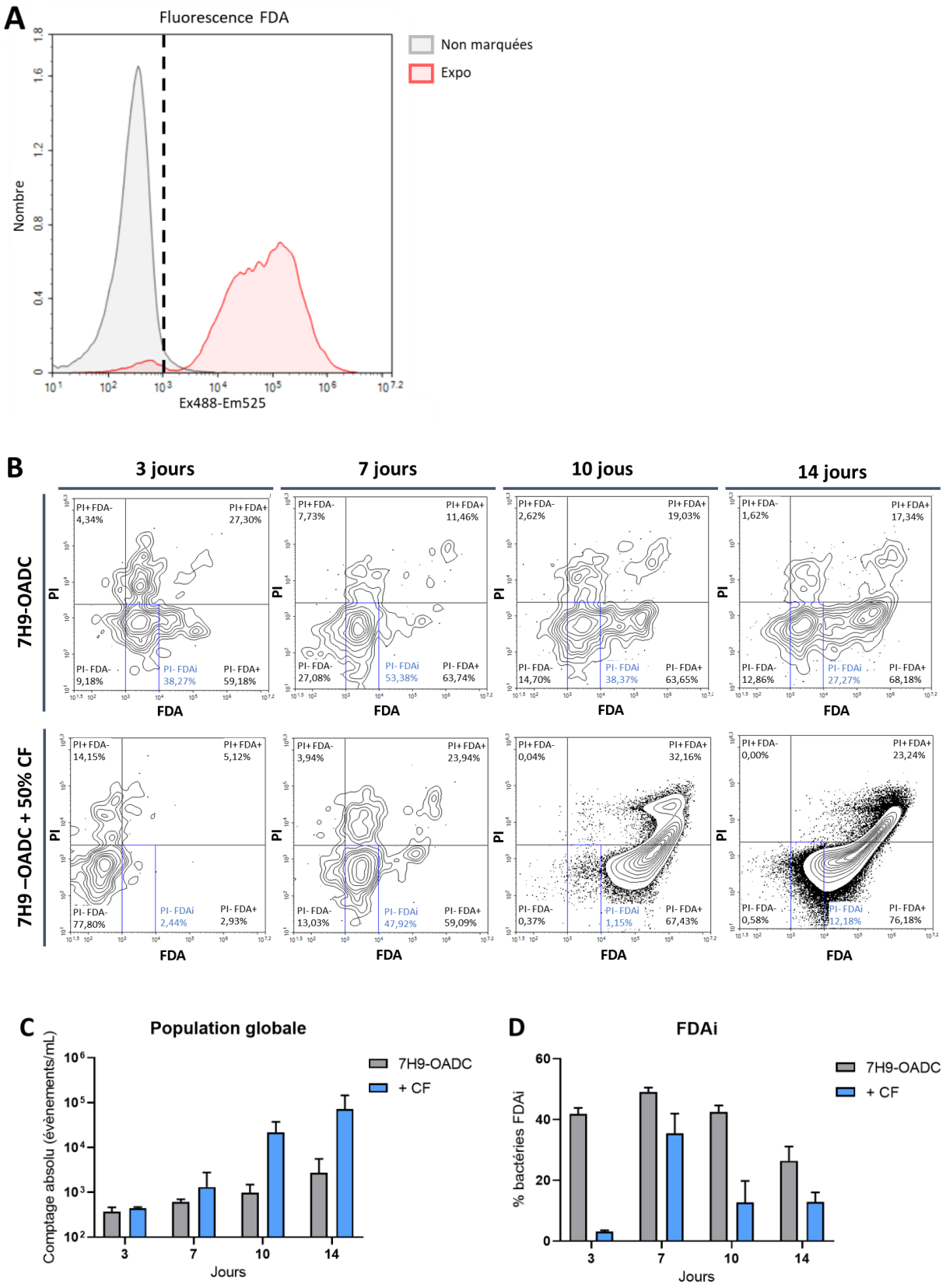


Figure 36 : Caractérisation par cytométrie en flux d'une population de *M. tb* L1-500960 dans un état DCTB ou réveillées par du surnageant de culture (CF).

(A) Intensité de fluorescence de bactéries en phase exponentielle de croissance marquées ou non au FDA. (B) Un aliquot de *M. tb* L1-500960 a été dilué à 10^4 bactéries/mL et cultivé dans du milieu 7H9-OADC ou 7H9-OADC + 50% CF. À différents temps, les bactéries ont été marquées au FDA et au PI et les intensités de fluorescence de chaque bactérie ont

été mesurées par cytométrie en flux. (C) Concentration bactérienne dans les deux cultures, au cours du temps. Les données sont présentées sous forme de moyenne + SD de six réplicats techniques. (D) Pourcentage de la population FDAi (entre 10^3 et 10^4 unités de fluorescence) dans les deux cultures. (C, D) Les données sont présentées sous forme de moyenne + SEM de six réplicats techniques.

Bien que ces résultats n'aient pas été réalisés en réplicats biologiques, ils suggèrent que la population DCTB est constituée de bactéries non ou faiblement réplicatives, associées à une activité métabolique réduite.

C. Éliminer les bactéries réplicatives

Puisque même en absence de CF, une sous-population de bactéries semble encline à reprendre une activité réplicative, compliquant l'usage de ce modèle pour l'appliquer à un criblage à haut débit, nous avons envisagé des méthodes d'élimination spécifique de ces bactéries.

Traitements antibiotiques et chocs thermiques

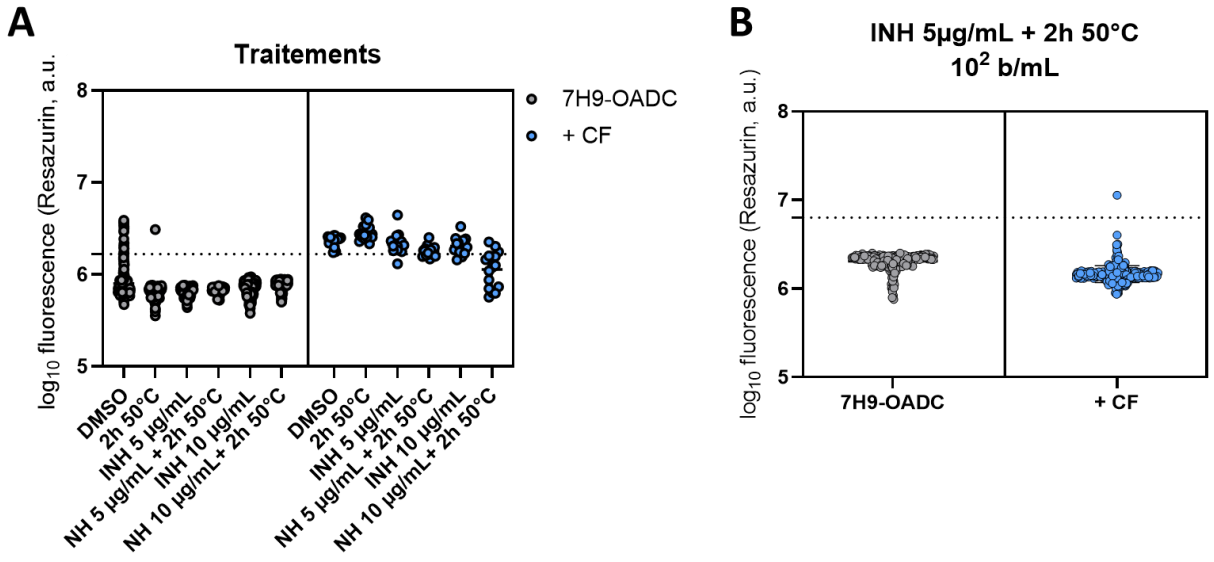
En raison de leur métabolisme modifié, les bactéries non réplicatives ou à réplication lente sont d'une part tolérantes à divers antibiotiques et stress [283] et d'autre part plus résistantes à un traitement thermique [284]

Dans un premier temps, nous avons augmenté le temps de culture de nos bactéries jusqu'à 4 semaines, afin d'enrichir au maximum notre culture en DCTB. Ensuite, cette culture a été traitée pendant quatre jours avec de l'isoniazide (INH) à 5 ou 10 µg/mL, antibiotique connu pour être faiblement actif sur les bactéries non réplicatives [275]. Ce traitement a été couplé ou non à un choc thermique de 2 h à 50°C, afin de compléter l'élimination des bactéries réplicatives. A l'issue de ces traitements, les bactéries ont été diluée à 10^2 bactéries/mL et cultivées avec ou sans CF, afin de mesurer l'impact des différents traitements sur la fréquence du réveil induit (+CF) et spontané (7H9-OADC).

Une culture de quatre semaines diluée, sans traitement antibiotique ni choc thermique (DMSO), présente un nombre important d'événements de réveil spontané (5,65%) (**Figure 37A, Tableau 2**). L'ajout d'un choc thermique de 50°C pendant 2h n'est pas suffisant pour éliminer l'apparition de ces évènements (0,3%). Les traitements à l'INH couplés ou non au choc thermique, quant à eux, compromettent la capacité de réveil

spontané des DCTB. Néanmoins, des traitements trop sévères, comme la combinaison INH 10 µg/mL + 2h à 50°C, entravent le réveil en présence de CF (12,5%). Finalement, la combinaison 5 µg/mL d'INH pendant 4 jours suivie d'un traitement de 2 heures à 50 °C offre un bon équilibre entre l'absence de réveils spontanés (0%) et le maintien d'une bonne réponse au CF pour induire le réveil (93,75%).

Cette condition a été testée à nouveau, afin de confirmer le phénotype observé lors de ce premier test. Cependant, cette condition a montré d'importantes limites de reproductibilité, avec quelques fois une absence totale de croissance sur l'ensembles des plaques de test en présence de CF (**Figure 37B, Tableau 2**). Ce résultat peut être la conséquence du faible inoculum utilisé (~5 bactéries/puits), avec lequel la moindre variation aboutit à un nombre insuffisant de bactéries dans les puits. Ainsi, nous avons à nouveau évalué la condition de sélection des DCTB par un traitement à l'INH à 5 ug/ml et un choc thermique de 2h, mais cette fois la culture a été diluée à 10^4 bactéries/ml. Dans ces conditions, une population résiduelle de bactéries en réplication a encore été détectée (0,28%), et le réveil par le CF n'a été que partiellement efficace (entre 85 et 99%) (**Figure 37C, Tableau 2**). En outre une importante variabilité de comportement a été observée entre les deux réplicas testés, indiquant la faible reproductibilité de cette condition.



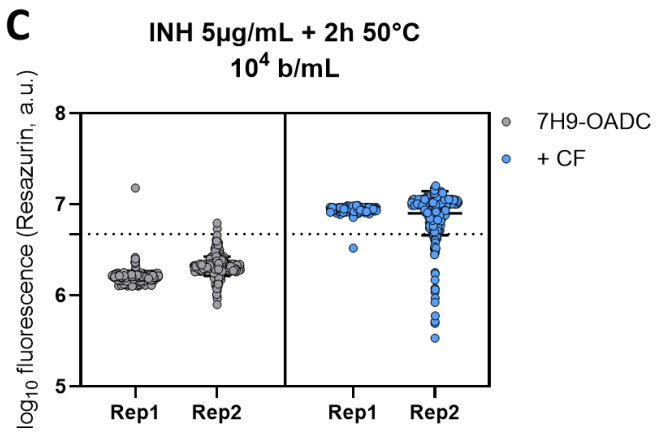


Figure 37 : Induction du phénotype DCTB après différents traitements.
(A) *M. tuberculosis* L1-500960 a été cultivée pendant 4 semaines dans un milieu 7H9-OADC. Les cultures concernées par le traitement à l'isoniazide (INH) ont été cultivées pendant 4 jours supplémentaires en présence de 5 ou 10 µg/mL d'INH. Un traitement de 2h à 50°C a également pu être ajouté. À l'issue de l'ensemble des traitements, les cultures ont été stockées à -80°C puis décongelées lors du test d'induction de DCTB. Les aliquots ont été dilués à 10^2 bactéries/mL, cultivés dans du milieu 7H9-OADC seul ou en présence de 50% de CF pendant 21 jours. Les bactéries ont ensuite été incubé avec de la résazurine 0.005% pendant 24h et l'intensité de fluorescence a été mesurée afin de quantifier la croissance bactérienne. (B, C) Un aliquot de *M. tuberculosis* L1-500960 traitée avec 5 µg/mL d'INH pendant 4 jours, puis 2h à 50°C, a été dilué à 10^2 (B) ou 10^4 (D) bactéries/mL. Les bactéries ont été cultivées en format haut-débit, dans du milieu 7H9-OADC seul ou en présence de 50% de CF pendant 21 jours. Les bactéries ont ensuite été incubées avec de la résazurine 0.005% pendant 24h et l'intensité de fluorescence a été mesurée afin de quantifier la croissance bactérienne. Chaque point représente la mesure issue d'un puit individuel. La ligne pointillée représente le seuil de croissance positive, calculé comme suit : $(\text{médiane}_{\text{ctlr.négatif}} + 3*\text{SEM}_{\text{ctlr.négatif}})*2$.

Impact de la congélation/décongélation

Dans un objectif de standardisation, les tests d'évaluation de la robustesse du phénotype DCTB présentés depuis le début de cette thèse ont été effectués en partant d'un stock congelé, issu d'une culture en fin de phase exponentielle de *M. tb* L1-500960 (DO_{600} entre 1 et 1,5) ou âgée de 4 semaines. Nous avons questionné l'impact de cette étape, qui induit un stress des bactéries pouvant possiblement créer des différences de viabilité entre les tubes au moment de la congélation ou décongélation. Ainsi, un nouveau test a été effectué en utilisant une culture fraîche âgée de quatre semaines, qui a été lavée, puis diluée, et utilisée immédiatement, sans passage par l'étape de congélation. Cette expérience s'est soldée par une absence totale de mise en dormance, quel que soit l'inoculum utilisé, aboutissant à une absence du phénotype DCTB, avec une croissance bactérienne observée dans l'ensemble des puits de plaques (**Figure 38, Tableau 2**).

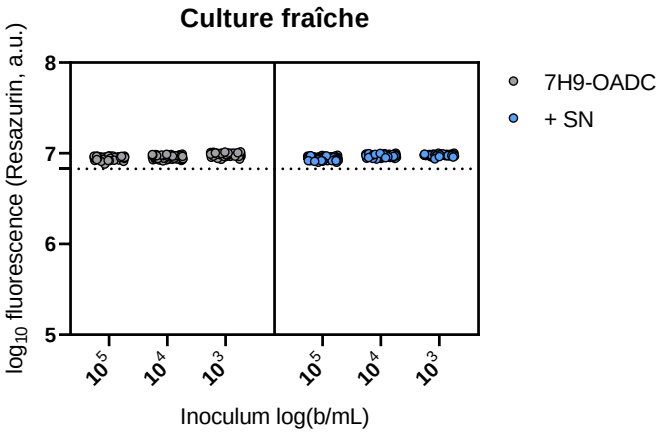


Figure 38 : Induction du phénotype DCTB dans une culture fraîche de *M. tb* L1-500960.
M. tuberculosis L1-500960 a été cultivée pendant 4 semaines dans un milieu 7H9-OADC, puis diluée à 10^5, 10^4 ou 10^3 bactéries/mL. Ces différents inocula ont été cultivés dans du milieu 7H9-OADC seul ou en présence de 50% de CF pendant 21 jours. Les bactéries ont ensuite été incubé avec de la résazurine 0.005% pendant 24h et l'intensité de fluorescence a été mesurée afin de quantifier la croissance bactérienne. Chaque point représente la mesure issue d'un puit individuel. La ligne pointillée représente le seuil de croissance positive, calculé comme suit : $(\text{médiane}_{\text{milieu}} + 3*\text{SEM}_{\text{milieu}})*2$.

Tableau 2 : Résumé des conditions expérimentales testées pour l'induction du phénotype DCTB et résultats observés.

			DCTB		Surnageant (CF)	
Milieu / conditions	Inoculum	Temps d'incubation	Nombre de puits	% de puits avec une croissance	Nombre de puits	% de puits avec une croissance
7H9-OADC	10^3	28	1184	2,44	224	100
			1184	2,78	224	97,77
			1184	4,73	224	100
	10^2	28	1184	0,51	224	98,66
			1184	0,25	224	100
			1184	1,27	224	100
Film Aluminium	10^3	28	320	1,88	16	100
Film Respirant	10^3	28	320	6,88	16	56,25
DMSO	10^2	21	336	5,65	16	100
2h 50°C			336	0,3	16	100
INH 5µg/mL			336	0	16	93,75
INH 10µg/mL			336	0	16	25
INH 10µg/mL + 2h 50°C			336	0	16	12,5
INH 5µg/mL + 2h 50°C	10^2		336	0	16	93,75
			352	0	352	0,28
	10^4	21	352	0,28	352	99,7
			352	0,28	352	85,5
Culture fraîche	10^5	21	173	100	173	100
	10^4		173	100	173	100
	10^3		173	100	173	100

De nombreuses stratégies ont été explorées, afin de développer un modèle de bactéries DCTB robuste, adapté à un test haut-débit, mais elles se sont révélées infructueuses. Les traitements testés dans cette partie reposaient sur l'hypothèse que la culture diluée de départ contenait déjà une sous-population minoritaire dans un état métabolique plus actif, ou du moins prédisposée à entrer en réplication. Les approches de contre-sélection de cette population n'ayant pas abouti, il est possible que cette hypothèse ne soit pas correcte et que la sous-population réplicative apparaisse plutôt au cours du test.

D. L'albumine comme source de variabilité

Les bactéries dans un état non réplicatif ou faiblement réplicatif conservent une activité métabolique, même si celle-ci est décrite comme réduite [166]. La manière dont *M. tb* utilise les sources de carbone a une incidence significative sur son métabolisme et son taux de réplication [285]. Il a déjà été démontré que l'utilisation de différentes sources de carbone permet de faire passer les bactéries d'un état non réplicatif à un état réplicatif [192].

Nous avons testé si le métabolisme des sources de carbone pouvait être en cause, et restaurer la réplication dans nos conditions. Parmi celles-ci, nous avons sélectionné celles qui sont présentes dans le milieu 7H9-OADC standard, soit l'acide oléique, le glucose et le glycérol, afin de les évaluer individuellement. Nous avons également sélectionné une série de sources de carbone tels que le cholestérol, et l'acétate, qui ont déjà été décrits pour leur capacité à induire ou à stimuler la réplication de *M. tb*. Chaque source de carbone a été apportée à une concentration de 50 µM dans le milieu 7H9 de base (sans glycérol, sans Tween80 et sans OADC). Ce test avait également pour objectif de voir si lors de notre futur criblage, certains composés, pouvant potentiellement servir de sources de carbone, pourraient provoquer un réveil par simple stimulation métabolique. Cependant, aucune des sources de carbones testées n'a provoqué de réveil spontané dans notre modèle de DCTB (**Figure 39A**).

En parallèle, nous avons testé individuellement différents composants du milieu connus pour favoriser la croissance de *Mycobacterium tuberculosis*, mais cette fois-ci en présence de glycérol : à nouveau l'acide oléique [281] et le glucose seuls, ou présents dans le mélange OADC (acide oléique, albumine, dextrose, catalase), l'albumine fraction V [281] associée au glucose, ainsi que le Tween 80 [281] utilisé comme détergent pour désagréger *M. tb*. Chaque

composé a été ajouté individuellement au milieu 7H9 à sa concentration habituelle, et le phénotype d'induction de DCTB a été testé. Comme l'acide oléique et le glucose, le Tween 80 n'a pas montré d'effet sur la croissance dans notre modèle (**Figure 39B**). De façon intéressante, l'association albumine + glucose ainsi que le supplément OADC induisent un réveil de *M. tb* L1-500960, comparable à celui observé avec le surnageant de culture. Puisque le glucose seul n'a aucun effet, nous supposons que l'albumine pourrait être à l'origine de cet effet, d'autant que Dubos et al. ont déjà mis en évidence sa capacité à stimuler la croissance d'un faible inoculum [281].

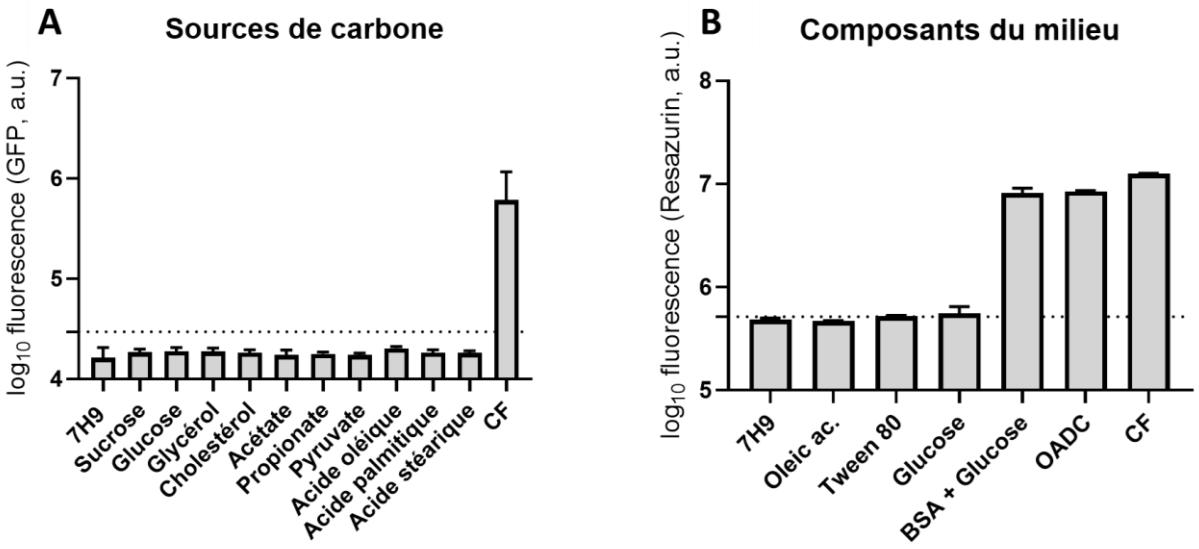


Figure 39 : Impact des sources de carbone et des composants du milieu 7H9 enrichi sur le maintien du phénotype DCTB.
(A) Différentes sources de carbone ont été ajoutées au milieu 7H9 à 50 µM et testés pour leur capacité à induire la croissance de la souche *M. tuberculosis* L1-500960 à 10^2 bactéries/mL. Après 14 jours de croissance, l'intensité du signal GFP a été mesuré. (B) Les différents composants du milieu 7H9-OADC ont été testés séparément pour leur capacité à induire la croissance de la souche *M. tb* L1-500960 à 10^2 bactéries/mL, dans un milieu 7H9 + glycérol 0.2%. Le CF utilisé a été produit chez la souche *M. tb* L1-500960. Après 14 jours, de la résazurine a été ajoutée à 0,005 % et la fluorescence a été mesurée après 24 heures d'incubation. Les données sont présentées sous forme de moyenne + écart-type de cinq réplicats techniques. La ligne pointillée représente le seuil de croissance positive, calculé comme suit : $(\text{médiane}_{\text{ctlr.négatif}} + 3*\text{SEM}_{\text{ctlr.négatif}})*2$.

L'albumine ayant déjà été décrite par d'autres comme stimulant la croissance de *Mycobacterium tuberculosis* [281,286], nous avons testé des milieux exempts de cette protéine. *M. tb* L1-500960 a été pré-cultivée dans un milieu 7H9-Glucose jusqu'à une phase exponentielle de croissance, puis un aliquot de cette culture a été dilué dans le même milieu et incubé jusqu'à DO_{600} ~1. La culture a été lavée et diluée à 10^3 bactéries/mL, puis cultivée en 7H9-Glucose, en présence ou absence de CF (généré dans ce même milieu) pendant 21 jours. À l'issue du test, le nombre de puits contenant des

bactéries ayant repris une croissance spontanée en l'absence de CF s'est montré largement diminué (**Figure 40A, Tableau 3**), sans toutefois être entièrement nul (entre 0 et 0,98%). Cependant, le CF produit dans le milieu 7H9-Glucose, dépourvu d'OADC, ne permet pas le réveil des bactéries (0 à 17%) après 14 jours de culture.

Afin de savoir si cet effet est dû au CF qui n'est pas assez puissant, ou au fait que l'OADC est nécessaire pour l'induction du réveil observé jusqu'ici dans nos tests, nous avons effectué le même test que ci-dessus et utilisé 10% d'OADC comme facteur de réveil (**Figure 40B, Tableau 3**). L'OADC permet un réveil de l'ensemble des puits testés. Trois hypothèses peuvent être proposées : (i) le CF produit en 7H9-Glucose ne contient pas les mêmes facteurs de réveil que lorsqu'il est produit en 7H9-OADC, (ii) le phénotype DCTB des bactéries est différent de celui obtenu en 7H9-OADC et le CF n'est pas assez puissant pour les réveiller, ou iii) la présence d'OADC est nécessaire pour l'induction du réveil.

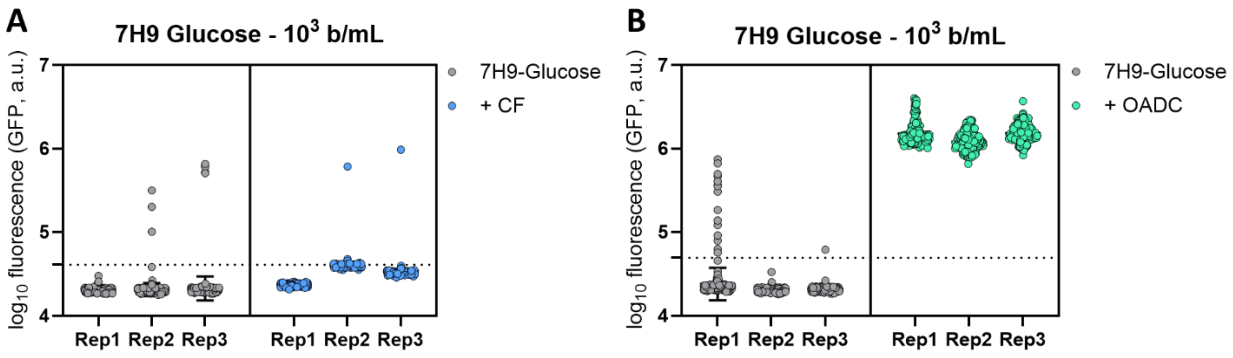


Figure 40 : Induction du phénotype DCTB dans le milieu 7H9-Glucose.
M. tuberculosis L1-500960 a été diluée à 10^3 bactéries/mL et cultivée dans un milieu 7H9-Glucose seul, additionné 50% de surnageant généré dans ce même milieu (CF) (A) ou de 10% d'OADC (B). L'intensité de fluorescence de la GFP a été mesurée après 14 jours d'incubation. Chaque point représente la mesure issue d'un puit individuel. Les trois réplicats biologiques (Rep1, 2, 3) sont représentés. La ligne pointillée représente le seuil de croissance positive, calculé comme suit : $(\text{médiane}_{\text{ctlr.négatif}} + 3*\text{SEM}_{\text{ctlr.négatif}})*2$.

Dans la mesure où l'utilisation du 7H9-Glucose n'a pas totalement résolu le problème du réveil spontané des DCTB, nous avons testé le milieu Sauton. De la même manière, *M. tb* L1-500960 a été pré-cultivée dans un milieu Sauton jusqu'à une phase exponentielle de croissance, puis un aliquot de cette culture est dilué dans le même milieu et incubé à 37°C jusqu'à DO ~1. La culture a été lavée et diluée à 10^3 bactéries/mL, puis cultivée en Sauton, en présence ou absence de CF (produit dans le milieu Sauton) pendant 21 jours. Les facteurs de réveil testés sont le CF Sauton, CF Sauton + Albumine et CF Sauton + OADC. Dans ces conditions, le phénotype de DCTB est bien établi dans tous les puits contenant du Sauton seul (0%), et le réveil est correctement induit dans les puits contenant les

différents facteurs de réveil (100%) (**Figure 41A, Tableau 3**). Cependant, on peut observer quelques différences dans l'intensité du réveil entre les réplicats, avec tous les facteurs de réveil.

Un second panel d'expériences a été effectué, en incluant cette fois-ci un surnageant produit en 7H9-OADC, afin de voir si ce surnageant présente une activité maximale de réveil. À nouveau, le phénotype de DCTB est bien établi dans tous les puits contenant du Sauton seul (0%). L'utilisation d'un CF généré en milieu Sauton et 10% d'OADC entraine un réveil efficace des DCTB (**Figure 41B, Tableau 3**). En présence du CF produit en 7H9-OADC, l'efficacité de réveil est encore meilleure, avec un signal GFP plus fort et peu de variabilité entre les trois réplicats biologiques. Cependant, ici le CF produit en milieu Sauton n'a eu que très peu d'effet (entre 0 et 7%).

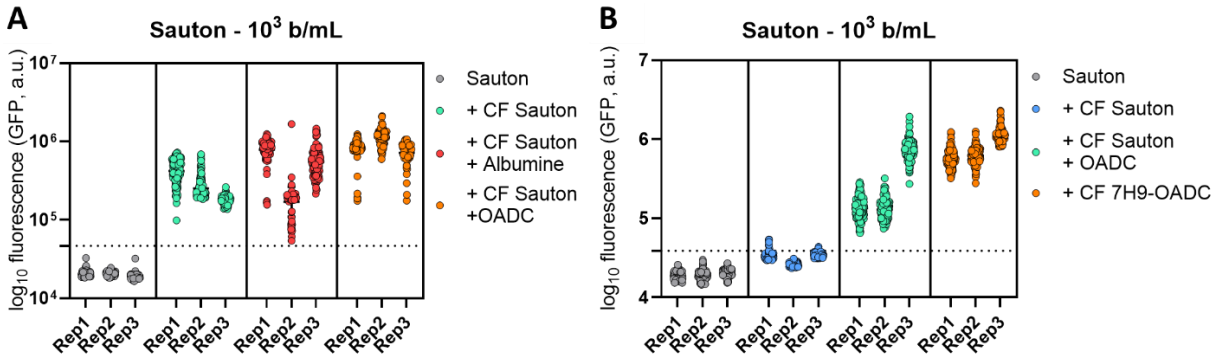


Figure 41 : Induction du phénotype DCTB dans le milieu Sauton.
M. tuberculosis L1-500960 a été diluée à 10^3 bactéries/mL et cultivée dans un milieu Sauton seul ; additionné 50% de surnageant généré dans ce même milieu par cette même souche (CF Sauton), en présence ou non d'albumine 5 g/L ou d'OADC 10% (A, B) ; ou additionné de 50% de surnageant généré dans un milieu 7H9-OADC (CF 7H9-OADC) (B). L'intensité de fluorescence de la GFP a été mesurée après 21 jours d'incubation. Chaque point représente la mesure issue d'un puit individuel. Trois réplicats biologiques (Rep1, 2, 3) sont représentés. La ligne pointillée représente le seuil de croissance positive, calculé comme suit : $(\text{médiane}_{\text{ctlr.négatif}} + 3*\text{SEM}_{\text{ctlr.négatif}})*2$.

Afin de mieux comprendre comment les différents facteurs de réveil agissent dans notre modèle, une cinétique de croissance de *M. tb* L1-500960 à partir d'un inoculum de 10^3 bactéries/mL a été effectuée en Sauton, Sauton + CF Sauton, Sauton + CF Sauton + OADC ou Sauton + CF 7H9-OADC. En absence de CF, les bactéries ne montrent pas de croissance détectable jusqu'à la fin de l'essai, soit 28 jours (**Figure 42**). Les cinétiques de croissance des bactéries DCTB mises en présence de CF Sauton + OADC ou CF 7H9-OADC sont similaires, avec pour toute les deux une croissance détectable après 7 à 14 jours de contact. Les cultures de DCTB supplémentées avec le CF Sauton, montrent une croissance plus tardive, détectable après 14 à 21 jours. En conclusion, la présence d'OADC booste le

réveil de manière plus efficace que le CF seul, bien que ce dernier soit capable à lui seul d'induire le réveil de *M. tb* L1-500960.

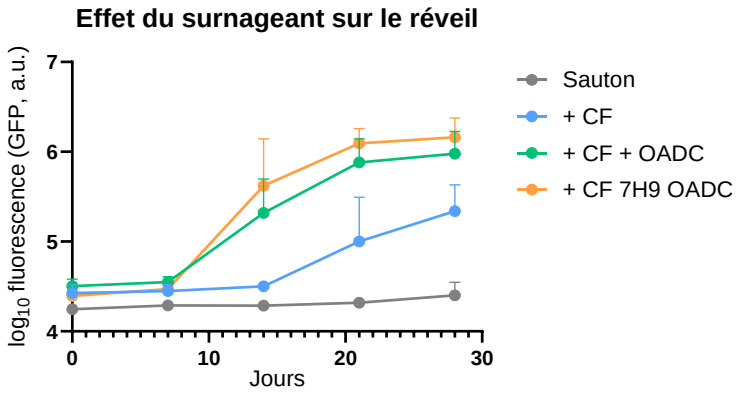


Figure 42 : Cinétique de l'effet de différents facteurs de croissance sur le réveil de DCTB.
Cinétique de croissance de *M. tb* L1-500960 à un inoculum initial de 10^3 bactéries/mL, dans un milieu Sauton seul ou supplémenté avec différents surnageants générés chez cette même souche (CF) seul ou avec de l'OADC. L'intensité de fluorescence de la GFP a été mesurée à différents temps de la cinétique. Les données sont présentées sous forme de moyenne + écart-type de deux réplicats biologiques.

Tableau 3 : Résumé des conditions expérimentales testées pour l'induction du phénotype DCTB en absence d'albumine et résultats observés.

			DCTB		CF milieu		OADC		CF + OADC		CF 7H9 OADC	
Milieu	Inoculum	Temps d'incubation	Nombre de puits	% de puits avec une croissance	Nombre de puits	% de puits avec une croissance	Nombre de puits	% de puits avec une croissance	Nombre de puits	% de puits avec une croissance	Nombre de puits	% de puits avec une croissance
7H9-Glucose	10^3	21	512	0.00	192	0.00						
			512	0.59	192	17.71						
			512	0.98	192	0.52						
7H9-Glucose	10^3	21	512	3.32			192	100				
			512	0.00			192	100				
			512	0.19			192	100				
Sauton	10^3	21	176	0.00	176	100					176	100
			176	0.00	176	100					80	100
			176	0.00	160	100					80	100
Sauton	10^3	14	704	0.00	224	7.59			224	100	224	100
			707	0.00	224	0.00			224	100	224	100
			1568	0.00	160	2.5			160	100	160	100

Cet ensemble de tests a permis de définir d'une part des conditions conduisant à l'obtention d'une population de DCTB stable, et d'autre part à des surnageants de culture supplémentés ou non en albumine, induisant plus ou moins rapidement le réveil de ces bactéries.

E. Conditions finales pour le modèle DCTB

Comme décrit ci-avant, *M. tb* L1-500960 montre un phénotype DCTB plus stable dans les milieux 7H9-Glucose ou Sauton. De manière à s'assurer que le phénotype obtenu n'est pas dû à un simple défaut de croissance de la souche, une courbe de croissance de *M. tb* L1-

500960 a été effectuée dans ces deux milieux. On constate que la souche de lignée 1 est capable d'initier sa croissance dans ces différents milieux, lorsqu'elle est lancée à un inoculum suffisamment élevé (DO ~ 0.05) (**Figure 43**). La croissance en milieu Sauton est néanmoins plus lente comparativement aux milieux 7H9.

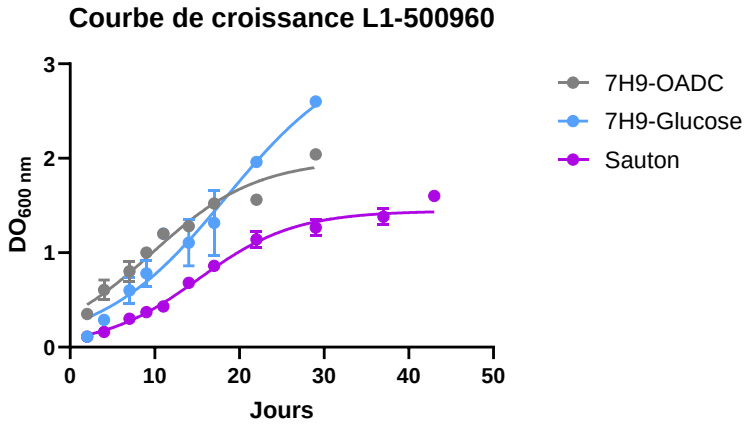


Figure 43 : Cinétique de croissance de *M. tb* L1-500960 dans différents milieux.
M. tb L1 500-560 a été inoculée à une DO_{600} de 0,05 dans un milieu 7H9-OADC, 7H9-Glucose ou Sauton, et la croissance a été mesurée au cours du temps. Les points sont présentés sous forme de moyenne ± écart-type de deux réplicats techniques.

L'établissement des conditions permettant d'obtenir un phénotype DCTB est l'aboutissement de nombreux questionnements et essais, qui nous ont également apporté de nouvelles connaissances sur l'état réplicatif de *M. tuberculosis*, et sur les facteurs influençant ce phénotype.

En conclusion, le protocole retenu comme étant le plus approprié pour l'obtention du phénotype DCTB reproductible et compatible avec le criblage à haut débit est le suivant :

1) Une culture de *M. tb* L1-500960 est lancée en Sauton à partir d'un aliquot stock (-80°C).

2) Lorsque la culture est en phase exponentielle de croissance (DO_{600} entre 0,6 et 1, 10 à 14 jours), la culture est diluée dans du milieu Sauton à une DO_{600} ~ 0,2.

3) Quand cette culture atteint une DO_{600} ~ 1 à 1,5 (> 21 jours), la culture est lavée 3 fois dans du milieu Sauton.

4) La culture de *M. tb* est diluée dans du Sauton à une concentration de 2 x 10^3 bactéries/mL (DO_{600} ~ 0.00002).

5) 12,5 µL de cet inoculum est ajouté dans les puits d'une plaque 384 puits.

6) 12,5 µL de milieu ou de facteur de réveil est ajouté dans les puits, soit une concentration finale de 10% pour l'OADC ou 50% pour le CF, afin d'obtenir une concentration de bactéries à 10^3 bactéries/mL.

7) Les plaques sont incubées à 37°C pendant 21 jours.

IV. Facteurs induisant le réveil

Nous avons cherché à caractériser un peu plus en détail les facteurs qui induisent le réveil dans notre modèle de DCTB, d'une part pour optimiser notre modèle en utilisant les meilleures conditions, et d'autre part pour mieux comprendre ce processus.

L'albumine a montré sa capacité à induire la croissance des DCTB. Afin d'étudier plus en détail cet effet, des albumines avec différents niveau de purification, OADC, BSA fraction V et BSA dépourvue d'acides gras (BSA FA), ont été testées pour leur capacité à induire le réveil des DCTB en milieu Sauton-glycérol-tyloxapol. Chacune de ces sources d'albumine favorise la croissance bactérienne, mais avec des vitesses de croissance différentes (**Figure 44**). Il est intéressant de noter que des niveaux plus élevés de purification de la BSA (par exemple, la BSA FA) ont été associés à une induction plus faible de la croissance, ce qui suggère que des composants spécifiques ou des impuretés présents dans les préparations de BSA moins purifiées pourraient contribuer au réveil des DCTB.

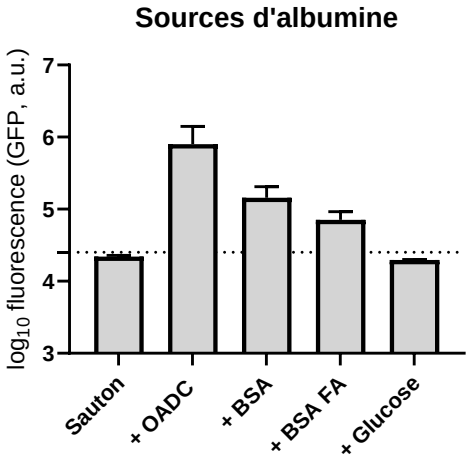


Figure 44 : Réveil des DCTB en présence d'albumine avec différents degrés de purification.
Diverses sources d'albumine ajoutées à 5 g/L ont été testées pour leur capacité à induire la croissance de la souche *M. tb* L1-500960 à 10^4 bactéries/mL, dans un milieu Sauton. L'intensité de fluorescence de la GFP a été mesurée après 21 jours d'incubation. Les données sont présentées sous forme de moyenne + écart-type de deux réplicats biologiques. La ligne pointillée représente le seuil de croissance positive, calculé comme suit : $(\text{médiane}_{\text{ctlr.négatif}} + 3*\text{SEM}_{\text{ctlr.négatif}})*2$.

Le même test que ci-dessus a été effectué en cinétique, pour caractériser plus en détails les différences observées. Aucune croissance n'est détectée dans le milieu seul, à l'instar du milieu Sauton + glucose, confirmant le maintien du phénotype DCTB (**Figure 45**). L'OADC permet le réveil le plus rapide, avec une croissance détectable après 7 à 14 jours. Pour la BSA et la BSA FA, il faut attendre quelques jours de plus, soit 14 à 21 jours, ce qui est identique à la cinétique obtenue pour le CF Sauton. Toutefois, la BSA FA montre une puissance de réveil moindre que celle obtenue par la BSA. Ces observations sont cohérentes avec l'expérience précédente, et suggèrent la présence d'un composant lié à la BSA qui favoriserait le réveil.

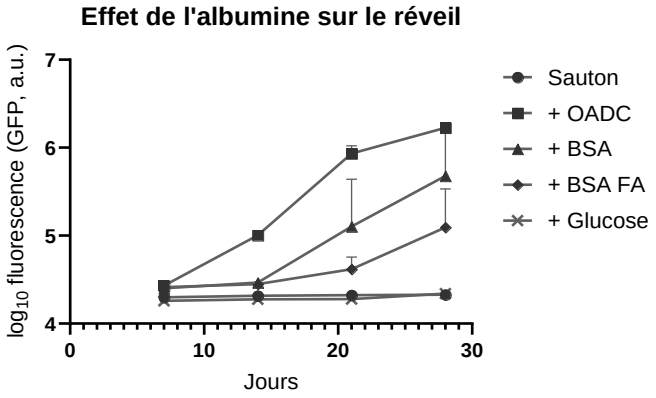


Figure 45 : Cinétique de l'effet de différentes sources d'albumine sur le réveil de DCTB.
Cinétique de croissance de *M. tb* L1-500960 à un inoculum initial de 10^3 bactéries/mL, dans un milieu Sauton seul ou supplémenté avec diverses sources d'albumine à 5 g/L. Les données sont présentées sous forme de moyenne + écart-type de quatre réplicats biologiques.

Nous avons montré que le réveil de *M. tuberculosis* L1-500960 est sensible à la quantité de facteurs présents dans le surnageant de culture. Nous avons cherché à déterminer si un phénomène similaire pouvait être observé avec l'albumine, retrouvé ici dans l'OADC. De plus, nous avons vu au début de l'étude que *M. tb* H37Rv pouvait également être amené à l'état de DCTB par la méthode de dilution de culture, même si cet état était moins stable que chez *M. tb* L1-500960. Afin de comparer l'effet de ces deux facteurs inducteurs de croissance, *M. tb* H37Rv et L1-500960 ont été cultivées en milieu Sauton jusqu'en fin de phase exponentielle, puis les inocula auxquels sont observés le phénotype DCTB (10^4 et 10^3 bactéries/mL pour H37Rv et L1 respectivement) ont été testés pour leur croissance en présence de CF Sauton, OADC ou la combinaison CF Sauton + OADC, à différentes concentrations. Comme nous l'avons déjà observé pour le CF, l'OADC et la combinaison CF + OADC induisent un réveil de manière dose-dépendante, de façon comparable pour les deux souches de *M. tuberculosis* (**Figure 46**). On remarque également une grande

variabilité dans le réveil induit par le CF Sauton + OADC dans les deux souches. Nous ne pouvons pas conclure quant à l'existence d'un effet synergique ou additif entre les deux facteurs de réveil, ceux-ci n'ayant pas été testés aux mêmes concentrations que lorsqu'ils sont évalués séparément.

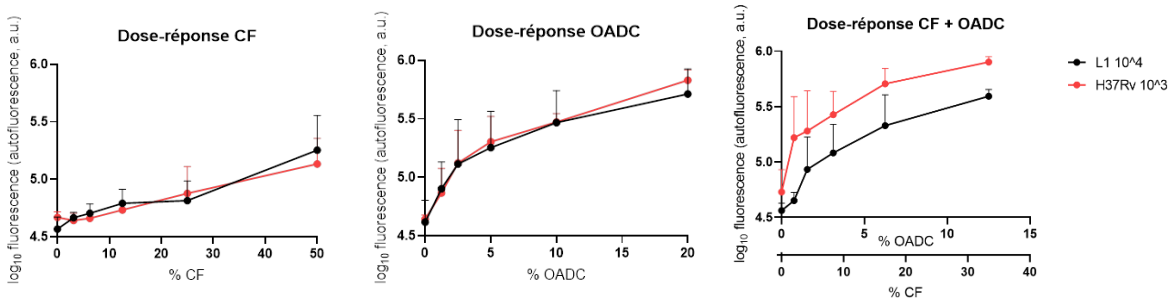


Figure 46 : Effet de la dose de CF et/ou d'OADC sur le réveil des DCTB.
M. tb L1-500960 et H37Rv ont été induits dans un phénotype DCTB à des inocula de 10^4 et 10^3 bactéries/mL respectivement, et cultivés dans un milieu Sauton. Les facteurs de croissance CF, OADC et CF + OADC ont été ajoutés à différentes concentrations pour chacune des deux souches. Après 28 jours de contact avec les facteurs de croissance, le signal d'auto-fluorescence a été mesuré 475 nm. Les données sont présentées sous forme de moyenne + écart-type de quatre réplicats biologiques.

V. Discussion

Au cours de ce projet, nous avons développé et caractérisé un modèle *in vitro* de *Mycobacterium tuberculosis* dans un phénotype DCTB. Ce modèle a été développé chez la souche *M. tb* L1-500960, qui se prête plus facilement à l'induction du phénotype DCTB que la souche de référence H37Rv. Il permet de générer des bactéries non réplicatives par simple dilution d'une culture en fin de phase exponentielle dans un milieu Sauton, qui s'est révélée plus robuste que d'autres formulations testées. Les DCTB obtenus par ce modèle sont dépendants du surnageant d'une culture indépendante de *M. tb* et/ou de l'albumine pour leur réveil.

Les modèles classiquement utilisés, comme l'hypoxie de Wayne, une carence en nutriments ou en potassium, ou encore un milieu acide reposent tous sur l'exposition à des conditions stressantes que la bactérie peut rencontrer chez l'hôte. Dans ces modèles, la reprise de croissance s'effectue lors du transfert dans un milieu plus permissif, dépourvu de ces stress [182,202,211,213]. Nous avons établi un modèle qui permet l'obtention de bactéries non cultivables, sans l'ajout d'un stress externe et réveillables par du surnageant de culture, ce qui le rapproche des DCTB isolés chez les patients [103,104].

Les DCTB sont retrouvés dans les expectorations de patients atteints de tuberculose pulmonaire, mais également dans des formes extra-pulmonaires, ce qui souligne leur pertinence clinique [269,287,288]. Le modèle dont nous nous sommes inspirés repose sur l'isolement de DCTB dans des cultures de *M. tb* très âgées (> 8 mois) et sur l'observation que leur dilution nécessite la présence de CF pour leur permettre de se répliquer en milieu solide et liquide [216]. Nous avons confirmé que la proportion de DCTB augmente avec l'âge de la culture, et également mis en évidence l'existence de cette sous-population dès la phase exponentielle de croissance, ce qui facilite l'utilisation du modèle. Ainsi, la génération de DCTB semble être un comportement intrinsèque des bactéries, et non une réponse à un stress exogène. Cependant, leur présence en phase exponentielle est intrigante, car la sous-population peut être réveillée par l'addition de surnageant de culture (CF) provenant d'une autre culture, elle-même en phase exponentielle de croissance. Cette observation fait écho aux travaux de Dubos et al., qui avaient déjà montré qu'une culture en phase exponentielle devenait non réplicative lorsqu'elle était suffisamment diluée, mais ce phénomène n'était observable qu'en absence de Tween 80 ou d'albumine dans le milieu [281]. Deux hypothèses peuvent être proposées pour expliquer la présence de DCTB en phase exponentielle :

i) Les DCTB sont préexistantes dès la culture en phase exponentielle de croissance, Certains nutriments essentiels deviennent limitants au cours de la croissance, ce qui pousse une fraction de la population à entrer dans l'état DCTB malgré la présence de CF. Ainsi, il y a un équilibre dynamique entre bactéries réplicatives et DCTB au sein de la culture. Lors du transfert en milieu frais pour l'essai, l'apport des nutriments manquants combiné avec la présence des facteurs de croissance contenus dans le CF permettent d'initier la croissance.

ii) L'état DCTB est induit lorsque les bactéries sont diluées dans du milieu frais, dû à l'effet d'une diminution de densité de la population et le nombre insuffisant de signaux produits nécessaires à la réplication.

Nos résultats s'accordent davantage avec la première hypothèse, puisque l'on a montré que la durée de culture influence la proportion en DCTB. Toutefois, les deux hypothèses ne sont pas exclusives et une combinaison de ces deux facteurs peut aboutir au phénotype que nous observons.

La mise en place du modèle a constitué un véritable défi, en raison d'une forte variabilité des résultats obtenus, malgré l'application d'un protocole identique et l'utilisation de stocks standardisés de bactéries et de surnageant. L'identification de l'albumine comme facteur induisant le réveil des DCTB a représenté une étape clé dans l'établissement du modèle, car elle a permis de réduire fortement cette variabilité. Le rôle de l'albumine n'a pas été immédiatement questionné, bien qu'il soit déjà décrit dans la littérature, car le phénotype s'est montré reproductible malgré sa présence au début du projet. Cela suggère que des différences entre les lots d'OADC, probablement liés au degré de purification de l'albumine d'après nos expériences, peuvent influencer la robustesse du test. Des études ont déjà montré qu'une plus grande pureté de l'albumine, notamment en utilisant de l'albumine recombinante plutôt que de l'albumine purifiée d'un sérum, améliore la constance et la fiabilité des résultats [289]. Malgré l'exclusion de l'albumine du milieu, nous observons toujours quelques réveils stochastiques dans certaines expériences. Il apparaît nécessaire d'inclure systématiquement un nombre suffisant de contrôle de l'état DCTB et de s'assurer du phénotype avant l'analyse des expériences. Ainsi, nos résultats montrent que le modèle demeure sensible à de légères variations dans les conditions de culture.

En accord avec la variabilité observée dans cette étude, le caractère hétérogène d'une population clonale de *Mycobacterium tuberculosis* est déjà bien établi. Dans l'hôte, les bacilles colonisent différentes niches tissulaires et adoptent des stratégies distinctes pour s'adapter aux stress spécifiques à chaque micro-environnement [153,290]. En outre, la division asymétrique conduit à une distribution inégale des composants cellulaires dans les cellules filles, ainsi que des différences dans leur vitesse de réplication [166,290,291]. La tolérance aux antibiotiques illustre bien cette hétérogénéité, puisque c'est un trait non-héritable, présent seulement dans une fraction de la population [292]. Ainsi, la variabilité observée dans notre modèle reflète probablement l'absence de synchronisation au sein de la population. Par ailleurs, les phénomènes de croissance spontanée observés lors de l'induction du phénotype DCTB pourraient être attribués à la présence de bactéries encore cultivables, mais avec une phase de lag importante, qui reprendraient leur croissance [170]. C'est d'ailleurs ce que suggèrent les résultats de l'expérience de cytométrie en flux, puisqu'une petite sous-population présente parmi les bactéries non cultivables, qui caractérisées par une activité métabolique réduite, montre une activité métabolique plus élevée et semble également associée à une capacité de réplication plus importante.

Bien que nous ne puissions pas définir si les DCTB préexistants sont sélectionnés par dilution et/ou la dilution de la culture induit un état DCTB, la densité bactérienne demeure une variable importante dans notre modèle. Le *quorum sensing* est un type de communication intercellulaire, qui repose sur la production et la détection de petites molécules auto-inductrices, dont la concentration augmente avec la densité cellulaire. Lorsqu'un seuil de concentration est atteint, ces molécules déclenchent une régulation transcriptionnelle, aboutissant à une réponse collective et coordonnée de la population. Ce système est très bien caractérisé chez de nombreuses espèces bactériennes (*Pseudomonas aeruginosa, Vibrio fischeri*), avec l'identification des molécules auto-inductrices et du système senseur associé [293].

Chez *M. tb*, aucun système de *quorum sensing* n'a été décrit expérimentalement. Toutefois, plusieurs phénomènes suggèrent l'existence d'une forme de communication intercellulaire, notamment la production de biofilms, la formation d'agrégats et de cordes, ainsi que le système de réveil des bactéries non réplicatives auquel s'intéresse ce travail [294]. Des molécules contenues dans le surnageant tels que l'adénosine monophosphate cyclique (AMPc), certains acides gras, les muropeptides ou des molécules de signalisation redox influencent la physiologie de la population et permettent la transition de l'état non réplicatif à l'état réplicatif, aussi bien *in vitro*, *in vivo,* que chez les bacilles isolés de patients [103,104,260,261]. Globalement, ces études rapportent une dépendance entre la quantité de facteurs de réveil apportés et la charge bactérienne obtenue [177,261], pouvant refléter soit un nombre plus élevé de bactéries engagées dans la réplication, soit une vitesse de réplication accrue. Elles montrent également que ces molécules entraînent la réplication d'un faible inoculum de bactéries [103,216]. Néanmoins, ces travaux n'ont pas mis en évidence de seuil à partir duquel la concentration en molécules sécrétés permet la réplication des DCTB.

Dans notre modèle, le phénotype DCTB repose sur une faible densité bactérienne dans la culture et des facteurs de croissance ajoutés de manière exogène (CF ou albumine) pour réveiller les bacilles. Lorsque l'inoculum est faible, une quantité plus importante de surnageant est requise pour déclencher la réplication, tandis qu'à forte densité bactérienne, les bacilles pourraient produire eux-mêmes une quantité suffisante de molécules, empêchant l'établissement du phénotype non cultivable et réduisant ainsi la dépendance aux facteurs présents dans le CF. Cette double dépendance à la densité

bactérienne et la quantité de CF constitue une observation originale, qui suggère l'existence d'un mécanisme analogue au *quorum sensing*, où l'accumulation de molécules sécrétées au-delà d'un seuil critique déclenche la reprise de croissance. Il convient toutefois de rester prudent car cette expérience (Chapitre 1 III.A) n'a été réalisée que dans le milieu 7H9-OADC, et reste donc à vérifier en milieu Sauton.

L'identification des molécules susceptibles d'intervenir dans ce mécanisme constituerait une étape clé pour valider son existence chez *M. tb*. Ces molécules devraient logiquement être retrouvées dans le surnageant de culture et pourraient s'avérer être celles mentionnées précédemment. Plusieurs études ont montré que l'activité de réveil du surnageant persiste partiellement même après la déplétion en protéines Rpf, voire en protéines plus largement, indiquant que des facteurs de nature différente interviennent [103,216,250]. De plus, pour un même facteur de réveil, l'induction de la réplication diffère selon les échantillons cliniques utilisés [295]. Cette variabilité souligne la complexité de ce système, et nos résultats ouvrent la voie à l'exploration de potentiels mécanismes de communication intercellulaire propre à *M. tb*.

L'albumine apparaît comme un inducteur de réveil dans notre modèle. Une première hypothèse est qu'elle capte certaines molécules nécessaires au réveil, augmentant ainsi leur disponibilité pour les bactéries, comme cela a déjà été décrit pour des acides gras ou le fer [286,296]. Cette idée est renforcée par nos données, montrant qu'une albumine avec un degré de purification plus élevé, contenant moins d'acides gras, est moins efficace sur le réveil. Une seconde hypothèse est que l'albumine pourrait jouer un rôle protecteur en neutralisant des métabolites toxiques [297]. Dans ce cas, elle pourrait capter des inhibiteurs de croissance produits par les bactéries et empêcher l'induction du phénotype DCTB.

Le modèle présenté dans ce projet a été développé en utilisant la souche *Mycobacterium tuberculosis* L1-500960. Ce choix a été motivé par l'observation d'une différence dans la capacité de formation des DCTB, cette souche produisant plus facilement le phénotype non réplicatif que la souche de référence *M. tb* H37Rv. L'observation de différences de cet ordre entre lignées n'est pas nouvelle, puisqu'une étude réalisée en carence nutritive a montré que des souches cliniques appartenant à la lignées 2 (*M. tb* Beijing) sont plus dépendantes à la présence de surnageant de culture pour initier leur réplication que des souches appartenant à la lignée 4 (*M. tb* LAM) [295]. Ces différences inhérentes aux souches

pourraient contribuer à mieux identifier les déterminants génétiques ou physiologiques impliqués dans l'induction du phénotype DCTB, et ainsi permettre d'en élucider le ou les mécanismes sous-jacents.

CHAPITRE 2

CARACTERISATION PHÉNOTYPIQUE, CRIBLAGE GÉNÉTIQUE ET DE MOLECULES SUR LE MODÈLE DCTB

Maintenant que le modèle DCTB est établi, le second objectif de ce travail est sa caractérisation phénotypique, l'identification de gènes importants pour la survie et le maintien de l'état DCTB, et l'identification de molécules capables d'affecter cet état non cultivable. Les optimisations méthodologiques réalisées dans la première partie du projet (miniaturisation, stabilité) rendent désormais ce test compatible avec des approches de criblage à grande échelle, qu'elles soient génétiques (CRISPRi) ou à l'aide de molécules.

L'induction de l'état non ou faiblement réplicatif est un mécanisme finement régulé [222,298,299], qui permet de résister aux stress rencontrés chez l'hôte (hypoxie, carence en nutriments, stress oxydant) [166,298] et qui confère à *M. tb* une large tolérance aux antibiotiques pendant le traitement [300]. Une caractérisation phénotypique plus approfondie, combinée à une analyse fonctionnelle génétique permettra de mieux comprendre les mécanismes physiologiques et les déterminants géniques associés à l'état DCTB dans ce modèle.

Sur le plan clinique, la présence des DCTB chez le patient constitue une double contrainte, affectant à la fois les étapes du diagnostic et l'efficacité thérapeutique. En effet, une étude a montré qu'à la fin d'un traitement antituberculeux, 93% des patients sont déclarés négatifs par culture standard, alors qu'un test MGIT supplémenté en filtrat de culture ou en protéines Rpfs permet de détecter des DCTB dans 74% de ces mêmes patients [276]. Ces résultats indiquent que les DCTB, non détectables par les techniques conventionnelles de culture, conduisent à une sous-estimation de la charge bacillaire et à une évaluation incomplète de la stérilisation mycobactérienne en fin de traitement [103,271,276].

L'ajout de filtrat de culture, bien qu'efficace pour réveiller ces bactéries, reste inapplicable en routine clinique pour des raisons de sécurité biologique. Par ailleurs, les molécules identifiées à ce jour comme inductrices de réveil (Rpfs, AMPc, phospholipides, acides gras) se montrent inefficaces sur certaines sous-populations de DCTB [250], reflétant leur hétérogénéité. L'identification de nouvelles cibles génétiques ou de petites molécules de

synthèse capables d'induire le réveil des bactéries et facilement intégrables dans une routine de diagnostic microbiologique représenterait une avancée majeure.

Si la majorité des efforts actuels visent à découvrir des molécules actives contre les formes non réplicatives de *M. tuberculosis* [80], il n'y a pour le moment pas de molécules montrant une activité complètement stérilisante chez les patients. Une stratégie complémentaire, encore exploratoire, consisterait à stimuler le réveil des DCTB pour les rendre sensibles à des antibiotiques rapidement bactéricides, comme l'isoniazide, et ainsi améliorer l'efficacité de la thérapie antituberculeuse [78].

I. Propriétés phénotypiques

Après avoir établi notre modèle de DCTB, nous avons cherché à caractériser l'activité métabolique de *M. tb* L1-500960 dans ce modèle, afin de mettre en évidence une éventuelle ressemblance avec d'autres modèles de bactéries non réplicatives déjà décrits. La cytométrie en flux apparaît comme un outil pertinent pour explorer ces aspects, puisqu'elle peut être appliquée sur des échantillons bactériens faiblement concentrés, et permet une caractérisation individuelle des bactéries constituant la population.

Nous avons retenu quatre marqueurs pour la caractérisation de notre modèle de DCTB. La viabilité cellulaire et l'intégrité membranaire sont évaluées par l'iodure de propidium (PI), qui pénètre dans les bactéries ayant une membrane altérée, puis se lie à l'ADN. Il permet de discriminer les cellules mortes ou fortement endommagées des cellules vivantes. L'activité métabolique est étudiée à l'aide de la fluorescéine diacétate (FDA), qui forme la fluorescéine lorsqu'elle est hydrolysée par les estérases intracellulaires [301]. De ce fait, elle devient un indicateur de l'activité enzymatique. Plusieurs études ont montré que les bactéries non réplicatives conservent un métabolisme actif mais réduit, associé à une activité ribosomale permettant la synthèse de nouvelles protéines [166]. Elles sont en effet capable de maintenir certaines voies métaboliques essentielles, tout en en réorganisant d'autres, afin d'assurer leur survie [214,302]. L'accumulation lipidique, en particulier au sein de gouttelettes intracellulaires, peut être mise en évidence par le rouge de Nile (NR). Ces gouttelettes s'accumulent chez *M. tb* en état de dormance, permettant l'adaptation et la survie du bacille dans cet état [195,303]. Enfin, le statut redox intracellulaire des mycobactéries peut être suivi grâce au CellROX™ Deep Red (CellROX), qui devient

fluorescent lorsqu'il est oxydé. L'induction d'un stress oxydant peut être un signal déclenchant l'entrée en dormance [304], et entraîner l'activation du régulon DosR, classiquement observée dans de nombreux modèles de dormance [191,298,305].

Les marquages de cytométrie ont été effectués sur 4 types de populations : (i) des cellules en phase exponentielle de croissance en milieu Sauton, (ii) des cellules amenées au phénotype DCTB par dilution à 10^3 bactéries/mL en milieu Sauton pendant 7 jours (iii) la même condition en présence de 10% d'OADC afin de réveiller les DCTB et (iiii) des cellules « *heat-killed* » préparées avant le marquage. Un contrôle négatif constitué de bactéries non-marquées a également été inclus, permettant de déterminer le seuil de positivité du signal de fluorescence.

Concernant le marqueur de viabilité/altération membranaire (PI), seul *M. tb* L1-500960 « *heat-killed* » a présenté un signal positif (**Figure 47A**), même si une partie de la population est restée viable. Dans toutes les autres conditions, nous avons observé que les signaux se superposent et restent négatifs, suggérant que la population de DCTB est composée en majorité de bactéries viables, avec une paroi intacte.

Concernant le marqueur CellROX, l'ensemble des bactéries viables, incluant les bactéries réplicatives, DCTB et réveillées par l'OADC et les *M. tb* « *heat-killed* » ont présenté un profil de fluorescence négatif, indiquant l'absence d'oxydation détectable dans toutes ces populations, dont le modèle DCTB (**Figure 47B**). Concernant l'accumulation de gouttelettes lipidiques (NR), il n'y a pas de profil différentiel apparent entre les bactéries réplicatives et non réplicatives, ce qui suggère qu'il n'y a pas d'accumulation de lipides dans les DCTB (**Figure 47C**).

Le marquage d'activité métabolique (FDA) permet de distinguer différentes populations. Comme attendu, les bactéries « *heat-killed* » n'ont pas montré activité métabolique, tandis que les bactéries réplicatives (en phase exponentielle ou réveillées par l'OADC) ont montré des signaux positifs superposables (**Figure 47D**). Les DCTB ont également montré un signal positif, mais pratiquement deux fois plus faible que celui des bactéries réplicatives, suggérant une activité métabolique réduite (**Figure 47D, E**).

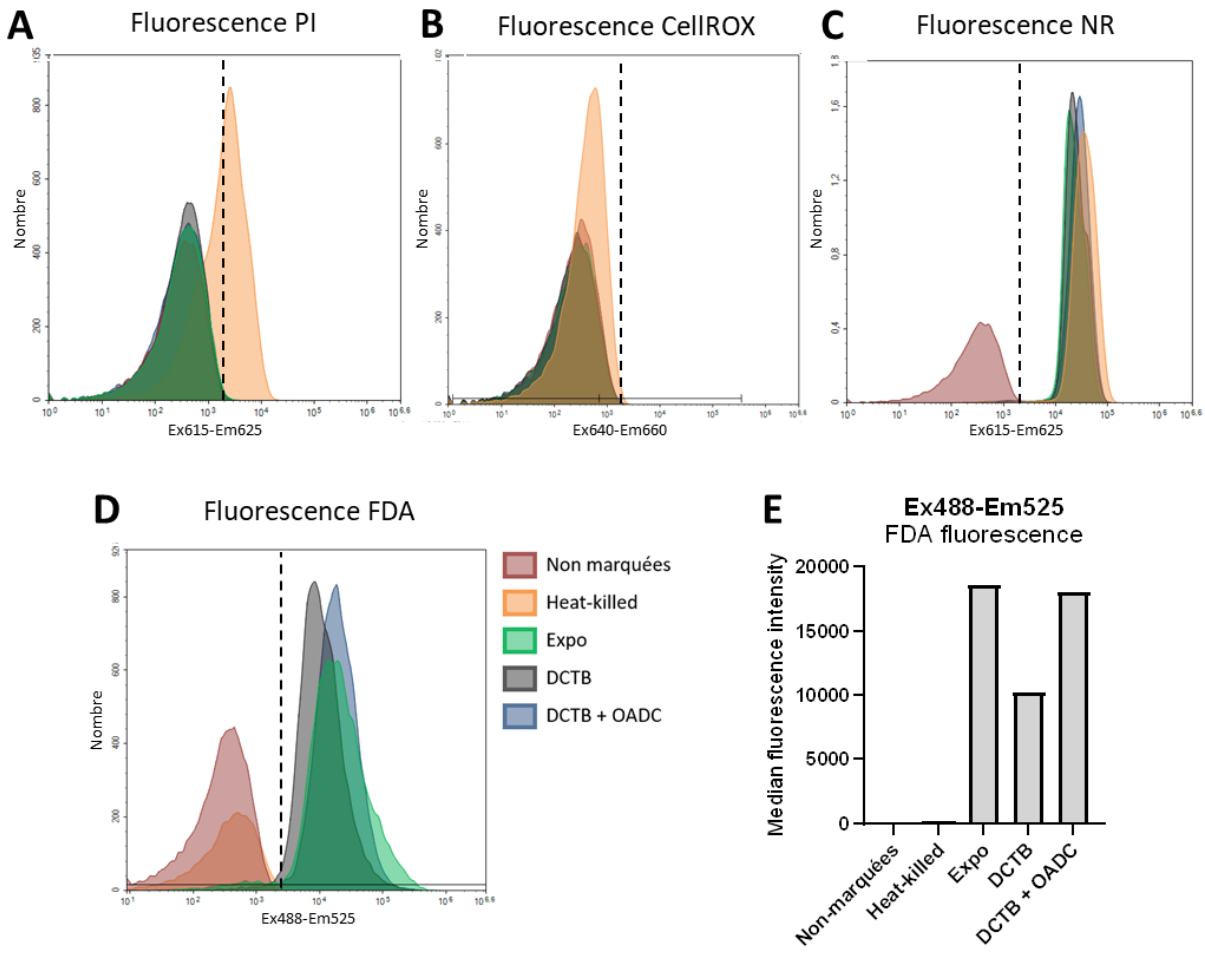


Figure 47 : Caractérisation phénotypique des DCTB par cytométrie en flux.
M. tb L1-500960 a été amenée à différents états physiologiques : phase exponentielle de croissance en milieu Sauton, phénotype DCTB par dilution à 10^3 bactéries/mL en milieu Sauton pendant 7 jours, en présence ou non de 10% d'OADC. Des bactéries « *heat-killed* » ont été inactivées par un traitement thermique de 30 min à 90°C. Ces différentes populations ont été incubés avec différents marqueurs : (A) iodure de propidium (PI, 20 µg/mL, 15 min à température ambiante), (B) CellROX™ Deep Red (CellROX, 5 µM, 45 min à 37°C), (C) rouge de Nile (NR, 5 µg/mL, 45 min à 37°C) ou (D) fluorescéine diacétate (FDA, 1,35 µM, 45 min à 37°C). La ligne pointillée représente la distinction entre signal négatif et signal positif de fluorescence, déterminé à partir du spectre de fluorescence des bactéries non marquées. (E) La médiane d'intensité de fluorescence émise dans la condition en présence de FDA est représentée, pour chacune des populations *M. tb* L1-500960.

Cette expérience n'ayant été réalisée qu'une seule fois, il n'est pas possible de conclure définitivement sur ce phénotype. Cette réduction de l'activité métabolique est cohérente avec les observations obtenues précédemment chez les DCTB collectées d'une culture en 7H9-OADC (Chapitre 1 III.B.). En conclusion, les DCTB obtenus dans ce modèle présentent un métabolisme plus faible que celui des bactéries réplicatives, ce qui est en accord avec des observations rapportées sur d'autres modèles de *Mycobacterium tuberculosis* non réplicatives [166,202].

II. Criblage génétique et de petites molécules sur le modèle DCTB

A. Description des criblages

La cytométrie en flux a montré que le modèle de DCTB, obtenu par la méthode de dilution décrite dans ce travail, conserve une activité métabolique. Néanmoins, les mécanismes cellulaires nécessaires à la survie de *M. tb* dans ce modèle demeurent inconnus. Plusieurs études se sont intéressées au profil d'expression génique des bactéries en conditions non réplicatives, ou lors de la reprise de leur réplication [191,202,211,303,306]. Toutefois, peu d'études ont évalué l'essentialité individuelle des gènes dans un contexte de non-réplication. Une telle approche pourrait fournir des connaissances supplémentaires, notamment en identifiant des cibles essentielles spécifiques à cet état, susceptibles de guider le développement de nouveaux inhibiteurs. En parallèle, l'identification de gènes essentiels au maintien de l'état DCTB constituerait des cibles intéressantes pour l'induction forcée d'un état réplicatif de cette population.

C'est pourquoi, une approche CRISPRi a été effectuée sur notre modèle DCTB. Le système CRISPRi repose sur l'utilisation d'une enzyme inactivée, la dCas9, qui, guidée par un ARN simple guide (sgRNA), se fixe sur une région spécifique du génome. La fixation de la dCas9 entraîne un encombrement stérique qui bloque la progression de l'ARN polymérase et inhibe ainsi la transcription du gène ciblée, produisant un effet de type *knockdown*. Le degré d'inactivation varie en fonction du sgRNA utilisé.

Par ailleurs, un criblage à haut-débit de 10 240 composés a été effectué sur nos bactéries dans un état DCTB. Les composés proviennent de la chimiothèque de l'Institut Pasteur de Lille, grâce à une collaboration avec l'équipe de Dr Nicolas Willand (U1177) et la Plateforme Lilloise Biologie Santé (PLBS -Ariadne). L'objectif de ce criblage est d'identifier des petites molécules capables de restaurer l'état réplicatif des DCTB. Ces molécules pourraient ensuite être utilisées pour l'étude de cette population et également servir d'outil sur le plan clinique.

Les résultats de ces deux approches ont fait l'objet d'une publication, insérée dans la partie ci-dessous. L'article présente d'abord de manière succincte le modèle DCTB, avec les résultats principaux provenant du premier chapitre de cette thèse. Les deux dernières parties décrivent la mise en œuvre et les résultats obtenus pour le criblage génétique et de petites molécules.

B. Article de recherche :

Modeling *Mycobacterium tuberculosis* Differential Culturability: From Genetic Screens to Chemical Resuscitation

Oriane Rivière[1], Justine Mortelecque[1,2], Cyril Gaudin[1], Camille Grosse[1], Julie Dumont[3,4], Paul Carré[3,4], Nicolas Willand[3], Florence Leroux[3,4], Alain Baulard[1,4,*§], Kamel Djaout[1,*]

[1] Univ. Lille, CNRS, Inserm, Institut Pasteur de Lille, U1019 - UMR 9017 - CIIL - Center for Infection and Immunity of Lille, Lille, France.

[2] Present address: Univ. Lille, Inserm, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, U1167 - RID-AGE - Risk Factors and Molecular Determinants of Aging-Related Diseases, Lille, France.

[3] Univ. Lille, Inserm, Institut Pasteur de Lille, U1177 - Drugs and Molecules for Living Systems, Lille, France.

[4]Univ. Lille, CNRS, Inserm, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, US 41 - UMS 2014 - PLBS, F-59000 Lille, France

[*]Contributed equally

[§] Corresponding author

Abstract

Tuberculosis relapse affects 2-5% of patients with drug-susceptible disease completing standard therapy, with up to 70% of cases attributed to endogenous reactivation of the original strain rather than exogenous reinfection. Some relapse cases are driven by a bacterial subpopulation called Differentially Culturable Tubercle Bacilli (DCTB) that is particularly difficult to diagnose, as it can only be cultured on media supplemented with culture filtrate from actively growing *M. tuberculosis*. Existing DCTB *in vitro* models produce bacilli that resuscitate spontaneously upon stress removal, failing to recapitulate the strict growth factor dependence observed in patient isolates. We developed an improved DCTB model utilizing a *Mycobacterium tuberculosis* Lineage 1 (L1) clinical isolate which exhibits a 100-fold higher frequency of DCTB formation compared to the

laboratory reference strain H37Rv. This model generates stable, viable but non-culturable populations through controlled dilution of early-stationary phase cultures. L1-derived DCTB require exogenous culture filtrate or oleic acid-albumin-dextrose-catalase (OADC) supplementation for consistent resuscitation, providing a stringent experimental platform for mechanistic studies. We validated this platform through genome-wide CRISPRi screening, identifying both growth-promoting and growth-inhibiting genetic determinants. Complementary high-throughput chemical screening of 10,240 compounds identified 45 resuscitation-promoting molecules. This robust model provides unprecedented opportunities to dissect DCTB metabolic pathways and screen for compounds targeting persistent mycobacterial populations, addressing a critical knowledge gap in tuberculosis pathogenesis research and opening new avenues for diagnostic biomarkers and therapeutic interventions targeting latent infection reservoirs.

Importance

Relapse after tuberculosis treatment remains a major obstacle to achieving a definitive cure and is often caused by drug-tolerant bacterial persisters that escape conventional therapy. We developed a robust laboratory model that mimics quiescent *M. tuberculosis* populations found during chronic infection. Using this system, we combined genetic screening with a large-scale search for chemicals that trigger bacterial resuscitation. This approach identified key genes and 45 small molecules that promote the restart of growth, providing mechanistic insights into *M. tuberculosis* persistence. Our method opens the door to improved diagnostic tests that could identify patients at risk of relapse and to novel therapies that could eliminate these hard-to-treat bacteria by making them sensitive again to antibiotics.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*, DCTB model, CRISPRi screening, drug screening, tolerance, persisters, resuscitating factors

Introduction

Tuberculosis (TB), caused by *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*), remains one of the world's most prevalent infectious diseases. In 2023 the World Health Organization

estimated 10.8 million incident cases, including 8.2 million newly diagnosed individuals (WHO, 2024). Even after completing standard anti-tubercular therapy, 2-5% of patients experience recurrent disease episodes. Molecular epidemiological studies demonstrate that approximately 70% of these episodes are true relapses rather than exogenous reinfection with genetically disctinct strains (Colangeli et al., 2018; Vega et al., 2021). This distinction is clinically critical, as acquired drug resistance is far more prevalent in relapsed cases. While only 3.2% of new TB cases are multidrug- or rifampicin-resistant (MDR/RR-TB), the proportion rises to 16% among previously treated patients (Mandal et al., 2019; WHO, 2024).

Although acid-fast bacilli smear microscopy and MGIT liquid culture demonstrate apparent sterilization at treatment completion, multiple studies demonstrate that Differentially Culturable Tubercle Bacilli (DCTB) can persist as a viable but non-culturable bacterial subpopulation that exhibits growth factor-dependent resuscitation. These metabolically constrained organisms fail to proliferate on standard mycobacterial media but retain culturability when grown on media supplemented with culture filtrate (CF) derived from logarithmic-phase *M. tuberculosis* cultures (Fig. 1) (Beltran et al., 2020; Chengalroyen et al., 2016; Mukamolova et al., 2010; Peters et al., 2023).

Due to their metabolically quiescent state, DCTB exhibit intrinsic drug tolerance to frontline anti-tubercular agents (Fig. 1) (Turapov et al., 2016), a property that likely prolongs therapy and contributes to relapse if the bacilli resume active growth. Clinically, DCTB populations have been detected not only after treatment but also prior to therapy initiation, in both drug-sensitive and MDR-TB cases, and across diverse *Mtb* lineages (Chengalroyen et al., 2022; Dusthackeer et al., 2019; Gordhan et al., 2024; Peters et al., 2023; Saito et al., 2017; Zainabadi et al., 2021).

DCTB resuscitation can be achieved through exposure to specific bioactive components within CF, with five secreted peptidoglycan endopeptidases—Resuscitation-Promoting Factors A through E (RpfA-E)—representing key signaling molecules in this experimental model. (Gordhan et al., 2022; Mukamolova et al., 2010; Shleeva et al., 2013; Zhang et al., 2001). The species-specificity of CF-mediated resuscitation is demonstrated by the inability of heterologous culture filtrates from phylogenetically distant bacteria, such as *Mycobacterium smegmatis* or *Escherichia coli*, to stimulate DCTB recovery *in vitro* (Sun and Zhang, 1999).

Recognizing and targeting these quiescent yet viable bacilli is therefore essential for setting reliable treatment end points, preventing relapse, and designing both diagnostics and therapies that can deliver truly durable cures while preventing the emergence of drug resistance.

To fight this non-culturable form of *M. tuberculosis*, several strategies have been developed. Pyrazinamide (PZA) has remained a cornerstone of first-line therapy since the 1980s, owing to its unique activity against persisters that survive rifampicin, isoniazid, and ethambutol (Zhang et al., 2013). High-dose rifampicin and bedaquiline also enhance sterilization in murine models (Hu et al., 2019, 2015), but their combination remains untested in humans and is challenged by rifampicin's reduction of bedaquiline exposure via CYP3A4 induction. Pretomanid, active against non-replicating bacilli, has progressed to clinical evaluation in BPaL, ZeNix, BPaLM, and BPaMZ regimens, enabling shorter, all-oral treatment of drug-resistant TB. Additional candidates targeting drug-tolerant populations include delamanid, clofazimine, and oxazolidinones, while others such as nitazoxanide, pretomanid analogues, and host-directed therapies remain in early development. Nevertheless, important limitations persist, as Peters *et al.* recently showed that residual DCTB at treatment completion strongly predict subsequent relapse (Peters et al., 2023). These findings underscore the urgent need for clinical tools to eliminate persistent populations early in therapy and to detect their presence as markers of treatment success and relapse risk.

Given their clinical importance, developing reliable *in vitro* models is crucial to unravel DCTB biology and accelerate the discovery of effective strategies to target this subpopulation. Several *in vitro* models have been developed to generate DCTB, mainly by simulating specific stresses encountered during infection, such as hypoxia, nutrient starvation, acidic pH, or antibiotic pressure. These models can successfully induce a non-replicative, drug-tolerant state (Salina and Makarov, 2022; Zhang, 2004). However, the non-culturable bacilli produced in these models differ from those observed in patient *sputum*: their resuscitation typically occurs spontaneously upon stress removal, without requiring external growth factors such as those present in CF. This behavior suggests a reversible pause rather than a stable phenotypic switch (Balaban et al., 2004).

To better capture clinical reality, Sun and Zhang showed that long-term (up to eight-month) stationary-phase cultures spontaneously generate DCTB that revive only when CF

is added (Sun and Zhang, 1999). Subsequent transcriptomic and proteomic studies confirmed that these bacilli exhibit distinct signatures, implying an actively regulated growth arrest rather than simple nutrient exhaustion (Salina et al., 2009; Trutneva et al., 2020).

Building on this foundation, we now describe a robust *in-vitro* model that selects naturally occurring DCTB from early-stationary phase cultures without imposing artificial stress conditions. The selected bacteria are truly non-culturable yet viable bacilli that exhibit strict growth factor dependence, with resuscitation achievable through either CF or purified albumin supplementation.

Using this platform, we performed a genome-wide CRISPRi screen that pinpointed genes whose transcriptional silencing triggers spontaneous resuscitation, thereby highlighting active molecular mechanisms that maintain dormancy. In parallel, high-throughput chemical screening identified small molecules capable of reactivating DCTB, providing both mechanistic probes and translational leads. These findings open avenues for novel diagnostics to detect these bacilli and for therapeutic strategies that resuscitate persistent populations, restoring their susceptibility to standard antibiotics.

Results

A new DCTB model

We based our approach on Sun and Zhang's work, who previously described the emergence of differentially culturable tubercle bacilli (DCTB) in aged *Mycobacterium tuberculosis* cultures (Sun and Zhang, 1999). We first quantified the kinetics of DCTB accumulation in cultures of *M. tuberculosis* H37Ra.

Triplicate cultures were initiated at OD_{600} = 0.05 in standard 7H9 broth (glycerol, Tween 80, and OADC: oleic acid, albumin, dextrose, catalase). At weekly intervals, we removed 1 mL aliquots and normalized each to OD_{600} = 0.1. We then performed most-probable-number (MPN) liquid assays by inoculating serial dilutions into (i) standard 7H9-OADC to estimate the replicating population and (ii) 7H9–OADC supplemented with culture filtrate (CF) to recover all viable bacilli, including DCTB. The DCTB fraction was calculated as the CF-supported viable count divided by the count in standard medium (Fig. 2, 3A).

Between OD_{600} 0.05 and 1, DCTB were enriched ~10-fold relative to actively dividing bacilli. Shortly after the culture reached $OD_{600} \approx 1.0$, DCTB outnumbered replicating cells by $\sim 10^3$-fold, and over the subsequent 15 days this enrichment increased to a plateau of up to $\sim 10^5$-fold (Fig. 3A). The pronounced imbalance between DCTB and replicating bacilli suggests that simple dilution of early-stationary-phase cultures might yield an enriched DCTB population. Accordingly, we took an H37Rv culture at $OD_{600} \approx 1.0$, performed 10-fold serial dilutions, and inoculated into 7H9–OADC with or without CF supplementation, followed by 21 days of incubation (Fig. 3B). Dilutions below $\sim 10^5$ CFU.mL^{-1} failed to grow in standard medium, whereas growth was observed with CF down to $\sim 10^2$ CFU.mL^{-1}.

Thus, late-exponential cultures contain approximately 10^2-10^4 times more DCTB than replicating bacilli, enabling facile enrichment of this subpopulation by simple dilution. Notably, the CF-responsive growth of the isolated subpopulation mirrors that of bacilli recovered from tuberculosis patients (Chengalroyen et al., 2016; Mukamolova et al., 2010), indicating that our model recapitulates a clinically observed phenotype.

M. tuberculosis Lineage 1 improves the DCTB model

To improve our model, we exploited the finding that Lineage 1 (L1) isolates require substantially higher inoculum densities than H37Rv to establish consistent growth *in vitro*. Using a representative L1 clinical strain from the BCCM collection (catalogue no. 500960; hereafter *Mtb* L1-500960), we performed limiting-dilution assays (Fig. 3C). Most-probable-number (MPN) analysis showed that *Mtb* L1-500960 had ~2 logs fewer culturable cells than H37Rv, despite equivalent total bacillary loads (Fig. 3D). This corresponds to an approximately 100-fold higher frequency of differentially culturable tubercle bacilli (DCTB) in *Mtb* L1-500960 relative to H37Rv.

Functionally, H37Rv-derived DCTB seeded at 10^2 CFU.mL^{-1} occasionally resuscitate in the absence of CF (Fig. 3B), whereas spontaneous recovery of *Mtb* L1-500960 DCTB is only observed at inocula $\geq 10^4$ CFU.mL^{-1} (Fig. 3C). This higher resuscitation threshold makes the L1-500960 background a more stringent and reproducible platform for high-throughput screening (HTS) of small molecules that "wake up" DCTB, by minimizing false positives arising from rare CF-independent regrowth. Accordingly, we prioritized *Mtb* L1-500960 for downstream screens and validation assays.

To evaluate the reproducibility of the *Mtb* L1-500960 DCTB phenotype, we inoculated hundreds of wells at 10^3 CFU.mL^{-1} and monitored them for 28 days (Fig. 3E). In wells supplemented with CF, resuscitation was consistent across all replicates; in unsupplemented wells, the vast majority remained negative, but a small subset nonetheless exhibited spontaneous growth. Because this stochastic recovery would produce numerous false positives in our planned high-throughput screens, we next set out to identify culture conditions that suppress, or at least minimize, spontaneous DCTB resuscitation.

Medium composition tunes spontaneous resuscitation and assay stringency

Because shifts in carbon source have been documented to toggle between non-replicative and replicative states (Baek et al., 2011), we next examined the impact of various carbon source on the frequency of spontaneous "wake-up" events in 384-well plates inoculated with diluted early-stationary-phase cultures. Replacing OADC and glycerol with alternative carbon sources (sucrose, glucose, cholesterol, acetate, propionate, pyruvate, palmitic acid, or stearic acid) did not appreciably change the baseline frequency of spontaneous resuscitation (Supplementary data). However, when the individual components of enriched 7H9 medium were tested in a detergent-free 7H9-glycerol background, OADC induced resuscitation, similarly to the combination of albumin and glucose (Fig. 4A). Since oleic acid, glucose, and Tween 80 alone had no effect, these findings suggest that albumin may represent the critical factor responsible for DCTB spontaneous resuscitation.

Notably, we observed lot-to-lot variability in commercial OADC preparations: some lots supported robust DCTB formation at low inoculum, whereas others produced a high frequency of spontaneous wake-ups. Using higher-purity BSA (e.g., fatty-acid–free BSA) reduced these events, consistent with the hypothesis that trace components or impurities present in standard-grade BSA can stimulate resuscitation (Fig. 4B).

We then evaluated Sauton medium with glycerol as the major carbon source, a controlled formulation that minimizes undefined additives. Diluted samples from $OD_{600} \approx 1.0$ Sauton cultures (to $\sim 10^3$ CFU.mL^{-1}) maintained the L1 strain in a stable DCTB state with very low spontaneous resuscitation. In contrast, supplementing Sauton with CF or with OADC yielded a high frequency of resuscitation after 14 days (Fig. 4C, D). In summary,

low-inoculum *M. tuberculosis* L1-500960 in Sauton medium maintains a stable DCTB phenotype with minimal background regrowth, yet displays robust, stimulus-dependent resuscitation in the presence of OADC or CF. This combination of minimal background noise with robust stimulus-induced response establishes a stringent and reproducible foundation for screening and mechanistic studies.

CRISPRi reveals genetic determinants of DCTB resuscitation

We performed a genome-wide CRISPR interference (CRISPRi) screen to identify genes that modulate resuscitation of DCTB in our model. The RLC12 sgRNA library (Bosch et al., 2021) was introduced into the L1-500960 strain at ~130× coverage to ensure comprehensive genomic representation. Given that DCTB exist in a non-replicating state, we first verified that CRISPRi could be induced under these conditions. Cultures were grown in Sauton medium and diluted to low density to enrich in DCTB. The diluted cultures were then incubated with or without anhydrotetracycline (ATc) before RNA extraction. As dCas9 and the sgRNAs are driven by the same promoter, induction of *dcas9* transcripts served as a proxy for library activation; exponentially growing cells were included as a control. Under low-density DCTB conditions, *dcas9* expression increased ~22-fold, compared with >100-fold in exponential-phase cells (Fig. 5A). Although induction was lower in DCTB, these data demonstrate that the CRISPRi library is expressed in this state, supporting the feasibility of a genome-wide screen for determinants of DCTB resuscitation.

To uncover genes influencing DCTB resuscitation, we monitored the recovery of our L1-CRISPRi library following prolonged induction. Library cultures were maintained with or without ATc for three weeks, after which ATc was withdrawn and OADC was added to trigger outgrowth. Both induced and uninduced cultures were expanded to mid-exponential phase, collected, and processed for genomic DNA extraction, library preparation, and sequencing. Principal component analysis (PCA) of the six samples (three biological replicates per condition) revealed a clear separation between ATc-induced and uninduced populations, indicating that ATc treatment was the dominant factor shaping the dataset (Supplementary Data). The strong clustering of biological replicates underscored the robustness of the experiment. The distribution of $\log_2$ fold change ($\log_2$FC) values across all genes showed the expected pattern: most genes

clustered around zero, reflecting no effect on resuscitation, while distinct subsets displayed negative or positive shifts, indicating genes whose silencing impaired or promoted resuscitation respectively (Fig. 5B). This distribution further confirmed the overall quality of the CRISPRi screen and provided a solid basis for downstream analysis.

This analysis identified a set of genes in which knockdown reproducibly promoted resuscitation of dormant, non-replicating bacteria (Fig. 5C). Among these, *phoP*, *phoR*, *ppe51*, and *esxK* showed significant enrichment ($log_2FC > 1$; FDR < 0.01). PhoP and PhoR form a two-component regulatory system that controls a large regulon in *M. tuberculosis* (Singh et al., 2023). PPE51 encodes a transmembrane protein previously associated with bacterial growth under stress conditions (Baker and Abramovitch, 2018; Dechow et al., 2022). EsxK encodes a secreted protein that has been described as a substrate of the ESX-5 secretion system, where it interacts with EsxL (Bukka et al., 2012).

In addition, *esxK* was found to be transcriptionally upregulated at the onset of resuscitation following potassium depletion (Salina et al., 2019), while proteomic analyses revealed decreased abundance of EsxK under nutrient starvation compared to exponential phase cultures (Albrethsen et al., 2013). The identification of these genes in our CRISPRi screen is therefore consistent with previous reports suggesting a role for these factors in the balance between non-replicative persistence and resuscitation.

For genes whose knockdown negatively impacted resuscitation (Fig. 5C, D), we compared our data with a published CRISPRi screen of *M. tuberculosis* H37Rv growing exponentially in rich medium (Bosch et al., 2021). We observed a substantial overlap in essential genes between DCTB and exponential conditions (Fig. 5E). Genes required under both conditions included those involved in **translation** (*rps, rpl, rpm* ribosomal subunits; tRNA synthetases; tRNAs), **respiration** (*atp* electron transport chain; *hem* heme biosynthesis; *qcrA-C* cytochrome reductase), **amino acid biosynthesis**, and **cell envelope functions** (*murB-F* peptidoglycan synthesis; *embA-C* arabinogalactan synthesis; *pbpA/B* penicillin-binding proteins; *sec* secretion system; *ecc* components of ESX-3 and ESX-5; *fabD, fabG1* fatty acid biosynthesis; *fas, inhA, kasA/B, dprE1* mycolic acid biosynthesis). These findings indicate that even in the peculiar DCTB state, *M. tuberculosis* remains metabolically active and continues to remodel its cell wall. Consistent with this, previous studies of hypoxia- and nutrient-starvation–induced dormancy also reported ongoing basal respiration and protein synthesis, while lipidomic approaches have shown a change in cell wall

composition, supporting the idea that these processes are essential for survival across non-replicative models (Gengenbacher et al., 2010; Manina et al., 2015; Rao et al., 2008; Stokas et al., 2020).

We also identified genes involved in **DNA replication**, including core replication machinery components (*dna*, *gyrA*, *gyrB*), suggesting that bacilli may have residual replication events or require replication-associated functions during the transition toward growth arrest. In addition, several genes associated with **stress responses** were essential under our DCTB conditions. These included **chaperones** (*dnaK*, *groEL*), **proteases** (*clp* family), transcriptional **regulators** (*whiA, whiB1, whiB2, relA*), components of the **proteasome pathway** (*mpa, dop, pafA*), and **oxidative stress regulators** (*rslA, katG*). Chaperones and proteases are critical for maintaining protein quality control in *M. tuberculosis*, and their essentiality in our screen is consistent with previous reports showing their importance during stress adaptation (Betts et al., 2002; Salina et al., 2014, 2009).

Interestingly, several genes that are dispensable during exponential growth became essential under DCTB conditions (Fig. 5E). These included transporters and regulators for **potassium** (*ceoB, ceoC*), **phosphate** (*phoT, phoY2, pstC2, pstS1, pstS3*), **sulfate** (*cys* genes), and **iron** (*mbtB-E, furA*). Although these ions are present in the culture medium, their uptake and regulation systems were specifically required.

These findings demonstrate that dormancy and resuscitation of DCTB can be genetically controlled through targeted knockdown of specific pathways, opening the possibility that small molecules could similarly stimulate resuscitation by modulating the same regulatory circuits.

Small compounds are able to resuscitate bacteria:

Our DCTB model was subjected to a screening assay to identify molecules able to induce initiation of growth, mimicking the effect of quorum sensing effectors in CF. As described above, a Sauton culture of *M. tuberculosis* L1-500960 was diluted to a concentration of 10^3 CFU.mL^{-1}. DMSO was used as a negative control, while positive controls for bacterial resuscitation included bacteria incubated with Sauton medium supplemented with CF alone or CF and OADC.

A total of 10,240 compounds were tested at a 50 µM concentration, originating from the *Institut Pasteur de Lille- Chemical Library (U1177-Ariadne*). GFP signal was used as the primary readout for growth and was measured on days 0, 14 and 21 of the assay.

To directly assess bacterial growth, the fluorescence increase was calculated for all wells by subtracting the fluorescence measured on day 0 from the fluorescence recorded on day 14 (Fig. 6A).

The positivity threshold for growth was set as the mean fluorescence of negative control wells plus three standard deviations. This cutoff reliably distinguished negative controls (no growth) from the positive controls supplemented with CF and OADC, which showed maximal growth. For the second positive control (Sauton + CF only), most wells fell below the growth-positivity cutoff at day 14 (Fig. 6B). Nevertheless, bacterial growth became evident by day 21 therefore confirming that the bacteria can be resuscitated by CF alone (Supplementary data). Collectively, these controls demonstrate the robustness of the screening assay.

Among the 10,240 compounds tested, 32 were excluded on the basis of high intrinsic fluorescence (exceeding 100,000 arbitrary units (a.u.)) on day 0. This resulted in a working set of 9,822 compounds for downstream analysis (Fig. 6A, C). Among these, ~0.5% (53 molecules) met the growth-positivity criterion at day 14 (Fig. 6D), with no additional hit observed at day 21. These 53 compounds were subsequently reassessed under the same assay conditions as the primary screen, confirming growth stimulatory activity of DCTB for 45 compounds (Fig. 5D).

Our DCTB model proved sufficiently robust to be applied in a high-throughput screening format. This approach enabled the identification of compounds capable of inducing *M. tuberculosis* resuscitation, which may serve as a basis for future mechanistic investigations and potential clinical application.

Discussion:

In this study, we developed and characterized an improved model of differentially culturable tubercle bacilli (DCTB) *in vitro* using a lineage 1 strain of *M. tuberculosis* (L1-500960). Compared to H37Rv, L1-500960 exhibited a markedly higher frequency of DCTB

and a stricter dependence on culture filtrate supplementation for resuscitation. By refining culture conditions, particularly through the use of Sauton medium, we minimized spontaneous regrowth while preserving robust responsiveness to CF and OADC. This stringent phenotype enabled us to combine genome-scale genetic interrogation by CRISPR interference (CRISPRi) with high-throughput chemical screening to uncover both bacterial pathways and small molecules capable of triggering DCTB resuscitation.

We established a model that allows the generation of *M. tuberculosis* in a differentially culturable state without the need for exogenous stress. The presence of such a subpopulation in an *in vitro* culture is intriguing. Our data suggest that this population accumulates spontaneously as growth progresses to stationary phase, possibly due to decreased availability of essential nutrients. This is in line with previous reports of re-inoculation of stationary phase bacilli in classical batch cultures (Sun and Zhang, 1999) or at the single cell level where only 14% of bacteria resumed growth while the rest, although viable, did not (Manina et al., 2015). In our model, bacteria are washed extensively to fully eliminate any CF carry-over into the assay. When cultures are subsequently diluted into fresh medium for the assay, replenished nutrients are not sufficient to induce resumption of growth. Additionally, the low bacterial density prevents the accumulation of intercellular communication and effector molecules naturally exported to culture medium.

The observation that DCTB can be obtained by decreasing the bacterial concentration is not entirely new. As early as 1946, Dubos reported that highly diluted cultures of *M. tuberculosis* failed to initiate growth unless supplemented with albumin or Tween 80 (Dubos and Davis, 1946). In our model, bacterial replication occurs when the inoculum density is sufficiently high, suggesting that cells themselves produce the signals required for growth initiation. At lower densities, replication can still be triggered, but only in the presence of exogenous culture filtrate, which likely provides the missing signals. This implies that growth initiation depends on the accumulation of secreted molecules above a threshold concentration, rather than on nutrient supplementation alone.

Consistent with this idea, several exogenous signals, including cAMP, fatty acids, phospholipids, and muropeptides derived from resuscitation-promoting factors (Rpfs), many of which can be found in culture filtrate, have been implicated in promoting the

transition from non-replicating to replicating states, *in vitro*, *in vivo* and in bacilli recovered from patient sputa (Chengalroyen et al., 2016; Mukamolova et al., 2006; Shleeva et al., 2013; Zhang et al., 2001). These studies consistently report a dose–response relationship between the amount of resuscitation factor supplied and the resulting bacterial load (Mukamolova et al., 2002; Shleeva et al., 2013), which could reflect either a larger fraction of cells committing to replication or an increased replication rate. Importantly, these signals also enable the replication of cultures initiated from very low bacterial inocula (Chengalroyen et al., 2016; Sun and Zhang, 1999).

This mechanism is reminiscent of quorum sensing, a process by which bacteria coordinate collective behaviors at the population level through diffusible molecules. Although mechanistic understanding of quorum-sensing like systems in *M. tuberculosis* remains limited, mycobacteria are known to engage in intercellular communication, notably through their ability to secrete RpfA-E and to form biofilms (Boopathi et al., 2022).

Genome-wide CRISPRi screening identified broad vulnerabilities across essential cellular processes, including protein synthesis, oxidative phosphorylation, cell wall biosynthesis, and DNA replication. These results indicate that DCTB are not metabolically inert but instead maintain basal activity across multiple pathways. This is consistent with earlier studies showing that non-replicating *M. tuberculosis* preserves metabolic flexibility and stress-response capacity (Bacon et al., 2014; Betts et al., 2002; Gengenbacher et al., 2010; Manina et al., 2015; Rao et al., 2008; Salina et al., 2014, 2009; Stokas et al., 2020). The fact that classical growth functions including ribosomal proteins, cell wall enzymes and replication machinery, remain essential underscores that DCTB, although unculturable by classical methods (experiments were carried for 28 days), are not strictly dormant. Rather, they may undergo low-level or episodic replication as was measured at the single cell level for re-inoculated stationary phase bacteria (Manina et al., 2015) .

The requirement for *relA* highlights the role of the stringent response in non-replicative persistence, while WhiB family regulators were overexpressed in survival under nutrient starvation (Betts et al., 2002). Similarly, the identification of proteasome-associated genes aligns with earlier observations that the bacterial proteasome contributes to persistence and defense against host-derived reactive nitrogen intermediates (Betts et al., 2002; Salina et al., 2014, 2009). Together, these findings indicate that our DCTB model captures

key aspects of *M. tuberculosis* physiology under both replicative and non-replicative conditions.

Uptake and regulation systems relative to inorganic ions have been found essential for the survival in the DCTB model. Potassium limitation has been demonstrated to trigger a non-replicating phenotype (Salina et al., 2014), while phosphate transport has been directly linked to growth arrest and persistence (Healy et al., 2024). These findings suggest that DCTB rely on fine-tuned ion homeostasis to maintain viability in a non-replicative state, and that perturbation of these pathways may represent a vulnerability.

Another aspect highlighted by our study is the role of albumin in promoting bacterial growth. Historically, albumin was incorporated into *M. tuberculosis* culture media because it facilitated the initiation of planktonic growth from small inocula (Davis and Dubos, 1947). Importantly, over the course of this work we noted striking variability depending on the source and lot of albumins, with some preparations strongly stimulating spontaneous resuscitation while others did not. These observations emphasize that albumin is a complex and poorly defined additive (Francis, 2010): while it promotes outgrowth and alters metabolic dependencies, it also introduces substantial variability. Careful attention to albumin source and composition will therefore be critical for reproducibility in future studies of DCTB physiology and related phenotypes.

This is further emphasized by the apparent essentiality of mycobactin synthesis operon and MmpS5/L5 efflux pump in our CRISPRi screen. In *M. tuberculosis*, MmpL5 and its accessory protein MmpS5 have been linked to mycobactin export (Hartkoorn et al., 2014; Wells et al., 2013). Mycobactin is an iron siderophore whose synthesis is induced when iron can exclusively be acquired in its ionic form, but the intracellular accumulation of the siderophore is cidal (Jones et al., 2014). The absence of alternative iron sources in Sauton medium, like hemin carried along in albumin-containing media (Foreman et al., 2022; Lynn et al., 1979), explains the essentiality of mycobactin synthesis for iron acquisition and its cognate export system under our screening conditions. In contrast, this system is dispensable in rich, albumin-containing medium, with which our data are compared.

Conversely, CRISPRi screening also identified four loci whose repression promoted bacterial resuscitation under DCTB conditions: *phoP*, *phoR*, *ppe51*, and *esxK*. *phoP* and *phoR* encode the PhoP/PhoR two-component regulatory system, a central virulence regulator in *M. tuberculosis*.

The PhoP/PhoR two-component system is a pleiotropic transcriptional regulator controlling a wide range of genes in *M. tuberculosis* (Singh et al., 2023). Its broad regulatory influence makes it challenging to propose a single hypothesis for its contribution to the DCTB phenotype. However, previous work has shown that disruption of this system prevents growth arrest under acidic stress conditions (Baker et al., 2014). This suggests that PhoP/PhoR may participate in regulatory pathways that mediate the transition into or the maintenance of a non-replicating state, possibly in conjunction with other factors.

PPE51 has previously been implicated in the uptake of nutrients such as glycerol and other small molecules across the mycobacterial cell envelope (Babu Sait et al., 2022; Baker and Abramovitch, 2018; Dechow et al., 2022; Korycka-Machała et al., 2020; Wang et al., 2020). Given the abundance of glycerol in standard Sauton medium (~800 mM), reduced expression of *ppe51* may protect bacilli from excessive glycerol uptake and the consequent accumulation of toxic intermediates such as methylglyoxal (Pethe et al., 2010). Importantly, under our experimental conditions the bacteria appear to maintain very slow, possibly episodic growth. In such a regime, toxic metabolites derived from glycerol catabolism would accumulate more rapidly within single cells, since they are not efficiently partitioned and diluted between daughter cells during regular division cycles. Thus, limiting glycerol uptake through repression of *ppe51* may be particularly advantageous for DCTB in standard Sauton medium. Alternatively, PPE51 may import an unidentified growth inhibitory molecule, and knockdown of the porin would prevent access of such a molecule to the cell. However, our data cannot yet discriminate between these two hypotheses.

Selective knockdown of *esxK* promotes DCTB resuscitation in our CRISPRi screen. EsxK, an ESX-5 substrate encoded adjacent to *esxL*, ranks among the most highly expressed genes in patient sputum, where the DCTB phenotype predominates (Bukka et al., 2012) . Simultaneous deletion of *esxKL* was shown to impair bacterial growth both in vitro and in macrophage infection models (THP-1, BMDM), whereas complementation with *esxL* alone restored and even enhanced growth relative to the wild type (Bukka et al., 2012). Importantly, *esxK* and *esxL* are not organized in an operon (Cortes et al., 2013), allowing their respective knockdowns phenotype to be considered independently. EsxK and EsxL assemble as a heterodimer that is subsequently exported via the ESX-5 secretion system

through a unique EsxK-encoded signal sequence (YxxxD/E motif) (Daleke et al., 2012; Pandey et al., 2017). These findings suggest that either the absence of EsxK protein or the intracellular accumulation of unpartnered EsxL may be responsible for preventing growth initiation in our DCTB model. Strikingly, the growth defect associated with *esxKL* deletion could be rescued in trans by co-culture with wild-type H37Rv, indicating that the required factor(s) can be provided exogenously. In our CRISPRi screen, cultures were inoculated at very low density (10^3 bacteria/mL). Under these conditions, signaling molecules produced by individual bacteria are likely to act primarily on themselves (autocrine signal) before it accumulates to levels detectable by neighboring cells. This extreme dilution may therefore have amplified the contribution of cell-autonomous EsxK/L signaling, revealing growth-inhibitory effect that would be masked at higher cell densities where population-wide paracrine signals dominate.

Mechanistically, EsxK carries a secretion signal that facilitates EsxL export (Pandey et al., 2017). One possible hypothesis is that defective secretion leads to intracellular EsxL accumulation generating a signal that mimics high extracellular concentration of this protein and thereby contributes to resuscitation induction. Taken together, these observations raise the possibility that EsxK and EsxL form a regulatory module, whereby the stoichiometric balance between the two proteins governs the transition into or out of the DCTB state.

Using this stringent model, we screened 10,240 small molecules and identified 45 hits that reproducibly stimulated DCTB resuscitation, with growth-inducing activity validated through secondary assays. These compounds complement the genetic data by revealing independent chemical routes to restore growth competence. Because small molecules can perturbate cellular process through mechanisms inaccessible to CRISPRi, such as activation of transcription factors, disruption of protein–protein interactions, or direct perturbation of metabolite flux, they may reveal previously unrecognized resuscitation triggers. Detailed characterization of the identified bioactive hits is currently underway and will be reported in future studies.

Together, these results establish a robust experimental framework for dissecting DCTB resuscitation mechanisms. The genetic screen highlights a regulatory and physiological module centered on PhoP/PhoR, PPE51, and EsxK that integrates nutrient uptake,

envelope transport, and signal secretion. The chemical screen provides the first set of hit-compounds with resuscitation-promoting activity.

From a translational perspective, resuscitation-promoting molecules could have major implications for tuberculosis control strategies. They may enhance the diagnostic recovery of paucibacillary cases, reveal latent bacilli in clinical specimens, and, when used as companion drugs, potentially prevent relapse or dissemination by forcing bacilli to shift back to a replicative and antibiotic-susceptible state. By integrating genetic and chemical approaches within a robust L1 DCTB model, this study paves the way for the development of innovative therapeutic and diagnostic strategies specifically targeting this clinically relevant mycobacterial subpopulation.

Materials and Methods

Bacterial strains and growth conditions:

Experiments were performed with three *Mycobacterium tuberculosis* strains: H37Ra, H37Rv, and L1-500960, a Lineage 1 clinical isolate from the BCCM/ITM collection (Borrell et al., 2019; https://bccm.belspo.be/about-ITM). Each strain was transformed with plasmid pNIP48_gfp to constitutively express green fluorescent protein (GFP) (Christophe et al., 2009).

Throughout this study, two liquid media were employed. The first, designated 7H9-OADC, consisted of standard Middlebrook 7H9 enriched with 0.2% (w/v) glycerol, 0.05% Tween 80 and 10% (v/v) OADC (oleic acid, albumin, dextrose, catalase) supplement (Sigma-Aldrich). For all modified versions of 7H9 broth, the additional components relative to the 7H9 standard base are specified. The second medium, Sauton, contained (per liter): 0.5 g KH_2PO_4, 1.4 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 4 g L-asparagine, 6% (v/v) glycerol, 0.05 g ferric ammonium citrate, 2 g sodium citrate, 0.0001% (w/v) $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ and 0.025% (v/v) tyloxapol, and was adjusted to pH 7.4 with NaOH. Hygromycin was included in all media at 50 $\mu g.mL^{-1}$ to maintain selection for the pNIP48_gfp plasmid.

For protein supplementation experiments, either standard (BSA, Sigma-Aldrich) or fatty-acid-free bovine serum albumin (BSA FA, Sigma-Aldrich) was first dissolved in 8.5 $g.L^{-1}$ NaCl and then incorporated into the culture medium at a final concentration of 5 $g.L^{-1}$,

with or without 0.2% (w/v) glucose. When indicated, Sauton medium was supplemented with 10% (v/v) OADC. All other carbon sources were added to 7H9 base at a final concentration of 50 µM. CF was prepared from an H37Ra or H37Rv culture grown to an optical density at 600 nm (OD_{600}) between 0.6 and 1. The culture was centrifuged at 4 000 × g for 10 min, the CF was sterilized through a 0.22 µm filter, aliquoted and stored at -80°C. Thawed aliquots were re-filtered immediately before use. CF was added in culture at a final concentration of 50%.

For inoculum estimation, an OD_{600} of 1 was considered equivalent to 1×10^8 CFU.mL^{-1}.

All cultures were incubated statically at 37°C in tissue-culture flasks. Growth was monitored by measuring OD_{600}, GFP fluorescence (excitation 488 nm, emission 510 nm) or resazurin reduction. The latter was assessed 24h after adding resazurin 0.005% (w/v) and recording fluorescence at excitation 535 nm and emission 585 nm.

Preparation of Cultures for MPN and Phenotypic Testing

M. tuberculosis was pre-cultured in the test medium to reach exponential growth (OD_{600} between 0.6 and 1). An aliquot was then transferred to a fresh culture (OD_{600} 0.2) and incubated until early-stationary phase (OD_{600} between 1 and 2). The culture was washed three times to remove residual supernatant, and clumps were eliminated by passing the suspension five times through a 0.22 mm syringe. Bacterial concentration was estimated by optical density and OD = 1 was converted as 10^8 CFU.mL^{-1}. The samples were then diluted at the indicated inoculum and transferred into medium with or without growth factors for MPN enumeration or phenotypic testing. Plates or flasks were incubated for 14 or 21 days, and GFP fluorescence was measured.

Most-Probable-Number Analysis of Replicative and Differentially Culturable Mtb

The Most Probable Number (MPN) method (Fig. 2) was applied to liquid cultures of *M. tuberculosis* to distinguish actively replicating bacilli from differentially culturable tubercle bacilli (DCTB). For each experimental condition, cultures were first adjusted to an OD_{600} = 0.10, ensuring that equal cell densities were compared across media formulations. Ten-fold serial dilutions were then prepared in microtiter plates. Replicative bacilli were enumerated in standard 7H9-OADC medium, whereas DCTB were

quantified in parallel plates supplemented with 50% CF, which supplies growth-promoting factors required for resuscitation of non-replicating cells. Bacterial growth was monitored by measuring GFP signal. To define positive wells, GFP fluorescence was assumed to follow a normal distribution. A well was scored "positive" when its fluorescence exceeded the mean of uninoculated medium plus three standard deviations. The pattern of positive wells across dilutions was converted to cell numbers using the Jarvis-Breslow MPN algorithm (Jarvis et al., 2010), yielding separate estimates for replicative and DCTB sub-populations.

Construction of a CRISPRi Library in M. tuberculosis L1-500960

M. tuberculosis L1-500960 CRISPRi libraries were generated using the RLC12 library (Addgene, cat. no. 163954), as described by Bosch et al. (Bosch et al., 2021). Briefly, *Mycobacterium tuberculosis* L1-500960 strain was transformed with RLC12 plasmid pool yielding an average coverage of 130x of RLC12 library. After 14 days incubation, transformation plates were scrapped, pooled, aliquoted and stored at -80°C. Three aliquots of the *M. tuberculosis* L1-500960 CRISPRi library were washed and grown in Sauton medium at 37°C independently. 25 $\mu g.mL^{-1}$ Kanamycin was kept throughout the experiment. Cultures were then washed three times with fresh Sauton medium and each replicate was inoculated into two sets of 2 liters of Sauton medium at a density of 10^3 $CFU.mL^{-1}$, inducing DCTB phenotype. The large culture volume ensured at least 20-fold coverage of the RLC12 sgRNA library. One set of culture was induced with 100 $ng.mL^{-1}$ of anhydrotetracycline (ATc) which was replenished weekly while the other was left uninduced. After three weeks of library activation, ATc was no longer replenished and OADC was added to induce bacterial outgrowth. When cultures reached mid exponential phase (OD 0.4-0.6), 50 ml of cultures were spined down and genomic DNA was extracted with the CTAB method (Larsen et al., 2007). Bacterial pellets were resuspended in 800 µl of Tris-EDTA buffer and incubated at 37°C with 1 $mg.mL^{-1}$ lysozyme for 16 h. Subsequently, 70 µl of 10% SDS and 5 µl of Proteinase K (20 $mg.mL^{-1}$; Dutscher, 820177) were added, and samples were incubated for 30 min at 65°C. Following this, 200 µl of 2.5 M NaCl and 80 µl of 10% (w/v) cetrimonium bromide were added, and the mixture was incubated for another 30 min at 65°C. To each sample, 750 µl of ice-cold chloroform were added, followed by centrifugation for 5 min at 16,000 g. The aqueous phase was recovered

and treated with 25 µg RNase A (Invitrogen, 12091021) for 30 min at 37°C. Nucleic acids were then extracted by addition of one volume of phenol:chloroform:isoamyl alcohol (25:24:1), mixed thoroughly, incubated for 10 min at room temperature, and centrifuged for 5 min at 14,000 g. The aqueous phase was recovered and further purified by extraction with one volume of ice-cold chloroform, mixed, incubated for 10 min at room temperature, and centrifuged for 5 min at 14,000 g. DNA was precipitated by adding 0.6 volumes of isopropanol and 0.02 volumes of 3 M sodium acetate, followed by overnight incubation at −20°C. Samples were centrifuged for 30 min at 16,000 g and 4°C, washed once with 80% ethanol, and air-dried. Genomic DNA pellets were resuspended in nuclease-free water and quantified using a Qubit fluorometer.

Library preparation was performed as described in Bosch et al. (Bosch et al., 2021). Briefly, 500 ng of genomic DNA was used as template for PCR amplification of sgRNA cassettes with primers annealing to the flanking constant regions. PCR was carried out in 50 µl reactions with Q5 PCR Master Mix (Roche KK4600) using the following cycling conditions: initial denaturation at 98°C for 45 s; 20 cycles of 98°C for 10 s, 64°C for 30 s, and 65°C for 20 s; and a final extension at 65°C for 5 min. Amplicons were purified using SizeSelect beads (Macherey-Nagel, 744970) with double sided selection (0.6:1 followed by 1:1 ratios) and eluted in nuclease free water. Purified librairies were assessed by agarose gel electrophoresis for quality and quantified with the KAPA Library Quantification Kit (Roche, KR0405). Libraries were sequenced on an Illumina Novaseq platform (PE150) at 600× depth.

RT-qPCR Validation of CRISPRi Induction in DCTB- M. tuberculosis L1-500960

To confirm sgRNA induction in non-replicating bacilli prior to performing the CRISPRi screen, a pilot experiment was conducted. After 14 days of ATc induction under DCTB model conditions in Sauton medium, starting from an initial density of 10^3 CFU.mL^{-1}, *M. tuberculosis* L1-500960 CRISPRi cultures (500 mL) were harvested by centrifugation (3,000 × g, 15 min, 4°C). In parallel, RNA was extracted from exponential-phase cultures of the same CRISPRi library, both ATc-induced and non-induced, which served as controls. Total RNA was isolated using a standard phenol–chloroform extraction protocol, followed by ethanol precipitation and DNase I treatment to eliminate contaminating genomic DNA.

Because both *dcas9* and the sgRNA are co-transcribed from the same ATc-inducible promoter, reverse transcription quantitative PCR (RT-qPCR) targeting the *dcas9* transcript was used as a proxy for sgRNA induction under non-replicating conditions. cDNA synthesis was carried out using the cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific, Cat. No. AB1453A), following the manufacturer's instructions. RT-qPCR was performed in triplicate using the SYBR Green I Master mix (Roche, Cat. No. 04887352001) on a LightCycler® 480 System (Roche). Primer sequences were as follows: forward 5′-GTCGAACGAGGAGCTGTTCA-3′ and reverse 5′-GTCTCCAGCTGCTTCGAGTT-3′. Relative expression levels were calculated using the ΔΔCt method, normalized to *sigA* as a housekeeping gene.

Quantification and Analysis of CRISPRi Data

sgRNA sequences were extracted from single-end reads with Cutadapt (Martin, 2011) using the flanking sequences[GTGATAGATATAATCTGGGA...GTTTTTGTAGCTCGAAAGAAG]. After trimming, sequences shorter than 4 nucleotides were discarded. The extracted sgRNAs were then mapped and quantified with the MAGeCK *count* function (Li et al., 2014). Gene- and sgRNA-level enrichment or depletion was assessed by Robust Rank Aggregation with the MAGeCK *test* function, applying the alphamedian L2FC method and using the Negative (control) sgRNA set for normalization (Li et al., 2022). sgRNA targeting sequences affected by a SNP in L1-500960 were excluded from the analysis (supplementary table).

PCA was performed in R (version 4.3.1; R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria) using *prcomp* (package stats) on the transposed sample-by-feature matrix. Before PCA, sgRNAs with zero variance across samples were removed; rows with >50% missing values were discarded; remaining missing values were imputed by the column median. Data were centered and scaled prior to decomposition. Scores were visualized with *ggplot2* and *ggrepel*. The percentage of variance explained by PC1 and PC2 is reported in the axis labels.

Pathway enrichment analysis was also performed in R using the *clusterProfiler* (Wu et al., 2021; Yu et al., 2012), *KEGGREST* (Tenenbaum et al., 2023), and *pathview* (Luo and Brouwer, 2013) packages. Genes with $\log_2$ fold change < 1 and FDR <0.01 were selected for the analysis. KEGG pathway enrichment was performed with *enrichKEGG* for

Mycobacterium tuberculosis (organism code "mtu"). Enriched pathways with adjusted $p<0.05$ (FDR correction) were considered significant. Visualization of enriched pathways was generated using *pathview*.

High-throughput screening:

M. tuberculosis L1-500960 was pre-cultured in Sauton medium until mid-log phase (OD_{600} between 0.6 and 1). An aliquot of this culture was then transferred to a fresh Sauton medium and incubated statically at 37°C until stationary phase (OD_{600} between 1 and 2). Following incubation, the culture was washed three times with fresh medium to remove residual metabolites. Bacterial clumps were disrupted by passing the suspension five times through a 0.22 mm syringe filter. The resulting bacterial suspension was diluted to 10^3 CFU.mL^{-1} in Sauton medium and used for microwell plate inoculation.

Three groups of 384-well plates (Greiner 81091) were prepared as follows:

1) Test plates: A total of 10,240 unique compounds of the *Lille Chemical Library (U1177-Ariadne*) were dispensed at a final concentration of 50 µM using an Echo 550 acoustic liquid handler (Labcyte). Plates were stored at -20°C and thawed at room temperature shortly before inoculation.

2) Positive control plates: Wells were supplemented with DMSO at a final concentration of 0.5%. *M. tuberculosis* Sauton cultures were complemented with 50% CF and OADC to assess the fastest possible culture resuscitation.

3) Negative control plates: Wells were supplemented only with DMSO at a final concentration of 0.5%.

Plates of the three groups were sealed with aluminum film (Corning™ 6570) and incubated at 37°C. GFP fluorescence was measured on Ensight multimodal plate reader (Perkin Elmer) (excitation 488 nm, emission 510 nm) prior to incubation (day 0) and after 14 and 21 days of incubation.

Analysis of high-throughput screening data:

Wells with raw fluorescence >10,000 were excluded prior to analysis and values ≤0 removed before log-transformation. For visualization, kernel density estimates of the

log10-transformed values were plotted for the test plates, positive control plates and negative control plate groups (R packages *ggplot2* and *dplyr*). Analyses were conducted under the assumption of normal distribution. For control plates, the outlier threshold was defined as $\mu + 3\sigma$ (mean + three standard deviations) of the log10-transformed fluorescence values across all negative control wells. For compounds plates, the threshold was defined analogously using all compound wells, in order to account for variability potentially introduced by compound effects.

Statistical analysis:

All statistical analyses were performed using GraphPad Prism version 10.4.2 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Data are presented as mean ± SD. Group comparisons were carried out using two-way ANOVA, followed by Sidak's multiple comparisons test when appropriate. Analyses were conducted under the assumption of normal distribution and homogeneity of variances. A p-value <0.05 was considered statistically significant.

Acknowledgments:

We would like to thank Z. Edoo for helpful suggestions and reviewing a draft version of the manuscript.

This work was supported by the French Agence Nationale de la Recherche (ANR) Programme d'Investissement d'Avenir (Mustart ANR-20-PAMR-0005).

References:

Albrethsen, J., Agner, J., Piersma, S.R., Højrup, P., Pham, T.V., Weldingh, K., Jimenez, C.R., Andersen, P., Rosenkrands, I., 2013. Proteomic profiling of Mycobacterium tuberculosis identifies nutrient-starvation-responsive toxin-antitoxin systems. Mol Cell Proteomics 12, 1180–1191. https://doi.org/10.1074/mcp.M112.018846

Babu Sait, M.R., Koliwer-Brandl, H., Stewart, J.A., Swarts, B.M., Jacobsen, M., Ioerger, T.R., Kalscheuer, R., 2022. PPE51 mediates uptake of trehalose across the mycomembrane

of Mycobacterium tuberculosis. Sci Rep 12, 2097. https://doi.org/10.1038/s41598-022-06109-7

Bacon, J., Alderwick, L.J., Allnutt, J.A., Gabasova, E., Watson, R., Hatch, K.A., Clark, S.O., Jeeves, R.E., Marriott, A., Rayner, E., Tolley, H., Pearson, G., Hall, G., Besra, G.S., Wernisch, L., Williams, A., Marsh, P.D., 2014. Non-Replicating Mycobacterium tuberculosis Elicits a Reduced Infectivity Profile with Corresponding Modifications to the Cell Wall and Extracellular Matrix. PLOS ONE 9, e87329. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087329

Baek, S.-H., Li, A.H., Sassetti, C.M., 2011. Metabolic regulation of mycobacterial growth and antibiotic sensitivity. PLoS Biol 9, e1001065. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001065

Baker, J.J., Abramovitch, R.B., 2018. Genetic and metabolic regulation of Mycobacterium tuberculosis acid growth arrest. Sci Rep 8, 4168. https://doi.org/10.1038/s41598-018-22343-4

Baker, J.J., Johnson, B.K., Abramovitch, R.B., 2014. Slow growth of Mycobacterium tuberculosis at acidic pH is regulated by phoPR and host-associated carbon sources. Mol Microbiol 94, 56–69. https://doi.org/10.1111/mmi.12688

Balaban, N.Q., Merrin, J., Chait, R., Kowalik, L., Leibler, S., 2004. Bacterial persistence as a phenotypic switch. Science 305, 1622–1625. https://doi.org/10.1126/science.1099390

Beltran, C.G.G., Heunis, T., Gallant, J., Venter, R., du Plessis, N., Loxton, A.G., Trost, M., Winter, J., Malherbe, S.T., Kana, B.D., Walzl, G., 2020. Investigating Non-sterilizing Cure in TB Patients at the End of Successful Anti-TB Therapy. Front. Cell. Infect. Microbiol. 10. https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00443

Betts, J.C., Lukey, P.T., Robb, L.C., McAdam, R.A., Duncan, K., 2002. Evaluation of a nutrient starvation model of Mycobacterium tuberculosis persistence by gene and protein expression profiling. Molecular Microbiology 43, 717–731. https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.02779.x

Boopathi, S., Ramasamy, S., Haridevamuthu, B., Murugan, R., Veerabadhran, M., Jia, A.-Q., Arockiaraj, J., 2022. Intercellular communication and social behaviors in mycobacteria. Front Microbiol 13, 943278. https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.943278

Borrell, S., Trauner, A., Brites, D., Rigouts, L., Loiseau, C., Coscolla, M., Niemann, S., De Jong, B., Yeboah-Manu, D., Kato-Maeda, M., Feldmann, J., Reinhard, M., Beisel, C., Gagneux, S., 2019. Reference set of Mycobacterium tuberculosis clinical strains: A tool for

research and product development. PLoS One 14, e0214088. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0214088

Bosch, B., DeJesus, M.A., Poulton, N.C., Zhang, W., Engelhart, C.A., Zaveri, A., Lavalette, S., Ruecker, N., Trujillo, C., Wallach, J.B., Li, S., Ehrt, S., Chait, B.T., Schnappinger, D., Rock, J.M., 2021. Genome-wide gene expression tuning reveals diverse vulnerabilities of M. tuberculosis. Cell 184, 4579-4592.e24. https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.06.033

Bukka, A., Price, C.T.D., Kernodle, D.S., Graham, J.E., 2012. Mycobacterium tuberculosis RNA Expression Patterns in Sputum Bacteria Indicate Secreted Esx Factors Contributing to Growth are Highly Expressed in Active Disease. Front Microbiol 2, 266. https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00266

Chengalroyen, M.D., Beukes, G.M., Gordhan, B.G., Streicher, E.M., Churchyard, G., Hafner, R., Warren, R., Otwombe, K., Martinson, N., Kana, B.D., 2016. Detection and Quantification of Differentially Culturable Tubercle Bacteria in Sputum from Patients with Tuberculosis. Am J Respir Crit Care Med 194, 1532–1540. https://doi.org/10.1164/rccm.201604-0769OC

Chengalroyen, M.D., Beukes, G.M., Otwombe, K., Gordhan, B.G., Martinson, N., Kana, B., 2022. The detection of mixed tuberculosis infections using culture filtrate and resuscitation promoting factor deficient filtrate. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology 12.

Christophe, T., Jackson, M., Jeon, H.K., Fenistein, D., Contreras-Dominguez, M., Kim, J., Genovesio, A., Carralot, J.-P., Ewann, F., Kim, E.H., Lee, S.Y., Kang, S., Seo, M.J., Park, E.J., Skovierová, H., Pham, H., Riccardi, G., Nam, J.Y., Marsollier, L., Kempf, M., Joly-Guillou, M.-L., Oh, T., Shin, W.K., No, Z., Nehrbass, U., Brosch, R., Cole, S.T., Brodin, P., 2009. High content screening identifies decaprenyl-phosphoribose 2' epimerase as a target for intracellular antimycobacterial inhibitors. PLoS Pathog 5, e1000645. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000645

Colangeli, R., Jedrey, H., Kim, S., Connell, R., Ma, S., Venkata, U.D.C., Chakravorty, S., Gupta, A., Sizemore, E.E., Diem, L., Sherman, D.R., Okwera, A., Dietze, R., Boom, W.H., Johnson, J.L., Kenzie, W.R.M., Alland, D., 2018. Bacterial Factors That Predict Relapse after Tuberculosis Therapy. New England Journal of Medicine 379, 823–833. https://doi.org/10.1056/NEJMoa1715849

Cortes, T., Schubert, O.T., Rose, G., Arnvig, K.B., Comas, I., Aebersold, R., Young, D.B., 2013. Genome-wide mapping of transcriptional start sites defines an extensive leaderless transcriptome in Mycobacterium tuberculosis. Cell Rep 5, 1121–1131. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.10.031

Daleke, M.H., Ummels, R., Bawono, P., Heringa, J., Vandenbroucke-Grauls, C.M.J.E., Luirink, J., Bitter, W., 2012. General secretion signal for the mycobacterial type VII secretion pathway. Proceedings of the National Academy of Sciences 109, 11342–11347. https://doi.org/10.1073/pnas.1119453109

Davis, B.D., Dubos, R.J., 1947. THE BINDING OF FATTY ACIDS BY SERUM ALBUMIN, A PROTECTIVE GROWTH FACTOR IN BACTERIOLOGICAL MEDIA. J Exp Med 86, 215–228. https://doi.org/10.1084/jem.86.3.215

Dechow, S.J., Baker, J.J., Murto, M., Abramovitch, R.B., 2022. ppe51 Variants Enable Growth of Mycobacterium tuberculosis at Acidic pH by Selectively Promoting Glycerol Uptake. J Bacteriol 204, e0021222. https://doi.org/10.1128/jb.00212-22

Dubos, R.J., Davis, B.D., 1946. FACTORS AFFECTING THE GROWTH OF TUBERCLE BACILLI IN LIQUID MEDIA. J Exp Med 83, 409–423.

Dusthackeer, A., Balasubramanian, M., Shanmugam, G., Priya, S., Nirmal, C.R., Sam Ebenezer, R., Balasubramanian, A., Mondal, R.K., Thiruvenkadam, K., Hemanth Kumar, A.K., Ramachandran, G., Subbian, S., 2019. Differential Culturability of Mycobacterium tuberculosis in Culture-Negative Sputum of Patients With Pulmonary Tuberculosis and in a Simulated Model of Dormancy. Frontiers in Microbiology 10.

Foreman, M., Kolodkin-Gal, I., Barkan, D., 2022. A Pivotal Role for Mycobactin/mbtE in Growth and Adaptation of Mycobacterium abscessus. Microbiology Spectrum 10, e02623-22. https://doi.org/10.1128/spectrum.02623-22

Francis, G.L., 2010. Albumin and mammalian cell culture: implications for biotechnology applications. Cytotechnology 62, 1–16. https://doi.org/10.1007/s10616-010-9263-3

Gengenbacher, M., Rao, S.P.S., Pethe, K., Dick, T., 2010. Nutrient-starved, non-replicating Mycobacterium tuberculosis requires respiration, ATP synthase and isocitrate lyase for maintenance of ATP homeostasis and viability. Microbiology 156, 81–87. https://doi.org/10.1099/mic.0.033084-0

Gordhan, B.G., Padarath, K., Sewcharran, A., McIvor, A., VanNieuwenhze, M.S., Waja, Z., Martinson, N., Kana, B.D., 2024. Clinical Strains of Mycobacterium tuberculosis Representing Different Genotype Families Exhibit Distinct Propensities to Adopt the Differentially Culturable State. Pathogens 13, 318. https://doi.org/10.3390/pathogens13040318

Gordhan, B.G., Sewcharran, A., Letsoalo, M., Chinappa, T., Yende-Zuma, N., Padayatchi, N., Naidoo, K., Kana, B.D., 2022. Detection of differentially culturable tubercle bacteria

in sputum from drug-resistant tuberculosis patients. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology 12.

Hartkoorn, R.C., Uplekar, S., Cole, S.T., 2014. Cross-resistance between clofazimine and bedaquiline through upregulation of MmpL5 in Mycobacterium tuberculosis. Antimicrob Agents Chemother 58, 2979–2981. https://doi.org/10.1128/AAC.00037-14

Healy, C., Ehrt, S., Gouzy, A., 2024. An exacerbated phosphate starvation response triggers Mycobacterium tuberculosis glycerol utilization at acidic pH. mBio 16, e02825-24. https://doi.org/10.1128/mbio.02825-24

Hu, Y., Liu, A., Ortega-Muro, F., Alameda-Martin, L., Mitchison, D., Coates, A., 2015. High-dose rifampicin kills persisters, shortens treatment duration, and reduces relapse rate in vitro and in vivo. Front Microbiol 6, 641. https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00641

Hu, Y., Pertinez, H., Liu, Y., Davies, G., Coates, A., 2019. Bedaquiline kills persistent Mycobacterium tuberculosis with no disease relapse: an in vivo model of a potential cure. J Antimicrob Chemother 74, 1627–1633. https://doi.org/10.1093/jac/dkz052

Jarvis, B., Wilrich, C., Wilrich, P.-T., 2010. Reconsideration of the derivation of Most Probable Numbers, their standard deviations, confidence bounds and rarity values. J Appl Microbiol 109, 1660–1667. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2010.04792.x

Jones, C.M., Wells, R.M., Madduri, A.V.R., Renfrow, M.B., Ratledge, C., Moody, D.B., Niederweis, M., 2014. Self-poisoning of Mycobacterium tuberculosis by interrupting siderophore recycling. Proceedings of the National Academy of Sciences 111, 1945–1950. https://doi.org/10.1073/pnas.1311402111

Korycka-Machała, M., Pawełczyk, J., Borówka, P., Dziadek, B., Brzostek, A., Kawka, M., Bekier, A., Rykowski, S., Olejniczak, A.B., Strapagiel, D., Witczak, Z., Dziadek, J., 2020. PPE51 Is Involved in the Uptake of Disaccharides by Mycobacterium tuberculosis. Cells 9, 603. https://doi.org/10.3390/cells9030603

Larsen, M.H., Biermann, K., Tandberg, S., Hsu, T., Jacobs, W.R., 2007. Genetic Manipulation of Mycobacterium tuberculosis. Curr Protoc Microbiol Chapter 10, Unit 10A.2. https://doi.org/10.1002/9780471729259.mc10a02s6

Li, S., Poulton, N.C., Chang, J.S., Azadian, Z.A., DeJesus, M.A., Ruecker, N., Zimmerman, M.D., Eckartt, K.A., Bosch, B., Engelhart, C.A., Sullivan, D.F., Gengenbacher, M., Dartois, V.A., Schnappinger, D., Rock, J.M., 2022. CRISPRi chemical genetics and comparative genomics identify genes mediating drug potency in Mycobacterium tuberculosis. Nat Microbiol 7, 766–779. https://doi.org/10.1038/s41564-022-01130-y

Li, W., Xu, H., Xiao, T., Cong, L., Love, M.I., Zhang, F., Irizarry, R.A., Liu, J.S., Brown, M., Liu, X.S., 2014. MAGeCK enables robust identification of essential genes from genome-scale CRISPR/Cas9 knockout screens. Genome Biol 15, 554. https://doi.org/10.1186/s13059-014-0554-4

Luo, W., Brouwer, C., 2013. Pathview: an R/Bioconductor package for pathway-based data integration and visualization. Bioinformatics 29, 1830–1831. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt285

Lynn, M., Wilson, A.R., Solotorovsky, M., 1979. Role of bovine serum albumin in the nutrition of Mycobacterium tuberculosis. Appl Environ Microbiol 38, 806–810.

Mandal, S., Njikan, S., Kumar, A., Early, J.V., Parish, T., 2019. The relevance of persisters in tuberculosis drug discovery. Microbiology (Reading) 165, 492–499. https://doi.org/10.1099/mic.0.000760

Manina, G., Dhar, N., McKinney, J.D., 2015. Stress and host immunity amplify Mycobacterium tuberculosis phenotypic heterogeneity and induce nongrowing metabolically active forms. Cell Host Microbe 17, 32–46. https://doi.org/10.1016/j.chom.2014.11.016

Martin, M., 2011. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. EMBnet.journal 17, 10–12. https://doi.org/10.14806/ej.17.1.200

Mukamolova, G.V., Murzin, A.G., Salina, E.G., Demina, G.R., Kell, D.B., Kaprelyants, A.S., Young, M., 2006. Muralytic activity of Micrococcus luteus Rpf and its relationship to physiological activity in promoting bacterial growth and resuscitation. Mol Microbiol 59, 84–98. https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04930.x

Mukamolova, G.V., Turapov, O., Malkin, J., Woltmann, G., Barer, M.R., 2010. Resuscitation-promoting factors reveal an occult population of tubercle Bacilli in Sputum. Am J Respir Crit Care Med 181, 174–180. https://doi.org/10.1164/rccm.200905-0661OC

Mukamolova, G.V., Turapov, O.A., Young, D.I., Kaprelyants, A.S., Kell, D.B., Young, M., 2002. A family of autocrine growth factors in Mycobacterium tuberculosis. Mol Microbiol 46, 623–635. https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.03184.x

Pandey, H., Tripathi, S., Srivastava, K., Tripathi, D.K., Srivastava, M., Kant, S., Srivastava, K.K., Arora, A., 2017. Characterization of culture filtrate proteins Rv1197 and Rv1198 of ESAT-6 family from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects 1861, 396–408. https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2016.10.013

Peters, J.S., McIvor, A., Papadopoulos, A.O., Masangana, T., Gordhan, B.G., Waja, Z., Otwombe, K., Letutu, M., Kamariza, M., Sterling, T.R., Bertozzi, C.R., Martinson, N.A.,

Kana, B.D., 2023. Differentially culturable tubercle bacteria as a measure of tuberculosis treatment response. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology 12.

Pethe, K., Sequeira, P.C., Agarwalla, S., Rhee, K., Kuhen, K., Phong, W.Y., Patel, V., Beer, D., Walker, J.R., Duraiswamy, J., Jiricek, J., Keller, T.H., Chatterjee, A., Tan, M.P., Ujjini, M., Rao, S.P.S., Camacho, L., Bifani, P., Mak, P.A., Ma, I., Barnes, S.W., Chen, Z., Plouffe, D., Thayalan, P., Ng, S.H., Au, M., Lee, B.H., Tan, B.H., Ravindran, S., Nanjundappa, M., Lin, X., Goh, A., Lakshminarayana, S.B., Shoen, C., Cynamon, M., Kreiswirth, B., Dartois, V., Peters, E.C., Glynne, R., Brenner, S., Dick, T., 2010. A chemical genetic screen in Mycobacterium tuberculosis identifies carbon-source-dependent growth inhibitors devoid of in vivo efficacy. Nat Commun 1, 57. https://doi.org/10.1038/ncomms1060

Rao, S.P.S., Alonso, S., Rand, L., Dick, T., Pethe, K., 2008. The protonmotive force is required for maintaining ATP homeostasis and viability of hypoxic, nonreplicating Mycobacterium tuberculosis. Proceedings of the National Academy of Sciences 105, 11945–11950. https://doi.org/10.1073/pnas.0711697105

Saito, K., Warrier, T., Somersan-Karakaya, S., Kaminski, L., Mi, J., Jiang, X., Park, S., Shigyo, K., Gold, B., Roberts, J., Weber, E., Jacobs, W.R., Nathan, C.F., 2017. Rifamycin action on RNA polymerase in antibiotic-tolerant Mycobacterium tuberculosis results in differentially detectable populations. Proceedings of the National Academy of Sciences 114, E4832–E4840. https://doi.org/10.1073/pnas.1705385114

Salina, E.G., Grigorov, A.S., Bychenko, O.S., Skvortsova, Y.V., Mamedov, I.Z., Azhikina, T.L., Kaprelyants, A.S., 2019. Resuscitation of Dormant "Non-culturable" Mycobacterium tuberculosis Is Characterized by Immediate Transcriptional Burst. Front. Cell. Infect. Microbiol. 9. https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00272

Salina, E.G., Makarov, V., 2022. Mycobacterium tuberculosis Dormancy: How to Fight a Hidden Danger. Microorganisms 10, 2334. https://doi.org/10.3390/microorganisms10122334

Salina, E.G., Mollenkopf, H.J., Kaufmann, S.H.E., Kaprelyants, A.S., 2009. M. tuberculosis Gene Expression during Transition to the "Non-Culturable" State. Acta Naturae 1, 73–77.

Salina, E.G., Waddell, S.J., Hoffmann, N., Rosenkrands, I., Butcher, P.D., Kaprelyants, A.S., 2014. Potassium availability triggers Mycobacterium tuberculosis transition to, and resuscitation from, non-culturable (dormant) states. Open Biol 4, 140106. https://doi.org/10.1098/rsob.140106

Shleeva, M., Goncharenko, A., Kudykina, Y., Young, D., Young, M., Kaprelyants, A., 2013. Cyclic Amp-Dependent Resuscitation of Dormant Mycobacteria by Exogenous Free Fatty Acids. PLoS One 8, e82914. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0082914

Singh, P.R., Goar, H., Paul, P., Mehta, K., Bamniya, B., Vijjamarri, A.K., Bansal, R., Khan, H., Karthikeyan, S., Sarkar, D., 2023. Dual functioning by the PhoR sensor is a key determinant to Mycobacterium tuberculosis virulence. PLoS Genet 19, e1011070. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1011070

Stokas, H., Rhodes, H.L., Purdy, G.E., 2020. Modulation of the M. tuberculosis cell envelope between replicating and non-replicating persistent bacteria. Tuberculosis 125, 102007. https://doi.org/10.1016/j.tube.2020.102007

Sun, Z., Zhang, Y., 1999. Spent Culture Supernatant of Mycobacterium tuberculosis H37Ra Improves Viability of Aged Cultures of This Strain and Allows Small Inocula To Initiate Growth. J Bacteriol 181, 7626–7628.

Tenenbaum, D., Bioconductor Package Maintainer, Morgan, M., Nishida, K., Ramos, M., Riemer, K., Shepherd, L., Volkening, J., 2023. KEGGREST: Client-side REST access to the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG). Bioconductor package.

Trutneva, K.A., Shleeva, M.O., Demina, G.R., Vostroknutova, G.N., Kaprelyans, A.S., 2020. One-Year Old Dormant, "Non-culturable" Mycobacterium tuberculosis Preserves Significantly Diverse Protein Profile. Front Cell Infect Microbiol 10, 26. https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00026

Turapov, O., O'Connor, B.D., Sarybaeva, A.A., Williams, C., Patel, H., Kadyrov, A.S., Sarybaev, A.S., Woltmann, G., Barer, M.R., Mukamolova, G.V., 2016. Phenotypically Adapted Mycobacterium tuberculosis Populations from Sputum Are Tolerant to First-Line Drugs. Antimicrob Agents Chemother 60, 2476–2483. https://doi.org/10.1128/AAC.01380-15

Vega, V., Rodríguez, S., Van der Stuyft, P., Seas, C., Otero, L., 2021. Recurrent tuberculosis: a systematic review and meta-analysis of the incidence rates and the proportions of relapse and reinfection. Thorax 76, 494–502. https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2020-215449

Wang, Q., Boshoff, H.I.M., Harrison, J.R., Ray, P.C., Green, S.R., Wyatt, P.G., Barry, C.E., 2020. PE/PPE proteins mediate nutrient transport across the outer membrane of Mycobacterium tuberculosis. Science 367, 1147–1151. https://doi.org/10.1126/science.aav5912

Wells, R.M., Jones, C.M., Xi, Z., Speer, A., Danilchanka, O., Doornbos, K.S., Sun, P., Wu, F., Tian, C., Niederweis, M., 2013. Discovery of a siderophore export system essential for virulence of Mycobacterium tuberculosis. PLoS Pathog 9, e1003120. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003120

WHO, 2024. Global Tuberculosis Report 2024.

Wu, T., Hu, E., Xu, S., Chen, M., Guo, P., Dai, Z., Feng, T., Zhou, L., Tang, W., Zhan, L., Fu, X., Liu, S., Bo, X., Yu, G., 2021. clusterProfiler 4.0: A universal enrichment tool for interpreting omics data. The Innovation 2, 100141. https://doi.org/10.1016/j.xinn.2021.100141

Yu, G., Wang, L.-G., Han, Y., He, Q.-Y., 2012. clusterProfiler: an R Package for Comparing Biological Themes Among Gene Clusters. OMICS 16, 284–287. https://doi.org/10.1089/omi.2011.0118

Zainabadi, K., Walsh, K.F., Vilbrun, S.C., Mathurin, L.D., Lee, M.H., Saito, K., Mishra, S., Ocheretina, O., Pape, J.W., Nathan, C., Fitzgerald, D.W., 2021. Characterization of Differentially Detectable Mycobacterium tuberculosis in the Sputum of Subjects with Drug-Sensitive or Drug-Resistant Tuberculosis before and after Two Months of Therapy. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 65, 10.1128/aac.00608-21. https://doi.org/10.1128/aac.00608-21

Zhang, Y., 2004. Persistent and dormant tubercle bacilli and latent tuberculosis. Front Biosci 9, 1136–1156. https://doi.org/10.2741/1291

Zhang, Y., Shi, W., Zhang, W., Mitchison, D., 2013. Mechanisms of Pyrazinamide Action and Resistance. Microbiol Spectr 2, 1–12. https://doi.org/10.1128/microbiolspec.MGM2-0023-2013

Zhang, Y., Yang, Y., Woods, A., Cotter, R.J., Sun, Z., 2001. Resuscitation of dormant Mycobacterium tuberculosis by phospholipids or specific peptides. Biochem Biophys Res Commun 284, 542–547. https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.4993

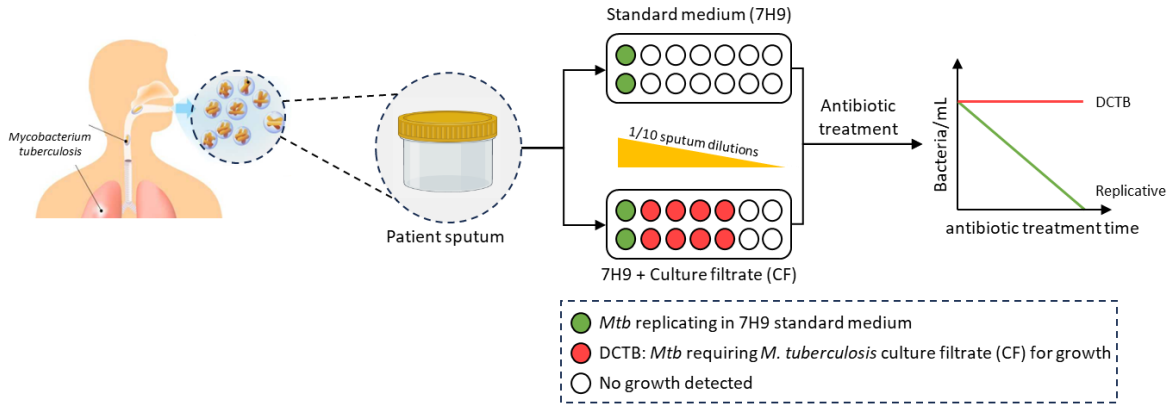


Figure 1: Schematic representation of the different *M. tuberculosis* populations found in patient sputum and their antibiotic susceptibility profiles.

In this procedure, patient sputum samples were serially diluted and spread on standard medium (7H9-OADC) with or without 50% (v/v) culture filtrate (CF) from logarithmic-phase *M. tuberculosis* H37Rv Actively replicating bacteria (green) are those that grew in standard medium, whereas differentially culturable bacilli (DCTB, red) grew only in CF-supplemented medium. *In vitro* antibiotic susceptibility testing revealed that replicating populations remained drug-sensitive, while DCTB displayed phenotypic tolerance to standard anti-tubercular agents. Schematic adapted from Chengalroyen et al (Chengalroyen et al., 2016)

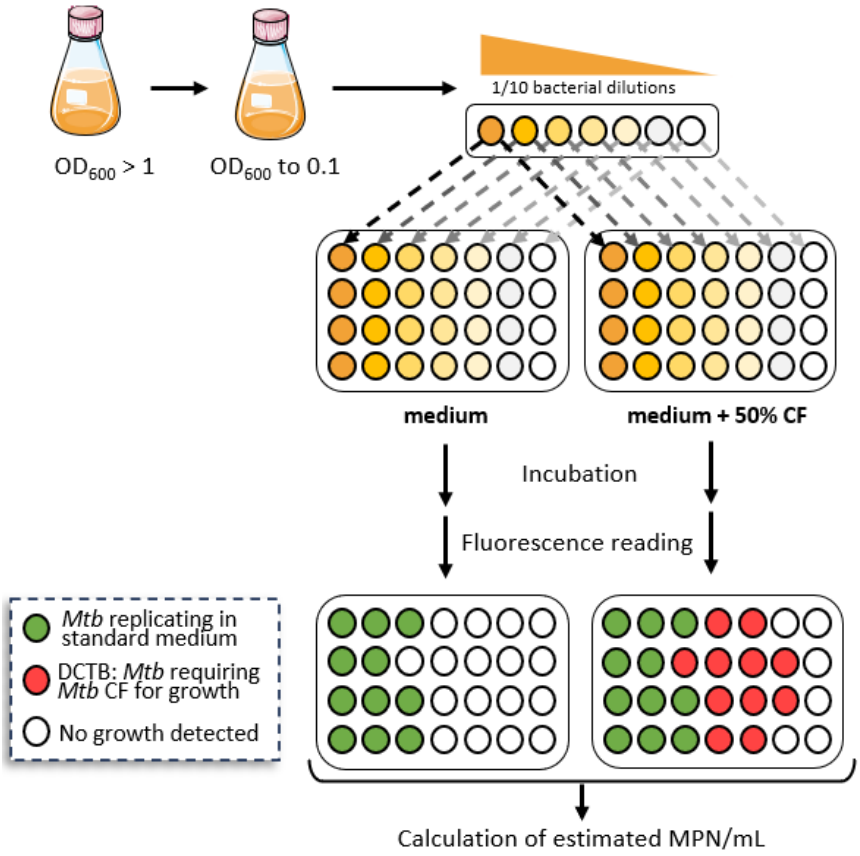


Figure 2: Method for assessing culturability and estimating the proportion of replicating and DCTB subpopulations in a *M. tuberculosis* culture.

A *M. tuberculosis*-GFP culture was adjusted to an optical density of 0.1 to enable comparison across experiments. The sample was serially diluted in standard medium (7H9-OADC) alone or supplemented with 50% culture filtrate (CF) from *M. tuberculosis*, with 4–6 technical replicates per condition. Plates were incubated for 14–35 days depending on the experiment, and bacterial growth was then measured by fluorescence. Replicating bacteria (green) grew in standard medium alone, while differentially culturable bacteria (DCTB, red) revealed growth only in the presence of CF. Wells without detectable growth are shown in white. The number of positive wells in each condition was used to estimate the MPN.mL^{-1} for each bacterial subpopulation.

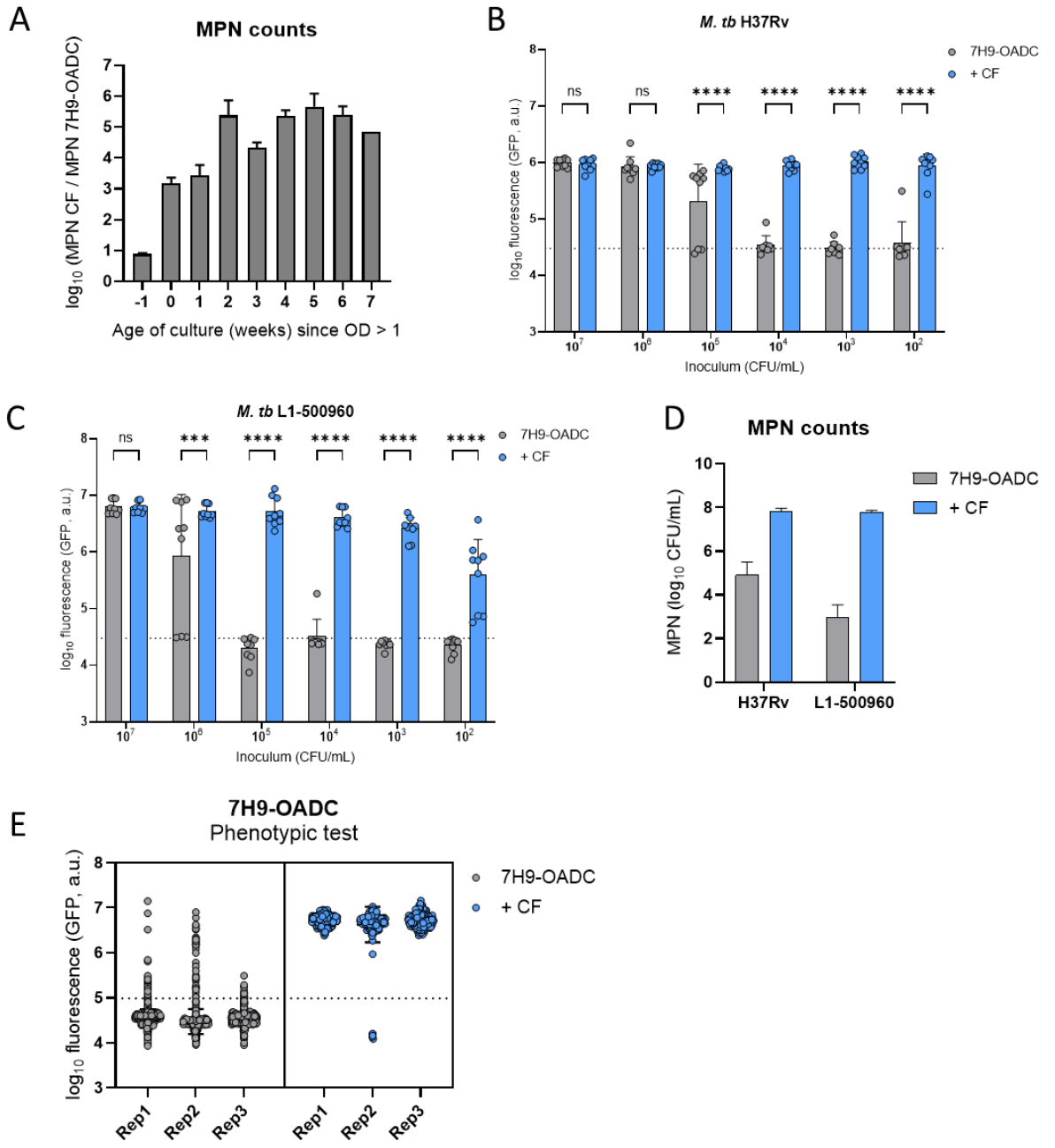


Figure 3: Growth of replicating bacilli and DCTB from different aged and density cultures of *M. tuberculosis.*

(A) Cultures of *M. tuberculosis* H37Ra at different time points were diluted and inoculated into 7H9-OADC medium alone or supplemented with culture filtrate (CF), to enumerate replicating and non-culturable bacilli (DCTB), respectively. Bacillary counts were determined using the Most Probable Number (MPN) method after 35 days of incubation. The ratio of MPN in 7H9-OADC + CF over MPN in 7H9-OADC was calculated to estimate DCTB enrichment over time. (B, C) GFP fluorescence was used to monitor the growth of various inocula from early exponential phase cultures of *M. tuberculosis* H37Rv (B) and

L1-500960 (C) in 7H9-OADC (medium) or 7H9-OADC supplemented with culture filtrate (+ CF) after 21 days of incubation. (D) MPN counts were performed on the same cultures after 28 days of incubation. (E) *M. tuberculosis* L1-500960 strain was diluted to 10^3 CFU.mL^{-1} and cultivated in either 7H9-OADC medium alone or supplemented with culture filtrate (CF). GFP fluorescence was measured after 28 days of incubation. Each point represents an individual well. Data are presented as mean + SD of three biological replicates. The dashed line represents the threshold for positive growth, calculated as ($median_{neg.control}$ + 3x$SEM_{neg.control}$)x2. Statistical significance was determined using two-way ANOVA followed by Sidak's multiple comparisons test: ***, $P < 0.00001$; ****, $P < 0.000001$; ns, not significant.

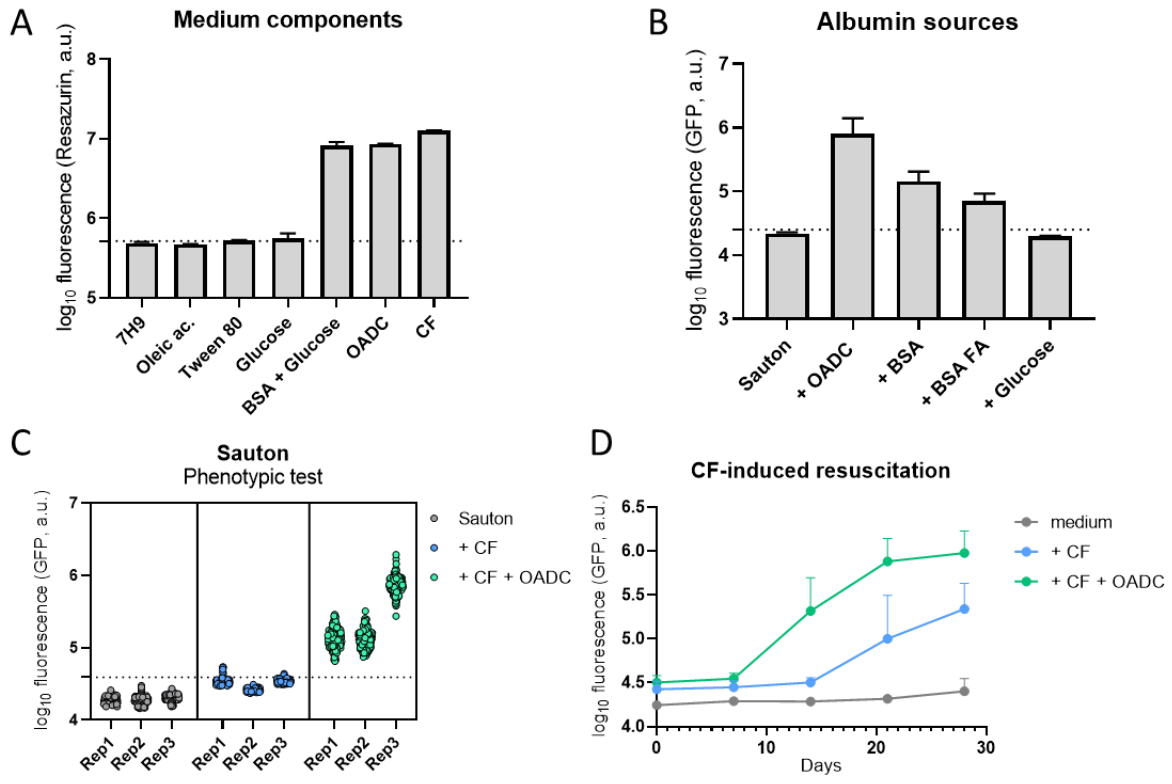


Figure 4: Non-culturable phenotypic test on *M. tuberculosis* L1-500960 grown in albumin-free media

(A) The different components of the 7H9-OADC medium were tested separately for their ability to induce the growth of *M. tuberculosis* L1-500960 strain at 10^2 CFU.mL^{-1}, in 7H9-gly medium. After 14 days, resazurin was added at 0,005% and fluorescence was measured after 24 hours. Data are presented as mean + SD of five technical replicates. (B) Various albumin sources were tested for their ability to induce the growth of *Mtb* L1-500960 strain at 10^4 CFU.mL^{-1} in Sauton medium. GFP fluorescence was measured after 21 days of incubation. Data are presented as mean + SD of two biological replicates. (C) *Mtb* L1-500960 strain was diluted to 10^3 CFU.mL^{-1} and cultivated in Sauton medium alone or supplemented with culture filtrate (CF) with or without 10% OADC or culture filtrate produced in 7H9-OADC medium. GFP fluorescence was measured after 21 days of incubation. Each point represents an individual well and three biological replicates are showed. (D) Growth kinetics of a 10^3 CFU.mL^{-1} starting inoculum of the *Mtb* L1-500960 strain, in Sauton medium alone or supplemented with different culture filtrates (CF). Data are shown as mean + SD of two or four biological replicates, respectively. The dashed line represents the threshold for positive growth, calculated as (median$_{neg.control}$ + 3xSEM$_{neg.control}$)x2.

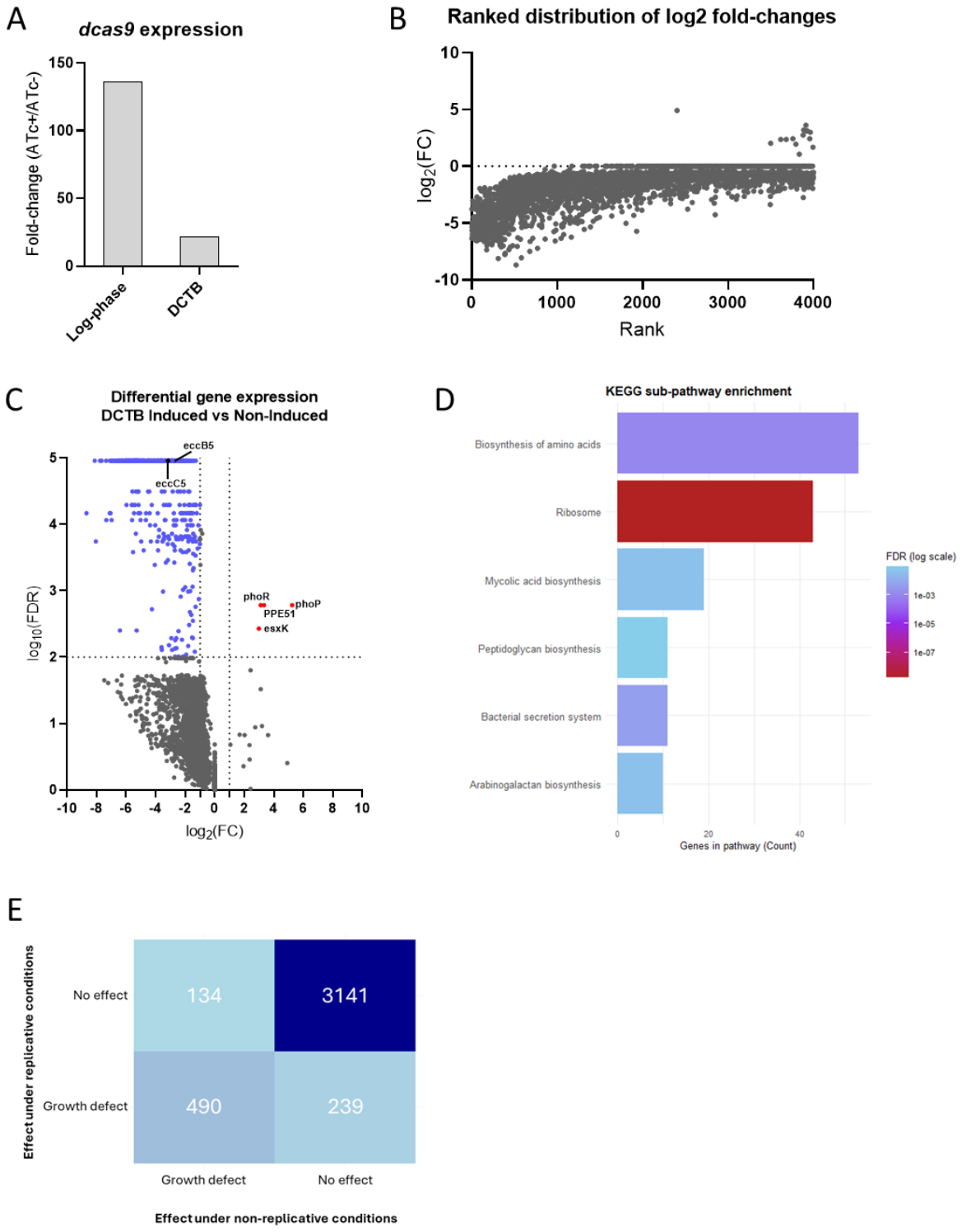
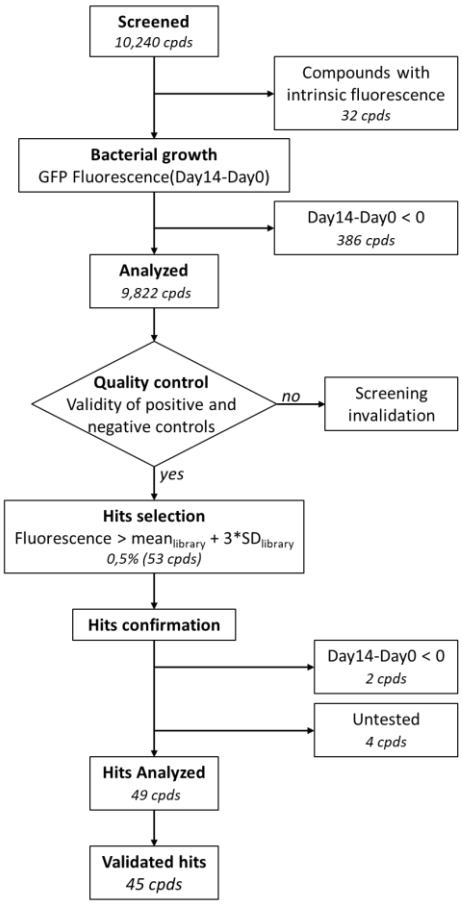


Figure 5: Genetic profiling of DCTB by CRISPRi

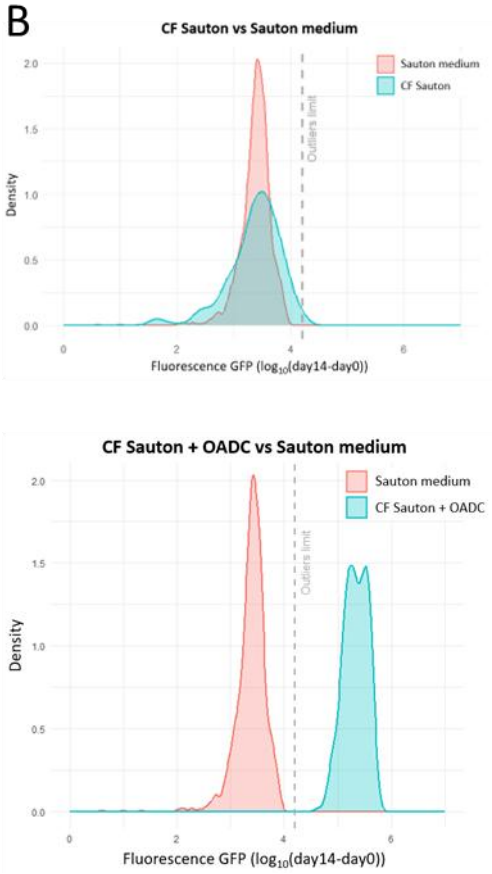
(A) Expression of *dcas9*, driven by the same promoter as the sgRNA, measured by RT-qPCR in *Mtb* L1-500960 cultures during exponential growth or induced into the DCTB phenotype. Expression is shown as the fold-change between induced (ATc^+) and non-induced (ATc^-) conditions. (B) Distribution of fold-change values (ATc^+/ATc^-) for gene

expression in DCTB. (C) Volcano plot representing the significance of differential gene expression in the DCTB phenotype after 21 days under CRISPRi induction (cut-off: $log_2FC > 1$ or < -1 ; FDR < 0.01). (D) KEGG pathway enrichment analysis of genes whose inhibition by CRISPRi results in a significant growth defect in the DCTB model. (E) Matrix comparing genes causing or not causing a growth defect upon CRISPRi induction in the *M. tuberculosis* L1-50060 DCTB model with those identified in exponentially growing *M. tuberculosis* H37Rv, based on Bosch et al., 2021 (Bosch et al., 2021).

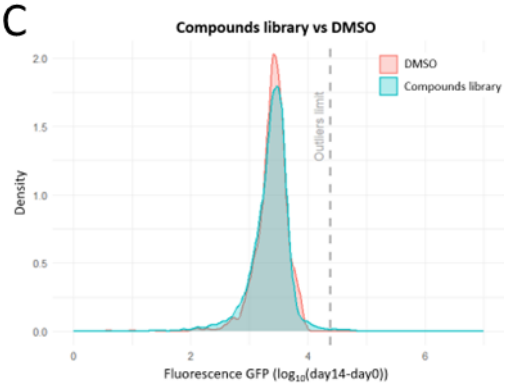
A


Screened
10,240 cpds
Compounds with intrinsic fluorescence
32 cpds
Bacterial growth
GFP Fluorescence(Day14-Day0)
Day14-Day0 < 0
386 cpds
Analyzed
9,822 cpds
Quality control
Validity of positive and negative controls
no
Screening invalidation
yes
Hits selection
Fluorescence > mean$_{library}$ + 3*SD$_{library}$
0,5% (53 cpds)
Hits confirmation
Day14-Day0 < 0
2 cpds
Untested
4 cpds
Hits Analyzed
49 cpds
Validated hits
45 cpds

B


CF Sauton vs Sauton medium
Sauton medium
CF Sauton
Outliers limit
Density
Fluorescence GFP (log$_{10}$(day14-day0))
CF Sauton + OADC vs Sauton medium
Sauton medium
CF Sauton + OADC
Outliers limit
Density
Fluorescence GFP (log$_{10}$(day14-day0))

C


Compounds library vs DMSO
DMSO
Compounds library
Outliers limit
Density
Fluorescence GFP (log$_{10}$(day14-day0))

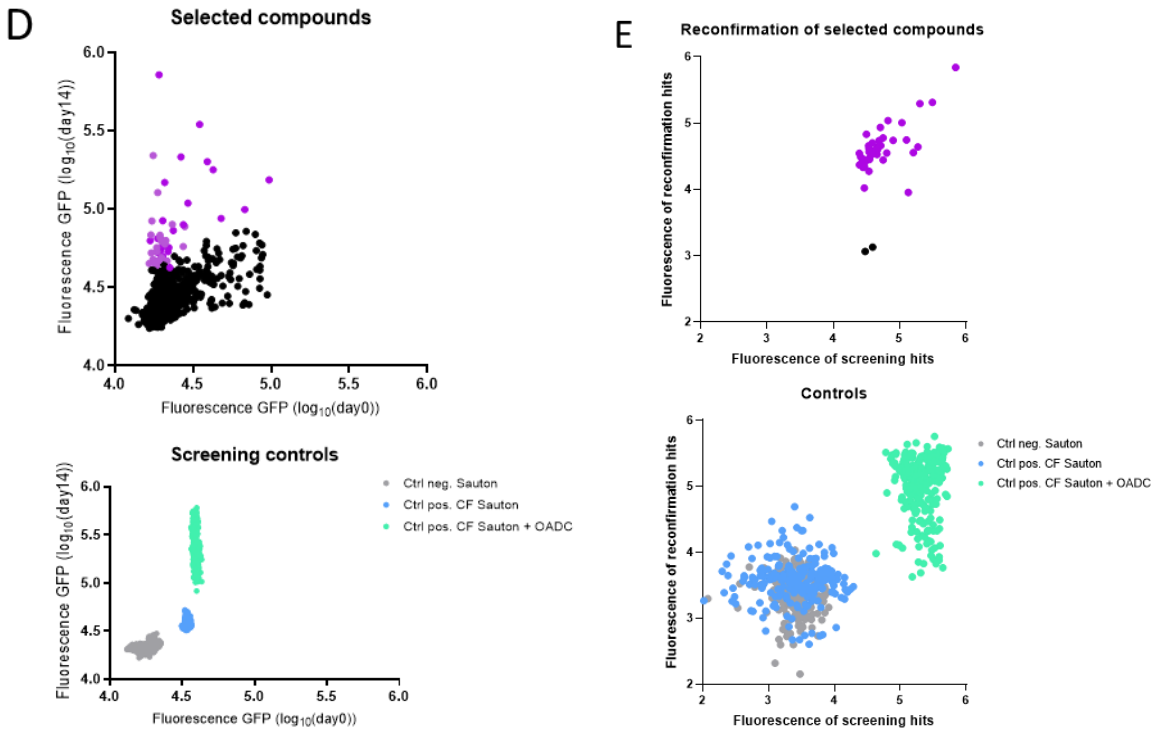


Figure 6: Search for small molecules able to induce the resuscitation of *M. tb* in a DCTB state, in a screening test.

(A) Workflow showing the different steps from 10,290 small molecules screening to selecting hits capable of inducing the growth of *Mtb* L1-500960 strain in a DCTB state. (B) Distribution of GFP fluorescence values log_{10}(day14-day0), representing bacterial growth gain, in the negative control (red curve), the two positive controls (blue curve) culture filtrate produced in Sauton alone, or with 10% OADC and (C) in presence of the tested compounds (blue curve). Dashed line = μ + 3σ computed separately for (B) negative control wells and for (C) compound wells (D) Screening results with *Mtb* L1-500960 strain fluorescence after 14 days in Sauton medium with compounds, at an initial inoculum of 10^3 CFU.mL^{-1} (DCTB state), plotted against basal fluorescence measured at day 0. (E) Reconfirmation of hits with *Mtb* L1-500960 strain in Sauton medium, at an initial inoculum of 10^3 CFU.mL^{-1}. Results are represented as log_{10}(Fluorescence(day14-day0)) of the reconfirmation hits results against screening hits results previously obtained for corresponding hits. (D, E) Positive and negative controls are represented in the same manner. Purple dots indicate selected compounds, defined by the criterion: Fluorescence > $mean_{library}$ + 3x$SD_{library}$. The fluorescence data used in this calculation correspond to the GFP fluorescence at day 14 minus that at day 0. Each point represents an individual well.

Supplementary data

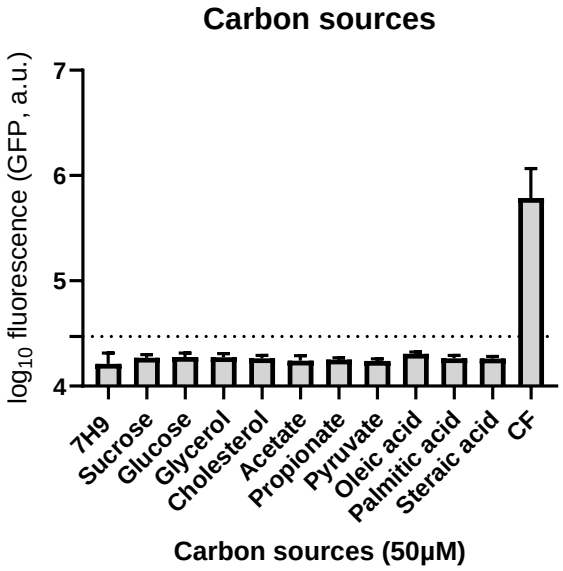


Figure S1: Non-culturable phenotypic test on *M. tuberculosis* L1-500960 grown in albumin-free media

Various carbon sources were tested separately at a concentration of 50 µM for their ability to induce the growth of *M. tuberculosis* L1-500960 strain at 10^4 CFU.mL^{-1}, in a 7H9 non-enriched medium. GFP fluorescence was measured after 14 days of incubation. Data are presented as mean + SD of six technical replicates. The dashed line represents the threshold for positive growth, calculated as ($median_{neg.control}$ + 3*$SEM_{neg.control}$)*2.

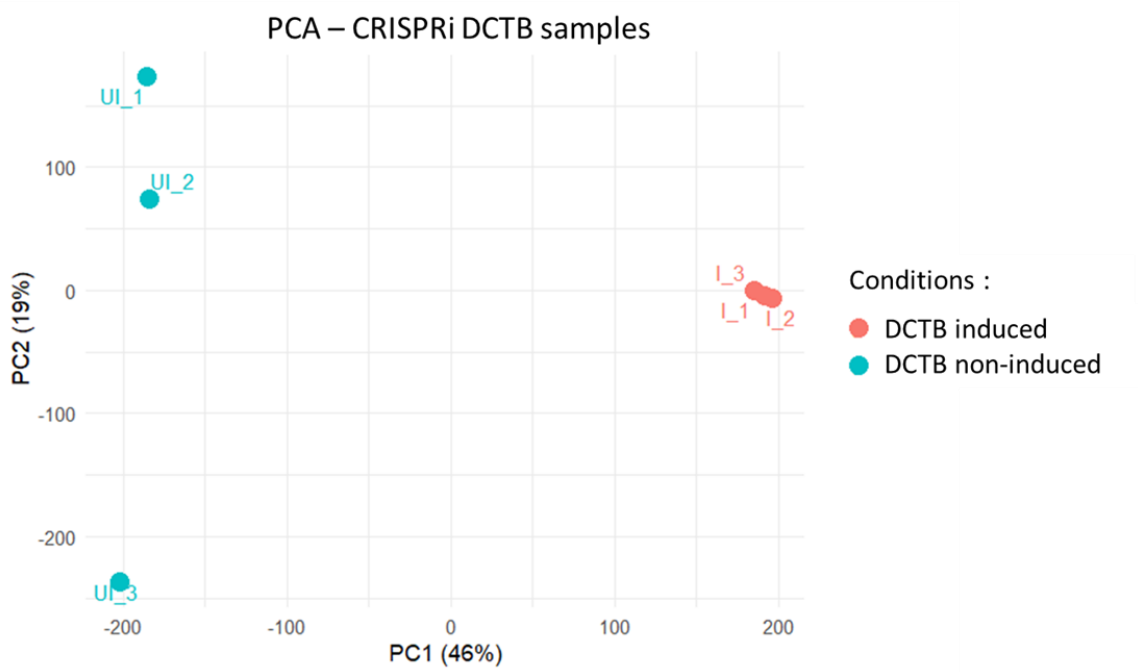


Figure S2: Principal component analysis on CRISPRi screening samples.

The data show the distribution by PCA of samples from CRISPRi screening, three biological replicates induced with ATc (I_1-3) and three non-induced biological replicates (UI_1-3). PCA was performed in R (*prcomp*) on centered and scaled data after zero-variance filtering and median imputation. Shown are PC1 and PC2, with points colored by condition.

Pathways	Sub-pathways	Number of genes	Differentially expressed genes
Translation	Ribosomes	43	*rpsA, rpsB, rpsC, rpsD, rpsE, rpsF, rpsG, rpsH, rpsI, rpsJ, rpsK, rpsL, rpsM, rpsO, rpsP, rpsQ, rpsR1, rpsS, rplA, rplB, rplC, rplD, rplE, rplF, rplK, rplL, rplM, rplO, rplP, rplQ, rplR, rplS, rplT, rplU, rplV, rplW, rplY, rpmA, rpmC, rpmE, rpmH, rpmI, rpmJ*
	rRNA, tRNA	47	16S, 23S, tRNA-Ala15, tRNA-Arg, tRNA-Arg28, tRNA-Asn25, tRNA-Asp12, tRNA-Cys, tRNA-Cys33, tRNA-Gln, tRNA-Gln36, tRNA-Glu, tRNA-Glu11, tRNA-Glu35, tRNA-Gly, tRNA-Gly32, tRNA-Gly4, tRNA-His29, tRNA-Ile, tRNA-Ile1, tRNA-Leu, tRNA-Leu20, tRNA-Leu3, tRNA-Lys10, tRNA-Phe13, tRNA-Pro21, tRNA-Pro26, tRNA-Pro40, tRNA-Ser, tRNA-Ser41, tRNA-Ser44, tRNA-Thr, tRNA-Thr6, tRNA-Thr9, tRNA-Trp, tRNA-Trp8, tRNA-Tyr5, tRNA-Val, tRNA-Val34, tRNA-Ala, tRNA-Arg43, tRNA-Asn, tRNA-His, tRNA-Lys, tRNA-Met, tRNA-Pro, tRNA-Tyr
	Aminoacyl-tRNA synthetases	18	*alaS, argS, aspS, cysS1, glyS, hisS, ileS, leuS, lysS, metS, pheS, pheT, proS, serS, thrS, trpS, tyrS, valS*
	Translation factors	7	*fusA1, infA, infB, infC, prfB, tsf, tuf*
	Amino acid metabolism	47	*asd, ask, ilvB1, ilvD, ilvE, ilvN, hisA, hisB, hisC1, hisD, hisE, hisF, hisG, hisH, argA, argC, argD, argG, argH, asnB, aspC, glnA1, gltB, gltD, lysA, metA, metC, metE, metK, pheA, proB, proC, serA1, serC, thrA, thrC, aroA, aroB, aroE, aroF, aroG, aroK, trpA, trpB, trpC, trpD, trpG*
Cell wall and envelope	Cell division	9	*ftsE, ftsH, ftsK, ftsW, ftsX, ftsZ, parA, parB, wag31*
	Arabinogalactane/LAM	16	*aftA, aftB, aftD, embA, embB, embC, glf, glfT1, glfT2, lpqW, manA, manB, mptA, rfbD, rfbE, wbbL1*
	PDIMs/PGLs	4	*pks1, pks12, pks7, pks13*
	Peptidoglycan	13	*murB, murC, murD, murE, murF, murX, pbpB, ripA, amiB1, pbpA, ponA2, rip, rodA*
	Mycolic acids and fatty acids	24	*accA3, accD4, accD5, accD6, acpM, desA1, desA2, dprE1, fabD, fabG1, fadD32, fas, gpgS, hadA, hadB, inhA, kasA, kasB, pgsA1, pptT, fbpA, mmaA4, desA3, fadB2, fadD4, fadD5*
	Transport systems	8	*mmpL5, mmpS5, mmpL3, lppX, lprB, mce2C, yrbE2B*
	Secretion systems	24	*lepB, lspA, secA1, secD, secE1, secF, secY, subI, tatA, tatB, tatC, eccA3, eccB3, eccC3, espG3, eccB5, eccC5, eccB4, esxJ, PE5, PPE1, PPE49, PPE54, PPE4*
Cofactors and vitamins		17	*coaA, coaE, dfp, folD, folE, pabB, dxr, dxs1, gcpE, ispF, lytB2, nadA, nadD, ribA2, ribF, snzP, fdhD*
	Biotin	4	*bioA, bioB, bioD, bioF1*
	Heme	7	*hemA, hemB, hemC, hemD, hemE, hemL, hemZ*
DNA replication and repair		17	*mutT4, recO, ruvA, ruvB, ruvC, uvrC, uvrD1, dnaA, dnaB, dnaE1, dnaG, dnaN, dnaZX, gyrA, gyrB, ssb, topA*
Transcription		15	*rpoA, rpoB, rpoC, rpoZ, rseA, sigA, fmt, nusA, nusG, pcnA, pth, rho, rnc, rne, rnpA*
Respiration and energy	ATP synthase	8	*atpA, atpB, atpC, atpD, atpE, atpF, atpG, atpH*
	Cytochrome complexes	9	*ccdA, ccsA, ctaB, ctaC, ctaD, ctaE, qcrA, qcrB, qcrC*
Intermediary metabolism	Carbon	17	*aceE, eno, fum, gap, glcB, glpD2, glpX, gpm1, pgk, sucC, sucD, pmmA, rmlD, rpe, tkt, pfkA, hsaC*
	Nucleotide	15	*dut, guaB2, guaB3, ndkA, prsA, purA, purB, purD, purK, purN, pyrB, pyrC, pyrD, pyrG, pyrR*
Regulation and signalling		21	*fhaA, fhaB, garA, ideR, lexA, moxR1, mprB, mtrA, mtrB, pknA, prrA, pstP, tcrY, whiA, whiB1, whiB2, rslA, lsr2, Rv0807, Rv0472c*
Stress responses	Stringent response	2	*relA, ppk1*
	Oxidative stress	4	*katG, dipZ, sodA, trxB2*
	Proteostasis / proteasome degradation	9	*dop, mpa, pafA, clpC1, clpP1, clpP2, clpX, prcA, prcB,*
	Heat shock	6	*dnaJ2, dnaK, groEL2, groES, grpE, htrA*
	Toxin–antitoxin systems	5	*parD2, sirA, vapB41, vapB43, vapC26*
Inorganic ion metabolism	Iron	6	*mbtB, mbtC, mbtD, mbtE, mbtF, furA*
	Potassium	3	*ceoB, ceoC*
	Phosphate	5	*phoT, phoY2, pstC2, pstS1, pstS3*
	Sulfate	6	*cysA1, cysA2, cysT, cysW, cysD, cysH*

Figure S3: Essential genes during DCTB state.

Non-exhaustive list of genes whose inactivation significantly reduces the survival of *M. tb* L1-500960 in a DCTB state (thresholds: $\log_2$FC <-1; FDR < 0.01).

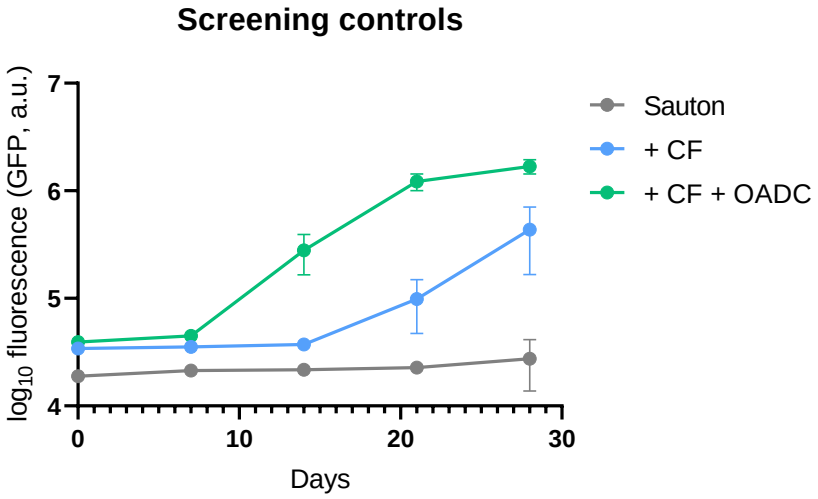


Figure S4: Growth kinetic of positive and negative screening controls.

Growth kinetics of a 10^3 CFU.mL^{-1} starting inoculum of the *Mtb* L1-500960 strain, in Sauton medium alone or supplemented with culture filtrate produced in Sauton alone (CF), or with 10% OADC (CF + OADC). Data are presented as mean + SD of technical replicates.

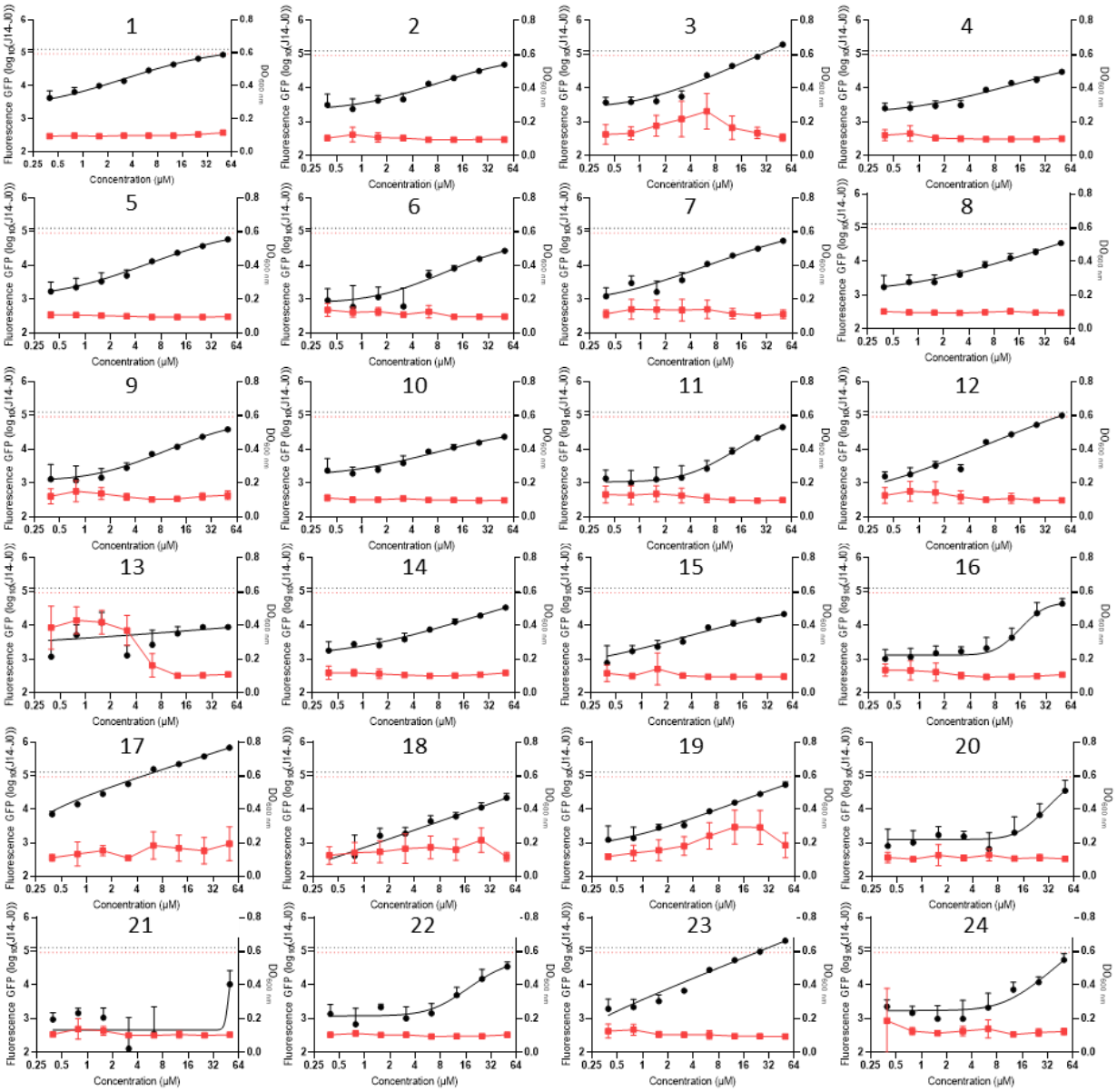
C. Activité des composés sélectionnés

Les 45 composés confirmés pour leur effet de réveil à 50 µM ont également été soumis à un test d'activité afin d'évaluer leur potentiel de réveil des DCTB de manière plus quantitative. Chaque molécule a été testée en dose-réponse, afin d'identifier les composés les plus actifs.

Après dilution d'une culture en fin de phase exponentielle de croissance, *M. tb* L1-500960 a été diluée à 10^3 bactéries/mL et cultivée en milieu Sauton, en présence de différentes concentrations en composés, ou de 50% CF Sauton + 10% OADC comme contrôle positif d'induction du réveil. Après 14 jours d'incubation, l'intensité de fluorescence de la GFP a été mesurée. Nos résultats montrent une augmentation proportionnelle de la fluorescence avec la concentration en molécules (**Figure 48**). Cependant, ce profil n'est pas caractéristique d'une courbe sigmoïde typique d'une dose-réponse. La relation observée ici est linéaire, suggérant que la fluorescence mesurée est directement proportionnelle à la quantité de composé présent, et ne montre pas de « seuil » à partir duquel *M. tb* répond à la présence des molécules.

Afin de vérifier si le signal GFP mesuré correspond bien à de la croissance bactérienne, une mesure de la densité optique (600nm) a été réalisée après 28 jours d'incubation. Cette mesure n'avait pas été réalisée précédemment car ce signal est moins sensible que celui de la GFP. Pour la majorité des composés, aucune croissance n'a été détectée par ce mode de lecture (**Figure 48**). Ces observations indiquent que ces composés émettent une fluorescence détectable à 510 nm après contact avec les bactéries, indépendamment de la croissance bactérienne. Néanmoins, 3 composés entraînent une augmentation de la DO_{600} des bactéries DCTB, les n°13, 19 et 44. Concernant le composé n°13, un signal de croissance élevé est détecté lorsqu'il est utilisé à une concentration inférieure à 5 µM, suggérant qu'il pourrait être toxique à de trop fortes concentrations. Les composés n°19 et 44, quant à eux, induisent une croissance lorsqu'ils sont utilisés à une concentration entre 5 et 25 µM, mais d'une intensité plus faible que celle obtenue en présence du composé n°13.

Ainsi, ces trois composés, et en particulier le composé n°13, semblent capable d'induire la sortie de l'état DCTB de *M. tb* L1-500960.


1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
Concentration (μM)
Concoentration (μM)
Fluorescence GFP (log10(J14-J0))
DO600 nm

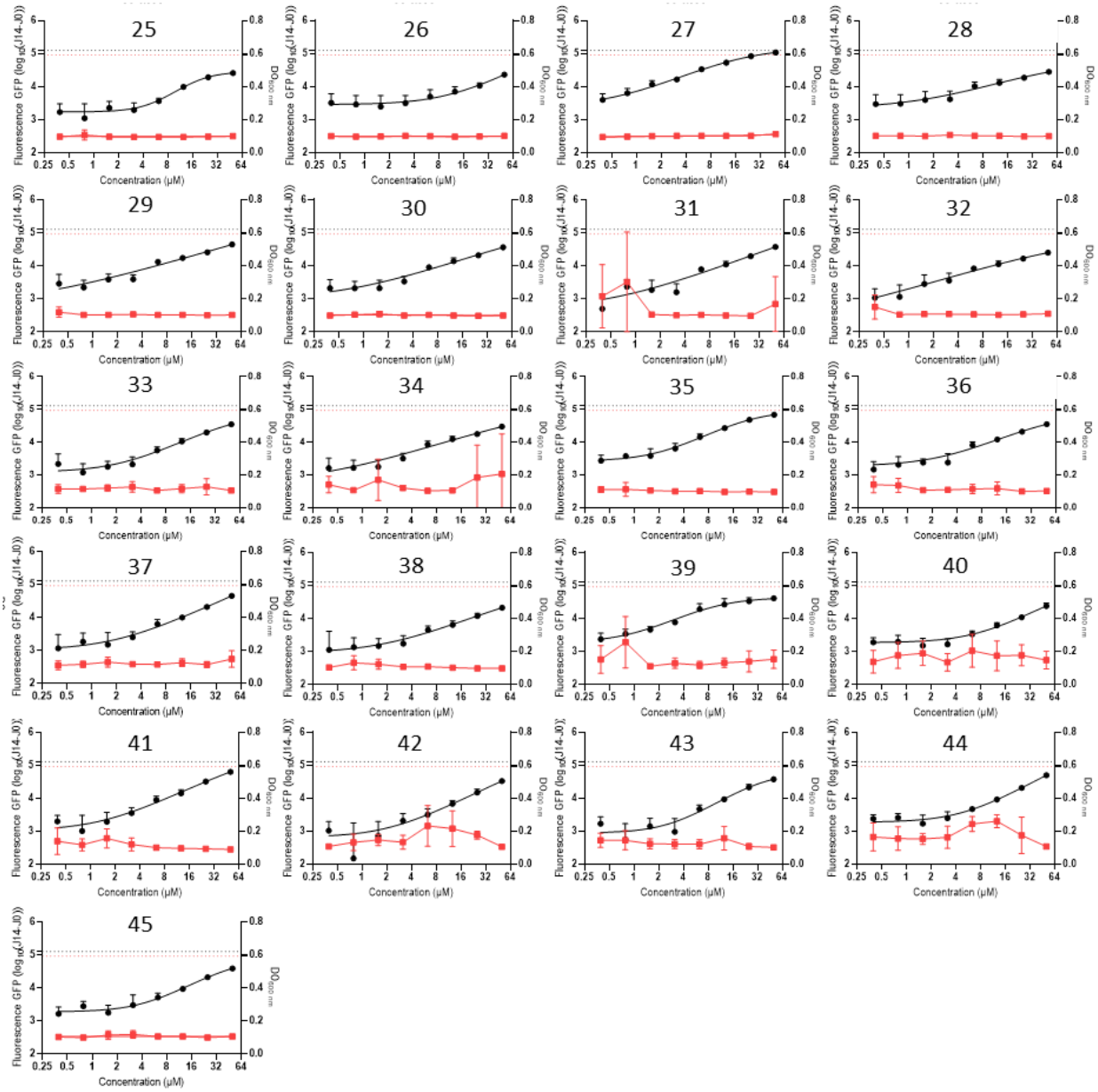


Figure 48 : Activités des composés sur le réveil des DCTB.
M. tb L1-500960 a été diluée à 10^3 bactéries/mL, puis cultivée dans un milieu Sauton en présence de différentes concentrations des 45 composés confirmés. L'intensité de fluorescence de la GFP a été mesurée après 14 jours (rond noir), et la DO_{600} après 28 jours d'incubation (carré rouge). Le signal d'intensité de fluorescence représenté correspond à la soustraction du signal obtenu au jour 0 sur celui obtenu au jour 14. Une condition de culture de *M. tb* L1-500960 préparée de la même manière que décrite ci-dessus a été cultivée en présence de 50% CF Sauton + 10% d'OADC, afin d'évaluer le réveil des DCTB. Les lignes pointillées en noir et en rouge représentent respectivement la médiane de l'intensité de fluorescence de la GFP ou de la DO_{600} de cette condition. Les données sont présentées sous forme de moyenne ± écart-type de trois réplicats biologiques.

III. Tolérance aux antibiotiques

Le phénotype de tolérance aux antibiotiques constitue l'une des principales causes d'échec thérapeutique, lié à la persistance de sous-populations bactériennes chez le patient [275,276,307]. Au cours de l'infection, différentes populations de *M. tuberculosis* co-existent et peuvent transiter d'un état à l'autre, ce qui rend difficile l'identification précise des sous-populations responsables de la tolérance [103,290,308]. Néanmoins, ce phénotype est généralement associé à un ralentissement de la croissance et du métabolisme bactérien, rendant de nombreuses cibles pharmacologiques non-essentielles à la survie dans ces conditions [283]. Ainsi, la majorité des modèles de bactéries non réplicatives, *in vitro* et *in vivo*, présentent une tolérance accrue aux antibiotiques, notamment l'isoniazide, la rifampicine ou la bédaquiline [211,215,219,292]. Cette caractéristique renforce leur pertinence en tant que modèle d'étude et justifie leur utilisation dans la recherche de nouvelles molécules ciblant les bactéries persistantes.

Nous avons cherché à déterminer si le modèle de DCTB généré par dilution montrait une tolérance aux antibiotiques. Pour cela, nous avons généré des DCTB, réveillés ou non au contact de surnageant de culture (CF). Les DCTB et les bactéries réveillées par le CF ont ensuite été exposées à la rifampicine (4 ou 16 µg/mL) pendant 4 jours. À l'issue du traitement, les cultures ont été lavées deux fois pour éliminer l'antibiotique, puis diluées au 1/10ème en vue d'un test de MPN, réalisé avec ou sans CF afin d'évaluer respectivement la survie des bactéries totales et des DCTB.

Malheureusement, ce protocole n'a pas permis de conclure sur le statut de tolérance des cultures. En effet, malgré les lavages, un phénomène de « *carry-over* » de rifampicine a été observé lors du comptage MPN : les premières dilutions réalisées pour le test MPN ne montraient pas de croissance, car la rifampicine était encore présente en concentration suffisamment élevée malgré les dilutions. Dans notre modèle, basé sur une dilution initiale à très faible inoculum, la perte de ces premières dilutions est particulièrement problématique, car elle ne laisse pas un nombre suffisant de point de mesure pour une quantification robuste. Ainsi, cette méthode s'est révélée inadaptée à l'évaluation de la tolérance aux antibiotiques chez le modèle DCTB par dilution.

Notre seconde approche visait à contourner le phénomène de « carry-over » en utilisant du charbon actif, qui est connu pour éponger les antibiotiques, tout en adoptant un format plus haut-débit permettant de tester plusieurs antibiotiques et concentrations en

parallèle. Les DCTB ou les bactéries en phase exponentielle de croissance ont été exposés pendant 4 jours à des gammes de rifampicine, isoniazide, linézolide ou bédaquiline. À l'issue du traitement, le contenu de chaque puit a été transféré dans deux nouvelles plaques : (i) une contenant du milieu liquide 7H9-OADC supplémenté en charbon actif (0,4%) et (ii) une plaque de milieu solide 7H11-OADC, également supplémenté en charbon actif. L'utilisation d'un milieu contenant de l'OADC visait à favoriser le réveil des DCTB et à permettre le dénombrement de l'ensemble des bactéries survivantes, tandis que le charbon actif devait neutraliser l'antibiotique. Après 21 jours de croissance, l'intensité du signal GFP a été mesuré. En milieu liquide, le charbon actif a inhibé la croissance bactérienne, y compris dans les contrôles sans antibiotique. En milieu solide, la mesure de l'intensité de la fluorescence par le haut de la plaque a été perturbée par la présence de la couche de charbon, rendant la mesure imprécise.

Notre troisième approche a reposé sur l'utilisation d'un système de filtration directement en plaque 96 puits. L'objectif était de cultiver les bactéries dans une plaque 96 puits, de nouveau en présence de plusieurs antibiotiques, à différentes concentrations. Grâce à la présence d'une membrane de 0,22 µm au fond de chaque puit, le milieu contenant l'antibiotique pouvait être aspiré tout en maintenant les bactéries au fond du puit, celles-ci ne pouvant pas passer la membrane. Le milieu de réveil contenant de l'OADC était ensuite ajouté pour permettre la croissance des bactéries survivantes.

Cependant, cette méthode n'a pas permis d'obtenir des résultats exploitables. En raison du très faible nombre initial de bactéries, les étapes de lavage ont introduit une variabilité importante, pouvant entraîner la perte partielle ou totale des cellules. Cette variabilité se traduit par des profils de croissance hétérogènes, rendant impossible l'interprétation des résultats quant à l'existence ou non d'une tolérance aux antibiotiques dans notre modèle de DCTB.

IV. Discussion

Cette partie du projet a eu pour but de caractériser plus en détail notre modèle de DCTB. Dans l'ensemble, ces résultats mettent en évidence le métabolisme actif des bactéries DCTB, avec une activité métabolique détectée par une approche de cytométrie en flux et des gènes impliqués dans différentes voies métaboliques étant essentiels à leur survie. Ils démontrent également que l'induction d'un état non réplicatif et le réveil des DCTB

peuvent êtres modulés par l'inactivation ciblée de gènes spécifiques. Une approche de criblage à haut-débit utilisant de petites molécules afin d'induire le réveil des DCTB a également été réalisée, et a permis l'identification de trois composés prometteurs.

Dans un premier temps, nous avons cherché à caractériser la physiologie de *Mycobacterium tuberculosis* L1-500960 dans son état non réplicatif. Le modèle permettant l'obtention de DCTB par dilution d'une culture présente des limites méthodologiques intrinsèques à sa mise en place. Les approches classiquement utilisées pour caractériser ce type de modèle, comme la transcriptomique, l'infection cellulaire ou l'évaluation de la tolérance aux antibiotiques, se révèlent peu adaptées à notre modèle et nécessitent une réflexion méthodologique et une adaptation des protocoles. À cause de la faible densité bactérienne, les expériences requièrent souvent des volumes importants de culture, ce qui complique la mise en œuvre de plusieurs conditions expérimentales en parallèle. En outre, l'identification des paramètres permettant l'obtention d'un phénotype non réplicatif stable a nécessité un temps considérable. Sur les nombreux tests réalisés, certains n'ont pas pu être analysés car le phénotype DCTB était instable.

Dans ce contexte, la cytométrie en flux a été un outil particulièrement informatif sur le modèle DCTB, puisqu'elle peut être appliquée à des cultures de faible densité bactérienne. Nous avons cherché à caractériser la population DCTB à l'aide de différents marqueurs [309]. Le marquage à l'iodure de propidium a permis de démontrer que les cellules DCTB ne présentent pas d'altération membranaire et sont viables. Le marquage à la fluorescéine diacétate a révélé l'existence d'une population avec un métabolisme réduit par rapport à des bactéries en phase exponentielle de croissance. Cette observation est cohérente avec une autre étude, montrant que des bactéries induites dans un état non réplicatif dans le modèle de Wayne conservent un marquage positif à la FDA, mais d'intensité inférieure à celui d'une population en phase exponentielle de croissance [310]. Une seconde étude réalisée sur une population de *M. tb* en phase stationnaire de croissance ou en condition de carence en nutriment montre également un métabolisme réduit chez ces deux populations, via une observation de la réduction de l'expression de l'ARN ribosomique [166]. Néanmoins, nous n'avons pas observé d'accumulation de gouttelettes lipidiques ou d'un stress redox, qui sont observés dans des modèles de bactéries non réplicatives [166,195,218,222,303]. Des contraintes techniques indépendantes au projet ont limité

l'exploitation de cet outil et la réalisation de réplicats biologiques nécessaires pour confirmer ces observations. En outre, la FDA est un marqueur représentatif de l'activité estérase. Si plusieurs études corrèlent cette activité avec l'activité métabolique globale des bactéries [310], les bactéries non réplicatives présentent un métabolisme différent, avec l'activation sélective de certaines voies métaboliques [191,202,203,211]. Il serait ainsi pertinent de regarder d'autres indicateurs de l'activité métabolique, comme la synthèse protéique ou la respiration cellulaire. Une analyse transcriptomique avec un protocole adapté à des échantillons faiblement concentrés pourrait également fournir une vision d'ensemble du métabolisme des DCTB.

Par ailleurs, la cytométrie en flux offre la possibilité d'étudier la réplication des cellules. Une méthode de dilution de fluorescence, correspondant à un marquage initial, suivi d'un lavage, permet de suivre la diminution du signal au cours du temps, les cellules issues de divisions successives présentant une intensité deux fois plus faible à chaque génération [311]. Cette approche pourrait permettre de déterminer si l'ensemble de la population est réveillé en présence de CF et d'albumine, ou si seules certaines sous-populations sont capables de sortir de l'état non réplicatif, devenant progressivement majoritaires.

De plus, la microfluidique couplée à la microscopie en temps réel constitue une approche particulièrement adaptée à notre modèle DCTB, puisqu'elle nécessite un faible nombre de bacilles et permet d'explorer de nombreux paramètres aussi bien métaboliques que réplicatifs. Il serait intéressant de suivre le comportement réplicatif individuel des DCTB, et regarder leur réaction en réponse au CF ou à l'albumine, dans le même but que l'approche de dilution de fluorescence.

Dans ce même objectif de caractérisation de l'état DCTB, le criblage CRISPRi a fourni une vision d'ensemble des gènes et voies cellulaires nécessaires à la survie des bactéries dans cet état. Les résultats obtenus mettent en évidence plusieurs fonctions essentielles, qui concordent avec des observations effectuées dans d'autres modèles de bactéries non réplicatives. Notamment, de nombreux gènes impliqués dans les processus de traduction, remodelage de la paroi et respiration cellulaire se révèlent indispensables.

Notre modèle de DCTB présente également des points de divergence avec les autres modèles. Par exemple, bien qu'il semble y avoir des similarités de régulation avec le modèle en pH acide via l'intervention de PPE51 et du système PhoP/PhoR [312], la source de carbone utilisée n'influence pas la mise en place du phénotype dans notre modèle. De plus,

alors que la plupart des modèles de bactéries non réplicatives sont caractérisés par un métabolisme du carbone spécifique reposant sur le shunt du glyoxylate [215,279,313], notre criblage CRISPRi n'a fourni aucun indice en faveur d'un tel métabolisme dans notre modèle DCTB.

L'ensemble des caractéristiques du modèle DCTB décrit dans cette étude suggèrent un état intermédiaire entre réplication active et absence stricte de réplication. Les DCTB pourraient représenter une forme de dormance moins « profonde », puisqu'elles ne sont pas soumises à un stress externe qui peut être plus contraignant pour la physiologie bactérienne, et pourraient maintenir plus d'activités basales. Par ailleurs, les comparaisons effectuées dans cette étude se basent sur des analyses transcriptomiques, or une faible expression génique n'est pas nécessairement synonyme de non-essentialité.

Bien que très informative, l'approche CRISPRi possède quelques limites. Tout d'abord, la banque génétique utilisée ici a été construite de manière à explorer principalement les fonctions des gènes annotés comme essentiels, qui sont ciblés par un plus grand nombre de sgRNA, au détriment des gènes non essentiels. De plus, *M. tb* possède de nombreuses protéines avec des fonctions redondantes. Dans ce cas, l'inactivation d'un gène unique peut ne pas se traduire par un effet phénotypique observable, car d'autres voies ou protéines assurent la fonction par ailleurs. Cela pourrait expliquer pourquoi nous n'avons pas identifié une voie complète du réveil des DCTB, mais uniquement certains composants spécifiques de cette voie, dont la fonction ne peut être remplacée par d'autres éléments redondants. Enfin, cette banque a été réalisée en prenant le génome de *M. tb* H37Rv pour la construction des sgRNA. Ainsi, nous avons dû exclure de l'analyse environ 1,5% des sgRNA, qui présentaient au moins un SNP (*single nucleotide polymorphism*) avec le génome de *M. tb* L1500960.

Les DCTB sont isolées aussi bien chez les patients nouvellement diagnostiqués [103,104,276], que chez ceux sous antibiothérapie [104,266,272], ce qui indique leur capacité à persister malgré le traitement [275]. Ainsi, les modèles de bactéries non réplicatives générées *in vitro* valident leur pertinence en reproduisant ce phénotype de tolérance, en particulier à l'isoniazide et la rifampicine, mais aussi à d'autres antituberculeux utilisés en clinique [202,211,215].

En raison des contraintes techniques liées aux conditions de culture du modèle DCTB, nous n'avons pas pu explorer cet aspect. La cytométrie en flux pourrait constituer une approche adaptée pour explorer la tolérance aux antibiotiques dans ce modèle, en déterminant la viabilité et le phénotype des bactéries au cours du traitement antibiotique, sans avoir besoin de laver le milieu et réveiller les DCTB. Cependant, les résultats de CRISPRi montrent que plusieurs gènes codant pour les cibles des antibiotiques de première ou seconde ligne (*inhA, rpoB, gyrA, atpE, embABC*) sont essentiels à la survie en DCTB. Il est donc peu probable que notre modèle DCTB présente un profil de tolérance à ces antibiotiques.

Le criblage sur des populations de bacilles différentiellement cultivables présente un défi méthodologique, car il nécessite de s'assurer que la population testée est effectivement dans un état non cultivable et stable au cours du test. Ce travail de thèse a permis de mettre en place un modèle robuste et reproductible, pouvant être utilisé dans un format de criblage à haut-débit. L'objectif de ce criblage était d'identifier des composés capables d'induire le réveil de *M. tb* L1-500960 dans un état DCTB. Cette approche a permis d'identifier dans un premier temps 45 composés, dont 3 ont été effectivement reconfirmés pour leur capacité à induire le réveil de *M. tb* L1-500960. Néanmoins, la majorité des composés identifiés lors de l'étape du criblage n'ont pas été reconfirmés, puisque l'intensité de fluorescence de la GFP mesurée semble plutôt être lié à la concentration initiale des composés.

Pour la suite de ce travail, les 3 composés identifiés seront testés par cytométrie en flux, afin de caractériser leur effet sur le réveil des DCTB. Cette approche permettra de suivre la reprise de l'activité métabolique des DCTB, à l'aide d'un marquage au FDA par exemple. À plus long terme, il serait intéressant de tester ces composés sur des échantillons d'expectorations de patients, notamment après un traitement standard aux antituberculeux, lorsque les DCTB sont la population majoritaire.

La réalisation de ce criblage à haut-débit nous a également permis d'identifier différents paramètres clés qui pourraient permettre d'optimiser de futurs tests. D'une part, il est essentiel d'effectuer des lectures utilisant différentes techniques comme la densité optique et l'intensité de fluorescence afin d'éliminer les faux positifs liés à la fluorescence intrinsèque des composés. Par ailleurs, le temps d'incubation en présence des composés

pourrait lui aussi être déterminant. Même si aucune différence n'a été observée entre les hits détectés après 14 et 21 jours d'incubation, les composés pourraient avoir un effet à des temps plus tardifs, à l'instar du CF. Enfin, d'autres chimiothèques pourraient également être adaptées à notre objectif, par exemple avec des molécules dérivées de lipides, puisque ces molécules ont un lien avec le réveil des DCTB [260,261].

Précédemment, nous avons montré qu'une faible quantité de surnageant ou d'OADC suffit à induire le réveil des DCTB. Notre criblage CRISPRi a également révélé des gènes cibles dont l'inactivation induit la réplication des DCTB. Ces observations sont également prometteuses pour l'identification d'une ou plusieurs petites molécules, ciblant ces gènes, qui pourraient mimer l'action du surnageant et induire le réveil des DCTB.

Les molécules induisant le réveil pourraient avoir un impact important sur la détection de *M. tb* dans les échantillons cliniques. Bien que l'ajout de surnageant de culture ne soit pas transposable en routine clinique, plusieurs études ont montré que son utilisation dans le cadre expérimental permettait une réduction significative du temps de détection dans les tests MGIT, en particulier chez les patients présentant une faible charge bacillaire [314]. Cet effet reste dépendant des conditions expérimentales (présence de Tween 80, volume d'échantillon) [314] et des souches productrices de surnageant. En effet, les CF issus des souches de lignées LAM et Beijing réduisent davantage le temps de positivité (TTP, *time to positivity*) des cultures que celui de la souche H37Rv [295].

Par ailleurs, les souches de lignée 1 sont fréquemment associées à des infections *smear* négatives, à des TTP plus longs et à des formes subcliniques de tuberculose [315–317]. Ces caractéristiques pourraient résulter d'une plus forte proportion de DCTB dans la population, contribuant à une moins bonne détection par les tests diagnostiques utilisés et souligne la pertinence de réaliser un criblage sur une souche appartenant à cette lignée. Néanmoins, si des composés actifs étaient identifiés, il serait intéressant de les tester sur des souches issues de plusieurs lignées phylogénétiques, afin d'évaluer la portée de leur activité et également d'identifier d'éventuelles spécificités lignées-dépendantes du réveil.

Par ailleurs, l'identification de molécules capables de réveiller *M. tb* semble aussi prometteuse sur le plan thérapeutique. En effet, les bactéries dans un état non réplicatif ou ayant une activité métabolique réduite sont associées à une tolérance accrue aux antibiotiques [275]. Utilisées en association avec différents antibiotiques, ces molécules

pourraient booster la réplication ou le métabolisme et bactéries pour les rendre sensibles aux antituberculeux, et ainsi favoriser la stérilisation à la fin du traitement.

CHAPITRE 3

INFLUENCE DE LA REGION TBD1 SUR LE PHENOTYPE DE DCTB

Dans la première partie du projet, nous avons développé un modèle *in vitro* de DCTB sélectionnées par dilution d'une culture en phase exponentielle de croissance. Cette nouvelle culture initiée à partir d'un faible inoculum présente un défaut de croissance, caractéristique du phénotype DCTB. Au cours de la mise au point de ce modèle, nous avons mis en évidence une différence entre les souches *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv et L1-500960 quant à la formation de DCTB. En effet, la dilution de *M. tb* L1-500960 permet d'obtenir des DCTB à des inocula de départ plus élevés, et présente moins de réveil spontané en l'absence de facteurs de croissance. Ces observations suggèrent que cette souche est naturellement plus propice à l'induction de cet état physiologique.

D'un point de vue phylogénétique, les souches de *M. tb* H37Rv et L1-500960 appartiennent aux lignées 4 et 1, respectivement. Cette classification repose sur la présence ou l'absence de différents marqueurs génétiques [42]. Sur le plan épidémiologique, les différentes lignées de *M. tuberculosis* se comportent différemment, notamment au niveau de leur dissémination géographique, leur virulence et leur interaction avec le système immunitaire [49,51,316,318–320].

De manière intéressante, le phénotype DCTB semble lui aussi influencé par ces différences [295]. L'objectif de cette partie du projet consiste à étudier les facteurs susceptibles d'expliquer la variation de formation des DCTB que nous avons observé entre les souches des lignées 1 et 4. Cette caractérisation devrait permettre de mieux comprendre les conditions nécessaires à l'établissement ou au réveil des bacilles tuberculeux différentiellement cultivables.

I. Le locus TbD1

Les lignées modernes et ancestrales, auxquelles appartiennent respectivement *M. tb* H37Rv et L1-500960, sont différenciées entre autres par l'absence ou la présence du locus génétique TbD1. Le locus TbD1, pour « *M. tuberculosis specific deletion 1* » a été perdu au cours de l'évolution chez les lignées dites « modernes », mais reste présent chez les lignées dites « ancestrales ». Cette délétion englobe la quasi-totalité du gène *mmpS6*, ainsi

qu'une partie du gène *mmpL6* (*rv1557*), désormais tronqué [42]. La délétion est en phase, et le gène *mmpL6* reste exprimé chez les lignées modernes. MmpS6 est une protéine accessoire dont le rôle n'est pas caractérisé, tandis que MmpL6 appartient à la famille des transporteurs MmpL, connus pour leur rôle de pompe d'efflux. Ce régulon est sous le contrôle du répresseur transcriptionnel Rv1556, qui exerce également une régulation négative sur sa propre expression (**Figure 49**) [56,57].

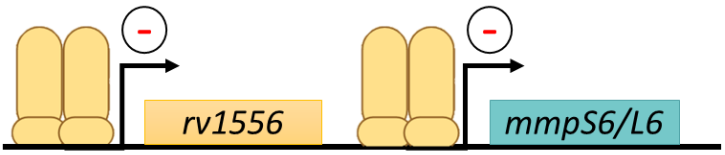


Figure 49 : Schéma représentant la régulation par Rv1556 de *mmpL6* et son propre gène.
Le régulateur Rv1556 est fixé sur la région promotrice des gènes *rv1556* et *mmpS6/L6*, ce qui entraîne la répression transcriptionnelle de ces deux gènes.

Nous avons émis l'hypothèse que le locus TbD1 pourrait être impliqué dans la formation des DCTB, ce qui expliquerait la différence entre *M. tb* H37Rv et L1-500960 pour ce phénotype.

II. Phénotypes associés au locus TbD1

A. Description des souches bactériennes

Afin d'évaluer l'implication fonctionnelle du locus TbD1 dans le phénotype DCTB, nous avons utilisé différentes constructions génétiques dans deux souches de *Mycobacterium tuberculosis*, *M. tb* 79112 et *M. tb* H37Rv, issues des lignées 1 et 4 respectivement (**Figure 50**). Toutes ces constructions nous ont été gracieusement fournies par le Dr Roland Brosch, (CNRS-UMR6047) et la Dr Daria Bottai (Université de Pise). Concernant *M. tb* 79112, qui possède naturellement le locus TbD1 dans son génome, une délétion de cette région correspondant à celle retrouvée chez *M. tb* H37Rv a été effectué dans la souche nommée *M. tb* 79112ΔTbD1. Cette dernière a été complémentée avec un cosmide comportant TbD1, appelée ci-après *M. tb* 79112ΔTbD1-c. Concernant *M. tb* H37Rv, qui est naturellement dépourvue du locus TbD1, une complémentation avec le cosmide comportant TbD1 a été construite et sera nommée *M. tb* H37Rv-c [51].

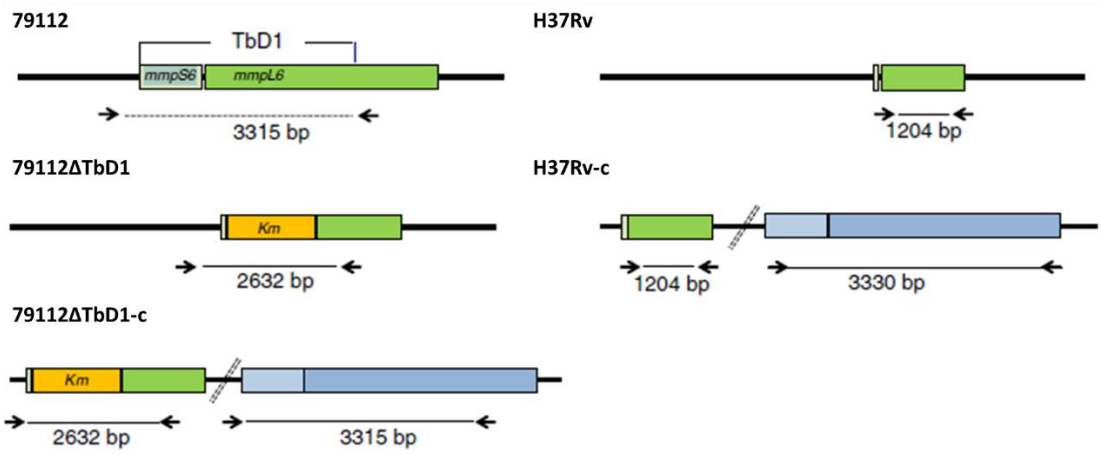


Figure 50 : Représentation schématique de l'organisation du locus TbD1 chez les mutants utilisés dans cette étude.
En vert, le gène *mmpL6*, en jaune la cassette antibiotique permettant la résistance à la Kanamycine et en bleu le cosmide contenant la séquence TbD1 ainsi qu'une résistance à l'hygromycine. Km : kanamycine. [51]

Nous disposons donc d'un panel de souches isogéniques différant uniquement par la présence ou l'absence du locus TbD1, et ce dans les deux contextes génétiquement distinct de lignée 1 et de lignée 4 (**Figure 51**). Cette approche de génétique comparative a pour objectif de discriminer les effets phénotypiques attribuables au *background* génétique de chaque lignée, de ceux spécifiquement liés aux gènes *mmps6/mmpL6*.

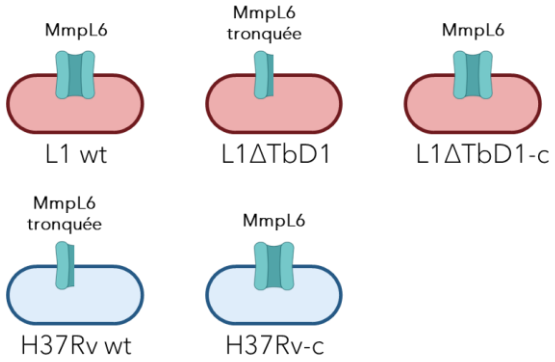


Figure 51 : Représentation phénotypique des souches de *M. tb* 79112 et H37Rv possédant ou non le locus TbD1

B. Influence du locus TbD1 sur le phénotype DCTB

Les différentes souches décrites précédemment ont été testées pour leur capacité à entrer dans un état DCTB. Après dilution des cultures en phase exponentielle de croissance, chaque souche a été inoculée à 10^5 bactéries/ml et incubée pendant 28 jours en présence ou en absence de CF. Dans le milieu sans CF, les 3 souches porteuses du locus TbD1 intact (*M. tb* 79112, 79112ΔTbD1-c et H37Rv-c) présentent une incapacité de croissance dans

le milieu sans CF (**Figure 52**). Leur croissance est cependant restaurée en présence de 50% de CF. À l'inverse, les souches naturellement (H37Rv) ou artificiellement (79112ΔTbD1) délétées pour le locus TbD1 n'entrent pas en état DCTB et maintiennent un niveau de croissance comparable en présence ou en absence de CF. Ces résultats démontrent que la présence du locus TbD1 est nécessaire et suffisante pour faciliter la transition vers l'état DCTB,

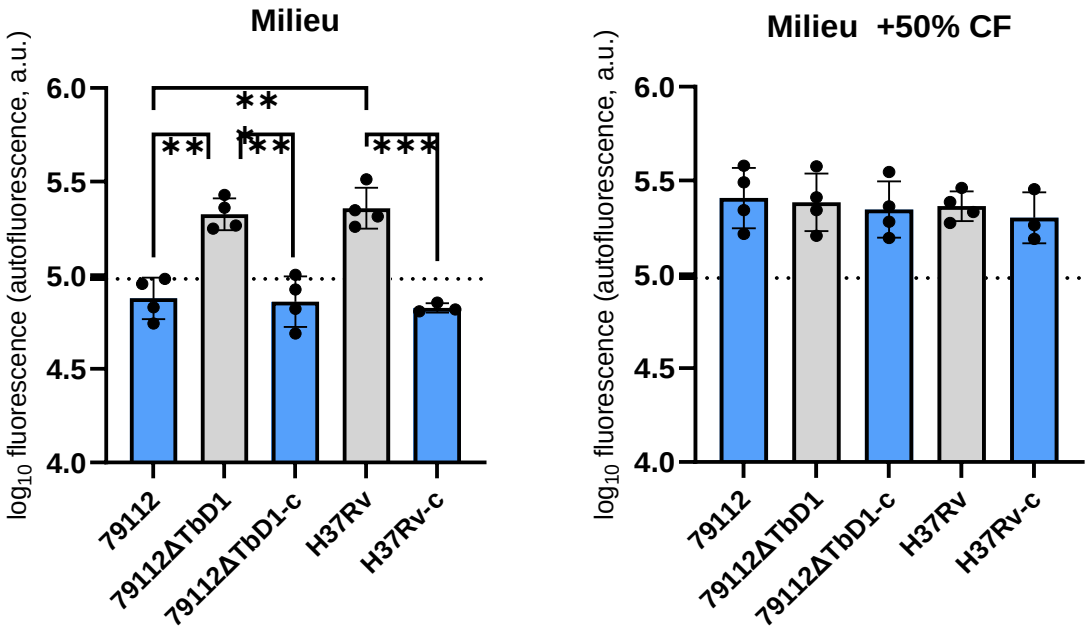


Figure 52 : Induction du phénotype DCTB par les souches 79112 et H37Rv possédant ou non le locus TbD1.
Des cultures en milieu 7H9-OADC de *M. tuberculosis* 79112, 79112ΔTbD1, 79112ΔTbD1-c, H37Rv et H37Rv-c ont été dilués à 10^5 bactéries/mL, puis cultivée dans un milieu 7H9-OADC (gauche), ou dans un milieu 7H9-OADC additionné de 50% de surnageant de culture (CF) généré par une culture de *M. tuberculosis* H37Rv dans ce même milieu (droite). L'intensité d'auto-fluorescence a été mesurée à 475 nm après 28 jours d'incubation. Les données sont présentées sous forme de moyenne ± écart-type de trois ou quatre réplicats biologiques. La ligne pointillée représente le seuil de croissance positive, calculé comme suit : ($médiane_{milieu}$ + 3*SEM_{milieu})*2. L'analyse statistique a été réalisé à l'aide d'une ANOVA à deux facteurs suivi d'un test post-hoc de Zidak : **, $p < 0,0001$; ***, $p < 0,00001$.

Étant donné que la présence du locus TbD1 a un impact sur l'induction du phénotype DCTB, nous avons cherché à étendre cette observation à d'autres souches du *Mycobacterium tuberculosis* complex. Nous avons reproduit le test avec plusieurs souches représentatives : *M. tb* L1-500961, H37Rv, ainsi que la souche Beijing (lignée 2) et *Mycobacterium africanum* (lignée 5). Ces deux dernières souches se distinguent respectivement par l'absence (Beijing) et la présence (*M. africanum*) du locus TbD1 sous sa forme entière. Les différentes souches ont été testées pour leur capacité à induire le phénotype DCTB après dilution d'une culture en phase exponentielle à 10^5 bactéries/mL

dans un milieu 7H9-Glucose. Les cultures ont été effectuées en présence ou en absence d'une supplémentation de 50% de CF et 10% d'OADC, puis incubées pendant 21 jours (**Figure 53**). L'utilisation des deux facteurs de réveil a pour but d'induire un réveil maximum, car nous ne connaissons la capacité de réveil d'un surnageant produit chez *M. tb* H37Rv sur les nouvelles souches testées. Les souches *M. tb* L1-500960 et *M. africanum* cultivées à faible inoculum sont incapables de se répliquer dans le milieu seul, et leur réplication est bien restaurée en présence de CF + OADC. Dans ces deux mêmes conditions, les deux souches délétées pour le locus TbD1, *M. tb* H37Rv et Beijing, restent dans un état réplicatif, avec ou sans CF + OADC.

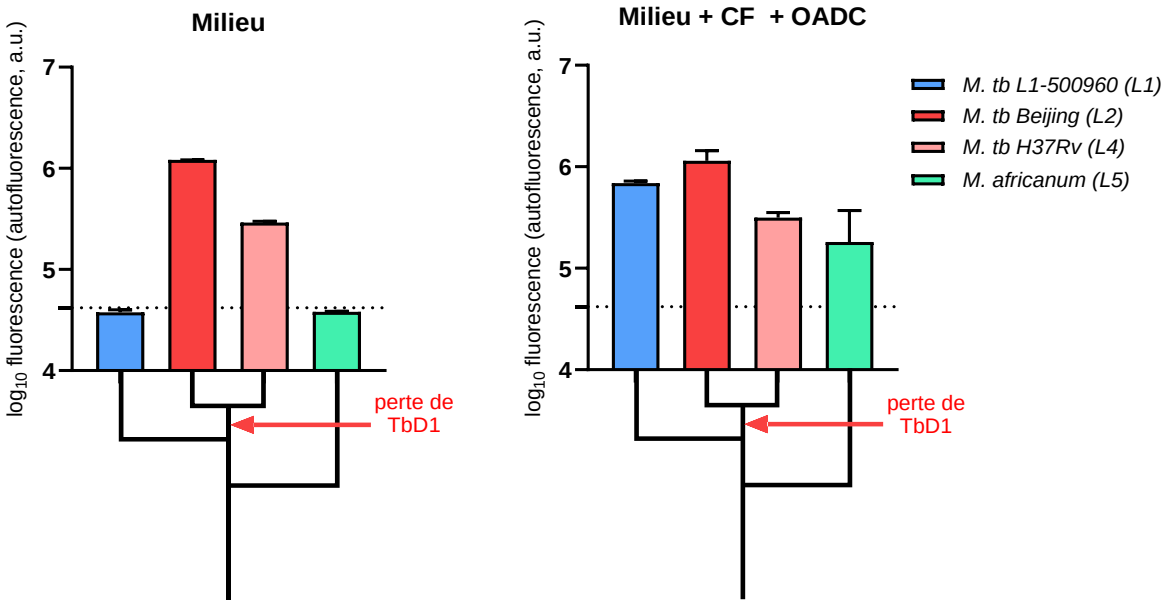


Figure 53 : Induction du phénotype DCTB chez des souches appartenant à différentes lignées du MTBC.
Des cultures en milieu 7H9-Glucose de *M. tuberculosis* L1-500960, Beijing, H37Rv et *M. africanum* ont été dilués à 10^5 bactéries/mL, puis cultivée dans un milieu 7H9-Glucose (gauche), ou dans un milieu 7H9-Glucose additionné de 10% d'OADC et 50% de surnageant de culture (CF) (droite), généré par une culture de *M. tuberculosis* H37Rv dans ce même milieu. L'intensité d'auto-fluorescence a été mesurée à 475 nm après 21 jours d'incubation. Les données sont présentées sous forme de moyenne + écart-type de deux réplicats biologiques. La ligne pointillée représente le seuil de croissance positive, calculé comme suit : $(\text{médiane}_{\text{ctlr.négatif}} + 3*\text{SEM}_{\text{ctlr.négatif}})*2$.

L'ensemble de ces résultats met en évidence le rôle du locus TbD1 dans la capacité de formation du phénotype DCTB caractérisé dans ce travail. Les souches appartenant aux lignées ancestrales (lignées 1 et 5), qui ont conservé le locus TbD1 intact, apparaissent ainsi plus sensibles à la transition vers un état non cultivable lorsqu'elles sont cultivées à faible densité. Cette caractéristique pourrait constituer un trait adaptatif permettant l'entrée dans un état non ou faiblement réplicatif en conditions de limitation

nutritionnelle ou de faible charge bacillaire, reflétant potentiellement des stratégies de persistance développées, puis mises de côté, au cours de l'évolution de *M. tb*.

C. Influence du locus TbD1 sur la résistance aux antibiotiques

Le locus TbD1 code pour MmpS6, dont la fonction reste encore inconnue, et la pompe d'efflux MmpL6. Chez *M. tuberculosis*, une pompe d'efflux homologue de la même famille RND, MmpL5, est impliquée dans l'export de certains antibiotiques [321]. Cette fonction d'efflux de composés antimicrobiens apparaît conservée chez *Mycobacterium abscessus*, une espèce phylogénétiquement apparentée, chez laquelle certains antibiotiques modulent l'expression de la pompe homologue en levant la répression transcriptionnelle médiée par des répresseurs de type TetR [64]. Par ailleurs, il est bien établi que l'entrée en état non réplicatif induit une tolérance accrue aux antibiotiques [283]. Dans ce contexte, il nous a paru intéressant d'examiner si MmpL6 pouvait jouer un rôle analogue en exportant directement des antibiotiques, induisant ainsi une résistance aux antibiotiques.

Pour tester cette hypothèse, nous avons évalué la sensibilité de quatre souches isogéniques (*M. tb* 79112, 79112ΔTbD1, H37Rv et H37Rv-c) à un panel de 28 antibiotiques représentant diverses classes thérapeutiques. Bien que des variations mineures de CMI aient été observées entre les souches 79112 et H37Rv, aucune corrélation n'a été observée avec la présence ou l'absence du locus TbD1 (**Tableau 4**), réfutant ainsi un rôle direct de MmpL6 dans l'efflux de ces antibiotiques.

Tableau 4 : Détermination de la sensibilité aux antibiotiques de *M. tb* 79112 et H37Rv possédant ou non le locus TbD1.
Les souches *M. tb* 79112, 79112ΔTbD1, H37Rv et H37Rv-c ont été exposées à différents antibiotiques pendant 7 jours, puis l'intensité de l'auto-fluorescence représentative de la croissance a été mesurée à 475 nm. La CMI a été déterminée comme la première concentration d'antibiotique à laquelle aucune croissance n'a été détectée. ND : Non déterminé.

	CMI en mM			
Antibiotiques	**79112**	**79112ΔTbD1**	**H37Rv**	**H37Rv-c**
Acide nalidixique	1,00E-01	1,00E-01	1,00E-01	1,00E-01
Bédaquiline	6,25E-05	6,25E-05	2,50E-04	2,50E-04
Chloramphénicol	3,13E-03	3,13E-03	1,56E-03	1,56E-03
Ciprofloxacine	3,13E-04	3,13E-04	3,13E-04	3,13E-04
D-cyclosérine	6,25E-03	6,25E-03	1,25E-02	1,25E-02
Erythromycine	1,00E-02	1,00E-02	ND	ND

Ethambutol	3,91E-04	3,91E-04	7,81E-04	7,81E-04
Ethionamide	7,81E-05	7,81E-05	6,25E-04	6,25E-04
Gentamycine	2,50E-03	2,50E-03	2,50E-03	2,50E-03
Hygromycine	1,56E-03	1,56E-03	1,56E-03	1,56E-03
Linézolide	3,13E-04	6,25E-04	6,25E-04	6,25E-04
Moxifloxacine	1,56E-04	1,56E-04	1,56E-04	1,56E-04
Polymyxine B	5,00E-02	5,00E-02	1,00E-01	1,00E-01
Prétomanide	6,25E-04	6,25E-04	1,56E-04	1,56E-04
Pyridomycine	6,25E-04	6,25E-04	6,25E-04	6,25E-04
Tétracycline	5,00E-03	5,00E-03	1,00E-02	1,00E-02
Vancomycine	1,56E-03	1,56E-03	1,56E-03	1,56E-03

III. Régulation transcriptionnelle de *mmpL6*

Les gènes *mmpS6* et *mmpL6* sont contrôlés par le régulateur transcriptionnel Rv1556, appartenant à la famille TetR [56]. Les régulateurs de type TetR sont des répresseurs transcriptionnels, qui inhibent la transcription de leur gène cible en se fixant sur leur région promotrice. La fixation d'un ligand entraîne un changement conformationnel du répresseur, ce qui empêche son interaction avec l'ADN et lève la répression [65]. Dans un travail indépendant mené au sein du laboratoire, une famille de molécules a été identifiée comme inducteurs spécifiques de la surexpression de *mmpL6*. Cette famille de composés constitue ainsi un outil de choix pour étudier plus en détail les conséquences phénotypiques de la régulation de *mmpL6* dans le contexte des lignées ancestrales. Un représentant de cette famille, le composé BDM88496 a été utilisé dans ce projet (**Figure 54**).

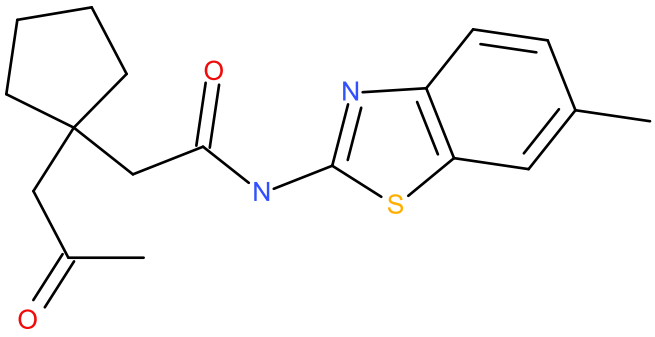


Figure 54 : Structure de BDM88496.

A. Régulation de Rv1556 par BDM88496

Dans un premier temps, nous avons quantifié l'induction transcriptionnelle de *mmpS6* et *mmpL6* en présence de BDM88496. Pour cela, *M. tb* L1-500960 a été incubée pendant 24h avec le composé à une concentration de 10 µM, puis l'expression des deux gènes a été évaluée par RT-qPCR. L'effet de BDM88496 est particulièrement marqué, avec une induction supérieure à 40 fois de *mmpS6* et *mmpL6* par rapport à la condition témoin en présence de DMSO (**Figure 55**). Ces tests ont également été effectués chez les souches *M. tb* H37Rv et H37Ra. Malgré un gène *mmpL6* tronqué dans ces souches, due à la délétion TbD1, une surexpression transcriptionnelle similaire du gène *mmpL6* résiduel a été observée, suggérant que la séquence promotrice et les éléments de régulation transcriptionnelle demeurent fonctionnels et accessibles à la modulation par BDM88496, indépendamment du statut de la protéine codée.

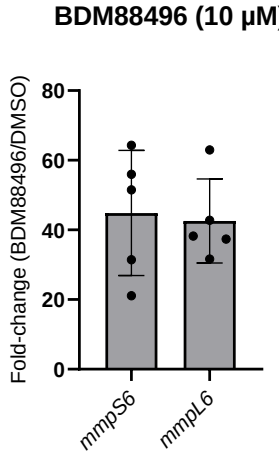


Figure 55 : Surexpression des gènes *mmpS6* et *mmpL6* chez *M. tb* L1-500960 en présence de BDM88496.
M. tb L1-500960 a été cultivé pendant 24h en présence de BDM88496 ou de DMSO. L'expression des gènes *mmpS6* et *mmpL6* en présence du composé a été évaluée par RT-qPCR après extraction de l'ARN total puis doublement normalisée par l'expression du gène de ménage *sigA* et la condition DMSO selon la méthode du $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Les données sont présentées sous forme de moyenne ± écart-type de cinq réplicats biologiques.

Dans l'objectif de confirmer l'action spécifique de BDM88496 sur le régulateur Rv1556, nous avons cherché à mettre en évidence une interaction directe entre cette molécule et la protéine purifiée. Une expérience de TSA (*Thermal Shift Assay*) a été réalisée pour évaluer quantitativement cette interaction protéine-ligand. Cette technique biophysique repose sur la mesure de la température de dénaturation (Tm, *melting temperature*) de la protéine. La liaison d'un ligand spécifique induit généralement une augmentation du Tm par stabilisation de la conformation de la protéine. Dans nos conditions expérimentales,

le Tm de la protéine Rv1556 seule s'établit à 69,58°C. Cette valeur de référence présente un décalage dose-dépendant en présence de BDM88496 : ΔTm d'environ +3°C à 10 µM et +5°C à 50 µM de composé (**Figure 56**). Cette stabilisation thermique constitue la preuve directe d'une interaction spécifique entre Rv1556 et BDM88496.

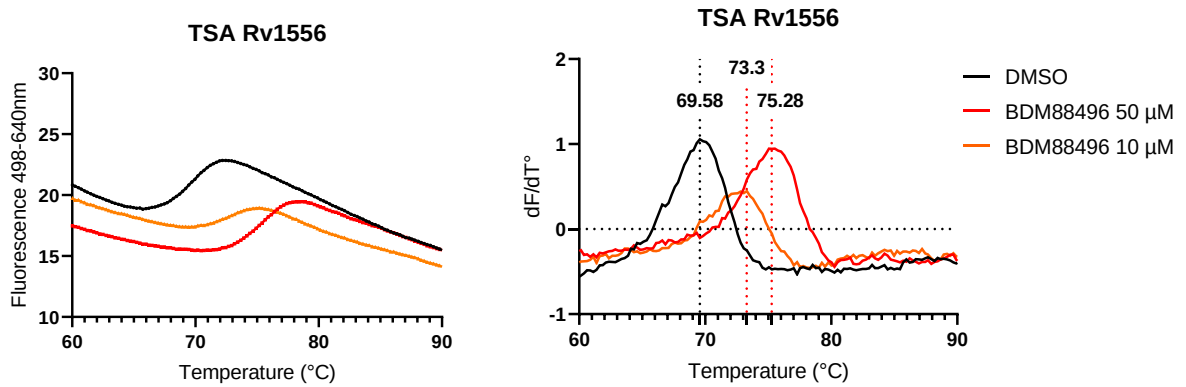


Figure 56 : Détermination de l'interaction entre Rv1556 et BDM88496 par un test de TSA.
La protéine Rv1556, à une concentration de 10 µM, est incubée seule ou en présence de BDM88496 à 10 ou 50 µM pendant au moins 15 min, puis la sonde SYPRO orange est ajouté. La fluorescence (Ex498-Em640) de la sonde en fonction de la température est mesurée (gauche). Les dérivées premières des courbes sont calculées pour déterminer la température de dénaturation Tm (droite). Ces résultats sont représentatifs de 3 réplicats biologiques.

BDM88496 interagit directement avec Rv1556, et sa présence induit la surexpression de son régulon. La dernière étape pour élucider le mécanisme moléculaire induisant cet effet consiste à démontrer que la fixation du composé sur Rv1556 réduit son affinité pour la région promotrice de l'opéron *mmpS6/mmpL6*, entraînant ainsi une levée de la répression transcriptionnelle et, par conséquent, une induction de l'expression génique. Afin de tester cette hypothèse, nous avons réalisé une expérience de retard sur gel (EMSA : *Electrophoretic Mobility Shift Assay*) pour évaluer l'affinité de Rv1556 pour la région promotrice de *mmpS6/L6* en présence ou en absence de BDM88496.

La région promotrice utilisée, d'une longueur de 36 paires de bases, correspond à un motif consensus situé en amont de *rv1556* et de l'opéron *mmpS6/L6*. Rv1556 a été incubée en présence de cet ADN promoteur, avec ou sans BDM88496. La protéine Rv1556 purifiée a été incubée en présence de cet ADN promoteur, avec ou sans BDM88496. En présence de la protéine seule, un retard de migration électrophorétique de l'ADN est observé, traduisant la formation d'un complexe protéine-ADN stable. Lorsque BDM88496 est ajouté au mélange réactionnel, l'intensité de la bande correspondant à ce complexe est réduite de moitié (**Figure 57**). Cette expérience confirme la liaison spécifique de Rv1556

sur cette région promotrice, et montre que cette interaction est inhibée par BDM88496, validant le mécanisme de dérépression transcriptionnelle proposé (**Figure 58**).

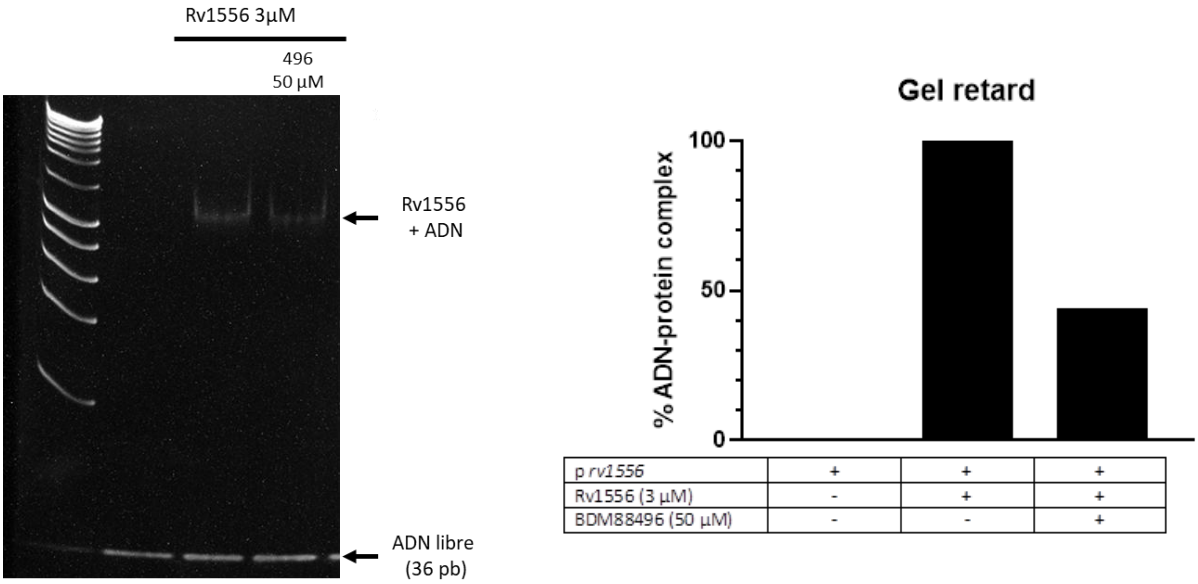


Figure 57 : Gel-retard montrant l'interaction entre Rv1556 et la région promotrice de son régulon.
La protéine Rv1556, à une concentration de 3 µM, est incubée pendant 5 min avec ou sans BDM88496 à 50 µM. L'ADN de la région promotrice de *rv1556* est ensuite ajouté à une concentration de 1 µM et incubé pendant 25 min. Les différents échantillons ont migré sur un gel de polyacrylamide, et l'ADN a été révélée après immersion dans du bromure d'éthidium (BET) (gauche). L'intensité des bandes correspondant au complexe Rv1556 + ADN a été mesurée à l'aide du logiciel ImageJ (droite). Les résultats sont normalisés par rapport à l'ADN seul (0%) et Rv1556 + ADN (100%).

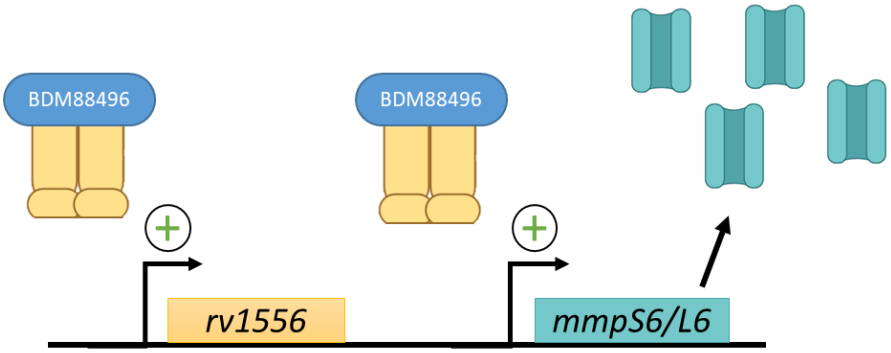


Figure 58 : Schéma représentant la régulation de *rv1556* et *mmpL6*, en présence du répresseur BDM88496.
Le ligand chimique BDM88496 interagit avec le répresseur transcriptionnel Rv1556, ce qui empêche la fixation de ce dernier sur la région promotrice de *rv1556* et *mmpS6/L6*. Dans cette configuration, l'expression de ces deux gènes est régulée de manière positive, ce qui entraîne la surexpression de la pompe d'efflux MmpL6.

B. Impact de la surexpression de *mmpL6* sur le phénotype DCTB

Nous avons montré qu'une délétion du locus TbD1 diminue la capacité des bacilles à induire le phénotype DCTB. Le composé BDM88496 capable d'induire la surexpression de *mmpL6*, fournit donc un outil précieux pour disséquer cette interrelation.

Les souches *M. tb* L1-500960 et H37Rv ont été amenées au phénotype DCTB, en diluant une culture en fin de phase exponentielle de croissance à un inoculum de 10^5 bactéries/mL. Ces dilutions ont été cultivées dans du milieu frais, en présence ou non de BDM88496 (10 µM) et de concentrations croissantes de CF. La cinétique de réveil a été quantifiée après 21 jours de culture.

En absence de BDM88496, et conformément à nos précédentes observations, les DCTB formés chez *M. tb* L1-500960 présentent une intensité de réveil corrélée à la concentration en CF ajoutée (**Figure 59A**). Cependant, la présence de BDM88496 maintien *M. tb* L1-500960 dans un état de non cultivable, réfractaire au réveil, jusqu'à une concentration de 50% de CF. Plus important, aucune influence de BDM88496 dans la capacité de réveil n'est observée concernant les DCTB générés chez *M. tb* H37Rv (**Figure 59B**).

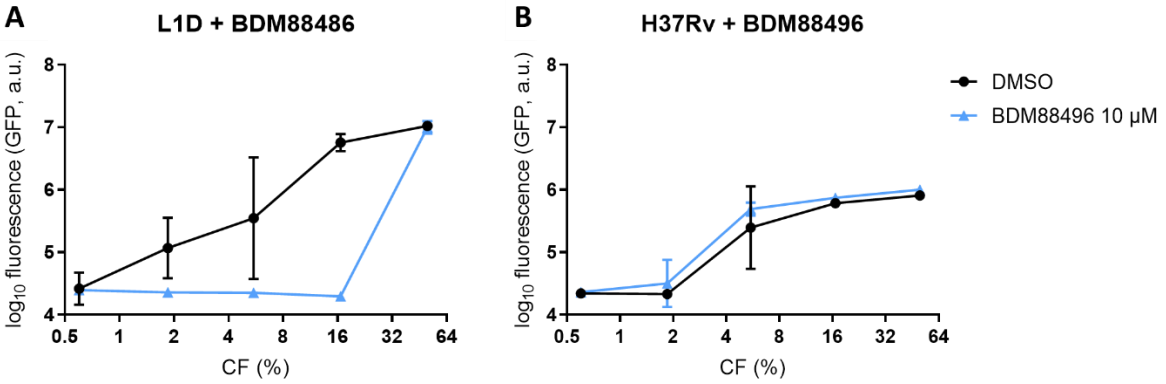


Figure 59 : Dose-réponse du réveil par le surnageant des DCTB générés chez *M. tb* L1-500960 ou H37Rv, avec ou sans BDM88496.
Des cultures en milieu 7H9-OADC de *M. tuberculosis* L1-500960 (A) ou H37Rv (B) ont été dilués à 10^5 bactéries/mL, puis cultivée dans ce même milieu en présence de différentes concentrations de surnageant de culture (CF) généré par une culture de *M. tuberculosis* H37Rv en 7H9-OADC. L'intensité de fluorescence de la GFP été mesurée après 21 jours d'incubation. Les données sont présentées sous forme de moyenne ± écart-type de six réplicats techniques.

En résumé, nous avons d'une part montré que MmpS6/L6 joue un rôle dans la modulation du réveil des souches ancestrales de *Mycobacterium tuberculosis* médié par le CF (Chapitre 3 II.B). Ce phénomène est amplifié expérimentalement par l'action de

BDM88496 qui, via l'inhibition de Rv1556, induit la surexpression de l'opéron *mmpS/L6,* atténuant alors la capacité du CF à déclencher le réveil de ces souches.

IV. Recherche d'un substrat naturel de MmpL6

La pompe d'efflux MmpL6 apparaît, d'après les résultats de notre étude, impliquée dans l'induction ou le maintien de l'état DCTB chez les souches de *M. tb* L1-500960. Bien qu'elle ne soit probablement pas le seul facteur qui influence ce phénotype, caractériser son rôle pourrait fournir de précieuses informations sur le fonctionnement de notre modèle. D'un point de vue épidémiologique, la perte du locus TbD1 pourrait avoir joué un rôle important dans l'évolution des lignées modernes de *Mycobacterium tuberculosis,* qui sont les plus disséminées dans le monde [42]. Puisque MmpL6 est une pompe d'efflux, son rôle vis-à-vis du phénotype DCTB pourrait vraisemblablement être lié à l'export de molécules. C'est cette hypothèse que nous avons cherché à explorer dans cette partie.

A. Cytokinines

Dans la littérature, une molécule a été décrite comme capable d'induire la surexpression de *mmpL6*. Il s'agit d'une cytokinine, le N^6-(2-Isopentenyl)adenine (2iP) (**Figure 60**) [322]. Les cytokinines constituent une famille de molécules retrouvées principalement chez les plantes, où elles jouent un rôle de signalisation régulant la croissance cellulaire, ainsi que chez les bactéries phytopathogènes [323]. Elles ont également été décrites chez des bactéries non phytopathogènes [324], leur rôle restant méconnu dans ces espèces. Il a récemment été montré que *M. tb* est capable de produire des cytokinines [325]. Ces molécules ont été retrouvées à la fois dans le lysat cellulaire et le surnageant de culture, et leur action a été associée à des modifications de la paroi bactérienne, ainsi qu'à une sensibilisation accrue de *M. tuberculosis* au cuivre et au stress oxydant [322,325,326].

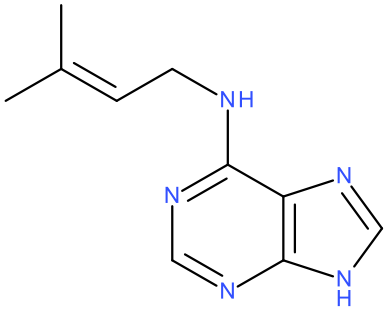


Figure 60 : Structure de la cytokinine N^6-(2-Isopentenyl)adenine (2iP).

Tout d'abord, nous avons confirmé la surexpression de *mmpL6* chez *M. tb* L1-500960, suite à un traitement de 24h au 2iP à la concentration de 100 µM, identique à celle utilisée dans les études mentionnées ci-dessus (**Figure 61**). Son activité sur l'expression de *mmpL6* est globalement similaire à celle que l'on retrouve avec BDM88496, à une dose cependant 10 fois plus élevée. Le 2iP ne semble, en revanche, pas modifier l'expression de *rv1556*, à l'instar du ligand chimique, certainement dû au mécanisme auto-répresseur de la protéine Rv1556 une fois traduite.

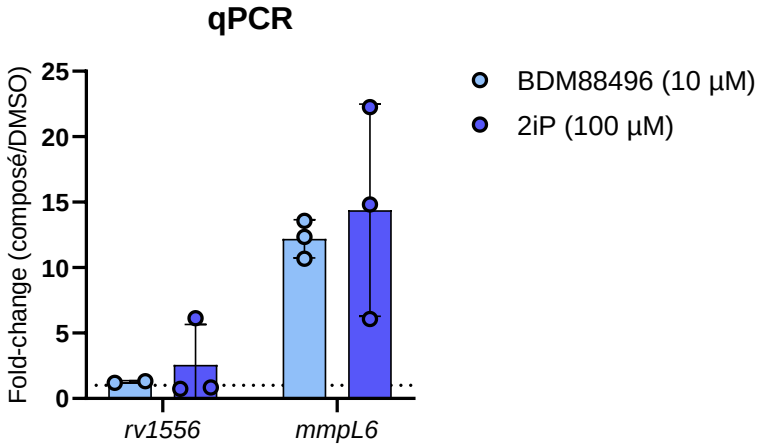


Figure 61 : Expression des gènes *rv1556* et *mmpL6* en présence de 2iP et BDM88496.
M. tb L1-500960 a été cultivé pendant 24h en milieu 7H9-OADC, en présence de BDM88496 (10 µM), de 2iP (100 µM) ou de DMSO. Les ARN ont été extraits, et l'expression de *rv1556* et *mmpL6* a été évaluée par RT-qPCR, rapportée à l'expression du gène de ménage *sigA* et à la condition DMSO selon la méthode du $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Les données sont présentées sous forme de moyenne ± écart-type de trois réplicats biologiques.

Compte tenu de son effet sur l'expression de *mmpL6*, la cytokinine 2iP pourrait être un ligand naturel potentiel de Rv1556. Nous avons réalisé un test de TSA pour évaluer une éventuelle interaction directe entre Rv1556 et 2iP. La protéine Rv1556 a été incubée en présence de différentes concentrations en 2iP ainsi que du composé chimique BDM88496 à 50 µM utilisé comme contrôle positif. Comme observé dans les précédentes expériences, la présence du BDM88496 entraine un décalage du Tm de +4°C, par rapport à la protéine non traitée. Cependant, aucune différence de Tm n'a été détectée en présence de 2iP à 1, 10 ou 100 µM par rapport cette même condition contrôle (**Figure 62**). Ainsi, aucune interaction directe entre Rv1556 et la cytokinine 2iP n'est mise en évidence par cette approche.

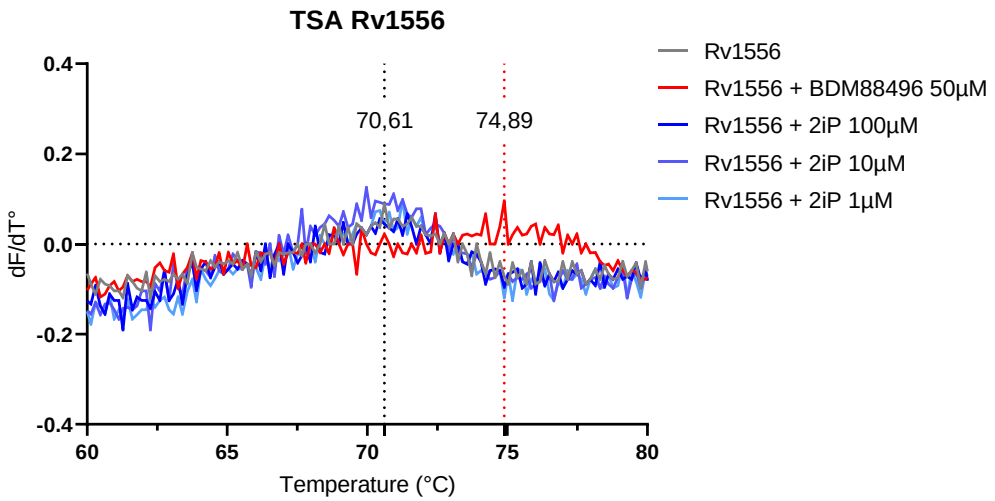


Figure 62 : Détermination de l'interaction entre Rv1556 et la cytokinine 2iP par TSA
La protéine Rv1556, à une concentration de 10 µM, a été incubée pendant 15 min seule ou en présence de différentes concentrations en 2iP. Une condition en présence de BDM88496 à 50 µM a également été réalisée. Puis, la sonde SYPRO orange a été ajoutée. Les dérivées premières des courbes d'intensité de fluorescence (Ex498-Em640) de la sonde en fonction de la température sont calculées pour déterminer la température de fusion Tm.

La cytokinine 2iP induit une surexpression de *mmpL6* mais ne semble pas être un ligand de Rv1556. Ainsi, son impact sur la régulation de *mmpL6* est probablement indirect, le traitement au 2iP entrainant possiblement la production d'intermédiaires, dont le ligand naturel de Rv1556.

B. Molécules du surnageant de culture

1. Hypothèses

Dans la première partie de ce projet (Chapitre 1), nous avons montré que le réveil des DCTB peut être induit par des molécules présentes dans le CF. La concentration de ces facteurs de réveil, modulée par la densité bactérienne et par la dilution du surnageant, semble déterminante pour l'induction de la réplication des DCTB. En revanche, le réveil des DCTB est atténué en présence du locus TbD1, et encore plus lorsque ce dernier est surexprimé, liant possiblement ces deux phénomènes.

L'expression du locus TbD1 est régulée par le répresseur transcriptionnel Rv1556 Rv1556, appartenant à la famille des TetR. Les régulateurs TetR sont largement retrouvés chez les procaryotes. D'ailleurs, plusieurs systèmes d'efflux (AcrAB-TolC chez *Escherichia coli*, QacA chez *Staphylococcus aureus*, TcmA chez *Streptomyces glaucescen,* ScbA chez *Streptomyces coelicolor*, MmpS5/L5 chez *Mycobacterium abscessus*) sont sous le contrôle

d'un régulateur de la famille des TetR et le ligand de ce dernier correspond généralement au substrat exporté par la pompe associée [64,65]. Par analogie avec ces systèmes, nous avons émis l'hypothèse que le ligand naturel de Rv1556 pourrait être une des molécules présentes dans le surnageant de culture. Ces données nous ont permis de formuler différentes hypothèses sur la régulation de l'état réplicatif par MmpL6 (**Figure 63**).

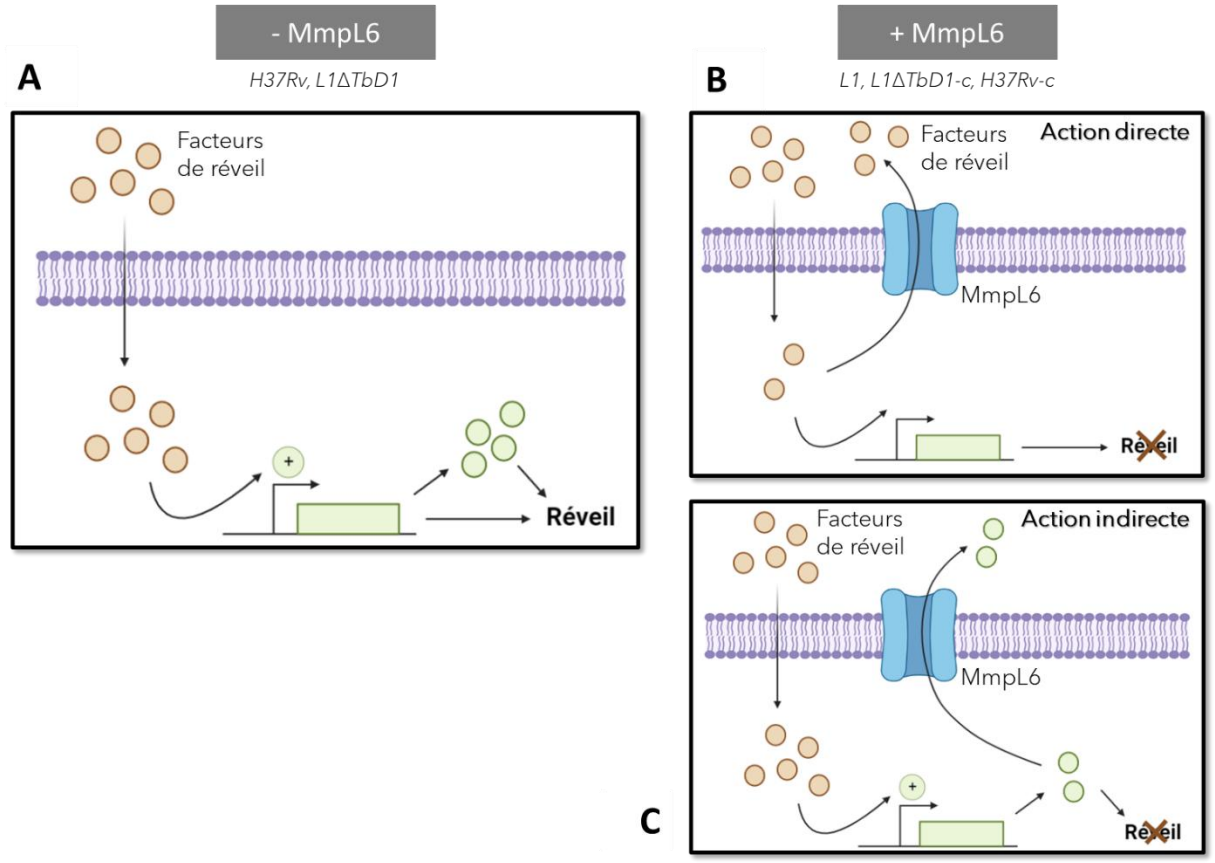


Figure 63 : Hypothèses concernant la régulation de l'état réplicatif de *M. tb* par MmpL6 en présence de surnageant

En l'absence de la forme entière de MmpL6, comme dans les souches *M. tb* H37Rv ou 79112ΔTbD1, la densité bactérienne doit être diminuée pour pouvoir former des DCTB. Nous proposons que les facteurs de réveil produits par *M. tb* dans le surnageant puissent pénétrer dans les bacilles. À partir d'une concentration seuil, ils pourraient constituer un signal déclencheur, induisant directement ou par l'intermédiaire de cascades de signalisation le réveil de *M. tb* (**Figure 63A**).

En présence de la forme entière de MmpL6, comme chez *M. tb* L1-500960, 79112, 79112ΔTbD1-c et H37Rv-c, des DCTB peuvent être formés à des densités bactériennes plus élevées, et leur réveil nécessite une dose de surnageant supérieure lorsque *mmpL6*

est surexprimée. Deux hypothèses peuvent être proposées pour expliquer ce phénomène :

- Hypothèse d'action directe : la pompe MmpL6 pourrait exporter les facteurs de réveil, ce qui limiterait leur accumulation intracellulaire, donc l'activation de la signalisation conduisant au réveil des DCTB (**Figure 63B**).
- Hypothèse d'action indirecte : les facteurs de réveil s'accumuleraient dans les bacilles et activeraient la cascade de signalisation, produisant des effecteurs intermédiaires. Ces effecteurs seraient alors exportés par MmpL6, limitant la capacité des bactéries à sortir de l'état DCTB (**Figure 63C**).

2. Liaison entre Rv1556 et des molécules du CF

Nous avons exploré l'hypothèse d'une action directe des facteurs de réveil sur la régulation de MmpL6, qui est la plus facile à étudier expérimentalement. Nous avons recherché une interaction directe entre des molécules du surnageant et Rv1556. Ainsi, du surnageant de culture dans un milieu 7H9-OADC a été produit chez *M. tb* H37Ra, pour des raisons de facilité et de risque biologique. Le surnageant a été traité à l'acétonitrile, afin de précipiter les protéines et en particulier de la BSA présente dans le milieu, puis centrifugé pour récupérer la fraction soluble. Ce surnageant a été concentré d'un facteur 1 000 par centrifugation sous vide (SpeedVac™). Une première re-suspension dans l'eau a permis d'obtenir une fraction hydrosoluble. La fraction insoluble restante a été re-suspendue dans du DMSO.

Ces deux fractions ont été diluées puis mises en contact avec Rv1556, puis soumises à un test d'interaction (TSA). Une condition contrôle avec Rv1556 en présence du ligand chimique BDM88496 à 10 ou 50 µM a également été réalisée. Les résultats du TSA montrent qu'en présence de la fraction insoluble, Rv1556 est totalement dénaturée, ce qui peut être expliqué par une concentration trop importante en molécules, la présence de détergent utilisé dans le milieu de culture (Tween 80) ou de composants déstabilisants concentrés dans cette fraction (**Figure 64**). À l'inverse, le test d'interaction réalisé en présence de la fraction hydrosoluble montre une augmentation de la température de dénaturation (Tm) d'environ 3°C, similaire à celle obtenue en présence du ligand

chimique à 10 µM. Ces données suggèrent la présence d'un ligand putatif de Rv1556 dans la fraction hydrosoluble du surnageant concentré.

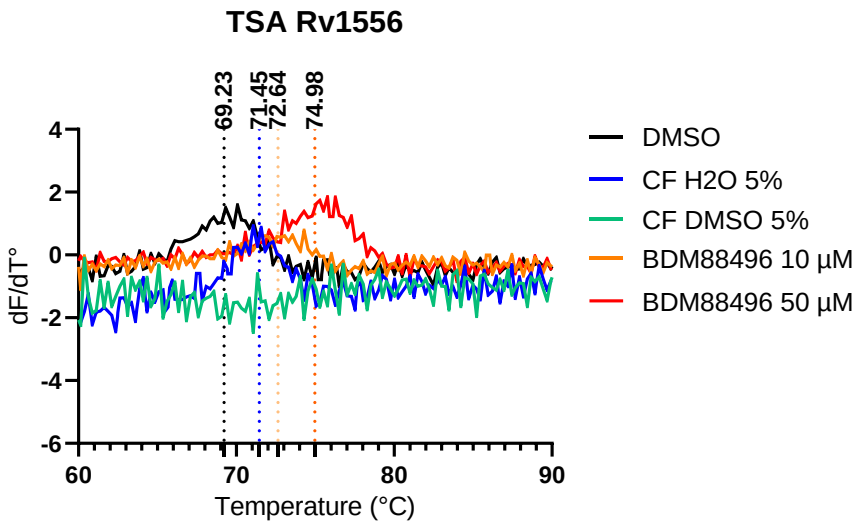


Figure 64 : Détermination de l'interaction entre Rv1556 et des molécules du surnageant par un TSA. La protéine Rv1556 a été incubée pendant 15 min à une concentration de 10 µM seule ou en présence de 5% des fractions solubles (CF H2O) ou insolubles (CF DMSO) issus du surnageant d'une culture de H37Ra concentrée. Une condition en présence de BDM88496 à 10 ou 50 µM a également été réalisée. Puis, la sonde SYPRO orange a été ajoutée. Les dérivées premières des courbes de fluorescence (Ex498-Em640) de la sonde en fonction de la température ont été calculées pour déterminer la température de fusion Tm.

Ensuite, nous avons cherché à confirmer que l'interaction entre des molécules du surnageant et Rv1556 empêche la fixation de ce dernier sur sa région promotrice. Une expérience de retard sur gel a été réalisée en présence de Rv1556, le motif consensus de la région promotrice de *rv1556* et différentes concentrations de la fraction hydrosoluble du surnageant concentré. Une condition contrôle en présence du ligand chimique BDM88496 a également été réalisée. Comme attendu, l'ajout de BDM88496 à une concentration de 50 µM a entraîné une inhibition d'environ 50% de la liaison de Rv1556 à sa région promotrice (**Figure 65**). En revanche, l'ajout de la fraction soluble a donné des effets incohérents sur la liaison de Rv1556 à l'ADN en fonction des concentrations. Cette variabilité des effets pourrait être liée à des interactions aspécifiques dues à la complexité et à la concentration du mélange de molécules présentes dans la fraction hydrosoluble du surnageant concentré. En outre, il manque à cette expérience une condition contrôle correspondant au milieu 7H9-OADC, préparé dans les mêmes conditions que le CF.

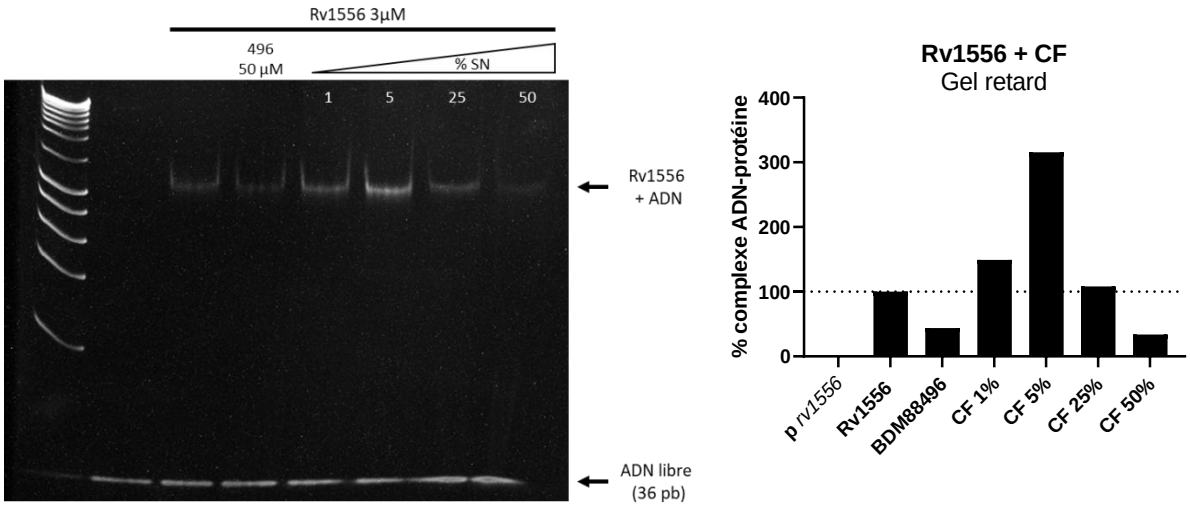


Figure 65 : Gel-retard montrant la fixation de Rv1556 sur son régulon en présence de la fraction soluble du surnageant.
La protéine Rv1556 a été incubée pendant 5 min à une concentration de 3 µM seule ou en présence de différentes concentrations de la fraction soluble issue du surnageant d'une culture de H37Ra concentrée. Une condition en présence de BDM88496 à 50 µM a également été testée. L'ADN de la région promotrice de *rv1556* a été ajouté à une concentration de 1 µM au mix, et l'ensemble a été incubé pendant 25 min. Les différents échantillons ont migré sur un gel de polyacrylamide, puis l'ADN a été révélé après immersion dans du BET (gauche). L'intensité des bandes correspondant au complexe Rv1556 + ADN a été mesurée à l'aide du logiciel ImageJ (droite). Les résultats sont normalisés par rapport à l'ADN seul (0%) et Rv1556 + ADN (100%).

L'expérience de TSA semble indiquer l'existence d'un ligand de Rv1556 dans le surnageant de culture. Cependant, le surnageant étant très concentré, nous ne pouvons pas exclure l'hypothèse d'une liaison non spécifique. L'expérience de retard sur gel ne s'est pas révélée conclusive. Globalement, ces approches semblent peu adaptées, les surnageants devant obligatoirement être concentrés pour réaliser les expérience, ils peuvent induire des biais expérimentaux.

Les différentes expériences mises en œuvre dans cette partie reposent sur l'hypothèse qu'une molécule du surnageant, potentiel substrat de MmpL6, soit le ligand de Rv1556. Les expériences présentées ne permettent pas de démontrer cette hypothèse, que ce soit avec un concentré de surnageant, ou plus précisément avec une cytokinine identifiée dans la littérature. Concernant la cytokinine, elle n'interagit pas directement avec Rv1556, mais sa présence pourrait induire l'expression du ligand naturel de ce dernier. Concernant le test réalisé sur un surnageant concentré, les résultats montrent que la méthodologie employée doit être ré-évaluée, afin d'éviter d'aboutir à des expériences dont les résultats ne permettent pas de conclure.

V. Purification du ligand naturel de Rv1556

A. Conditions dans lesquelles *mmpL6* est surexprimée

Pour optimiser la capture d'un ligand de Rv1556, il est nécessaire d'identifier les conditions dans lesquelles *mmpL6* est surexprimée, ce qui indiquerait que le ligand est présent et lié à Rv1556. Nous nous sommes appuyés sur l'étude de Minch et al, dans laquelle près de 80% des facteurs de transcription de *M. tb* ont été surexprimés afin d'obtenir une cartographie globale de leur régulon. Pour chaque construction de surexpression d'un facteur de transcription, une analyse de ChIP-seq et une analyse transcriptomique ont été effectuées, permettant de distinguer les actions de régulation directe et indirecte. Dans ce travail, seuls deux facteurs de transcription se sont révélés capable d'induire la surexpression simultanée de *rv1556* et *mmpL6*, sans toutefois se lier directement à leur région promotrice, d'après les données de ChIP-seq [56]. Cela suggère que leur action active une voie de signalisation indirecte, conduisant à la surexpression de ces deux gènes, certainement en levant la répression de Rv1556, qui demeure le seul régulateur direct identifié pour ce locus.

Les deux facteurs de transcription Rv0023 et Rv0081 induisent une surexpression de *mmpl6* de 1,58 et 1,54 fois, respectivement, dans le travail de Minch et al [56]. Nous avons inséré les gènes codant pour ces régulateurs dans un plasmide multicopie, pMV261, puis transformé ces constructions de surexpression dans *M. tb* H37Ra. Les souches obtenues ont été cultivées dans un milieu 7H9-OADC jusqu'en milieu de phase exponentielle, puis l'ARN a été extrait et l'expression des gènes *rv1556* et *mmpL6* ont été mesurés par RT-qPCR. Les souches surexprimant *rv0023* et *rv0081*, n'ont montré aucune surexpression des gènes d'intérêt par rapport à la souche sauvage (**Figure 66**). Ces facteurs de transcription ne semblent pas permettre la levée de la répression transcriptionnelle par Rv1556 dans nos conditions.

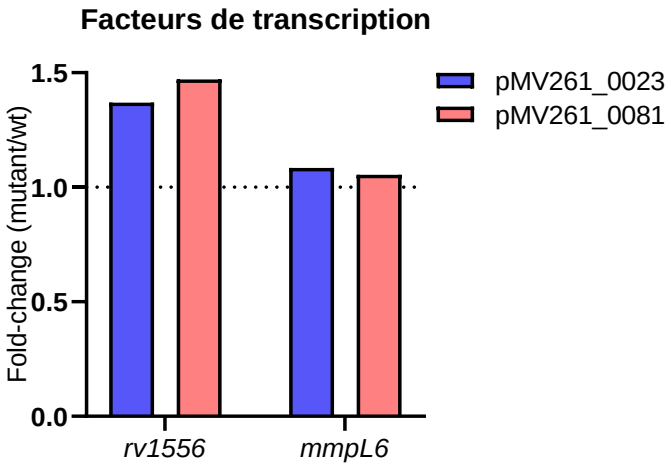


Figure 66 : Expression des gènes *rv1556* et *mmpL6* chez les souches surexprimant *rv0023 et rv0081*. Des souches de *M. tb* H37Ra surexprimant ou non *rv0023* ou *rv0081* sur le plasmide pMV261 ont été cultivées en milieu 7H9-OADC. En phase exponentielle de croissance, les ARN ont été extraits et l'expression de *rv1556* et *mmpl6* a été mesurée par RT-qPCR, rapportée à l'expression du gène de ménage *sigA* et à l'expression chez la souche sauvage selon la méthode du $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Notre première approche, basée sur la surexpression de régulateurs candidats, n'a pas permis d'induire la surexpression attendue de *mmpL6*. Nous avons adopté une seconde stratégie, en exploitant l'observation que le phénotype DCTB se forme plus facilement dans des milieux dépourvus d'OADC. Pour cela, nous avons cultivé *M. tb* H37Ra dans le milieu 7H9-Glucose, et mesuré l'expression des gènes *rv1556* et *mmpL6* par RT-qPCR. Dans ces conditions, nous obtenons un profil d'expression similaire à celui obtenu en présence du ligand chimique BDM88496, c'est-à-dire un impact nul sur l'expression de *rv1556* et une surexpression de *mmpL6*, par rapport à la culture réalisée en milieu 7H9-OADC (**Figure 67**).

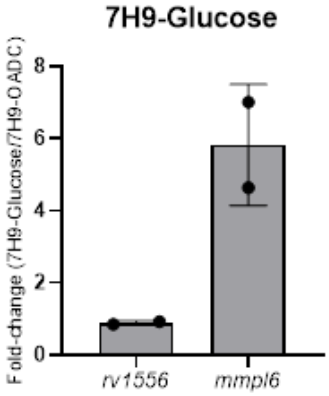


Figure 67 : Expression des gènes *rv1556* et *mmpL6* chez *M. tb* H37Ra cultivée en milieu 7H9-Glucose. *M. tb* H37Ra a été cultivé en milieu 7H9-Glucose ou 7H9-OADC. Les ARN ont été extraits et l'expression de *rv1556* et *mmpl6* a été mesurée par RT-qPCR, rapportée à l'expression du gène de ménage *sigA* et à la

condition 7H9-OADC selon la méthode du $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Les données sont présentées sous forme de moyenne ± écart-type de deux réplicats biologiques.

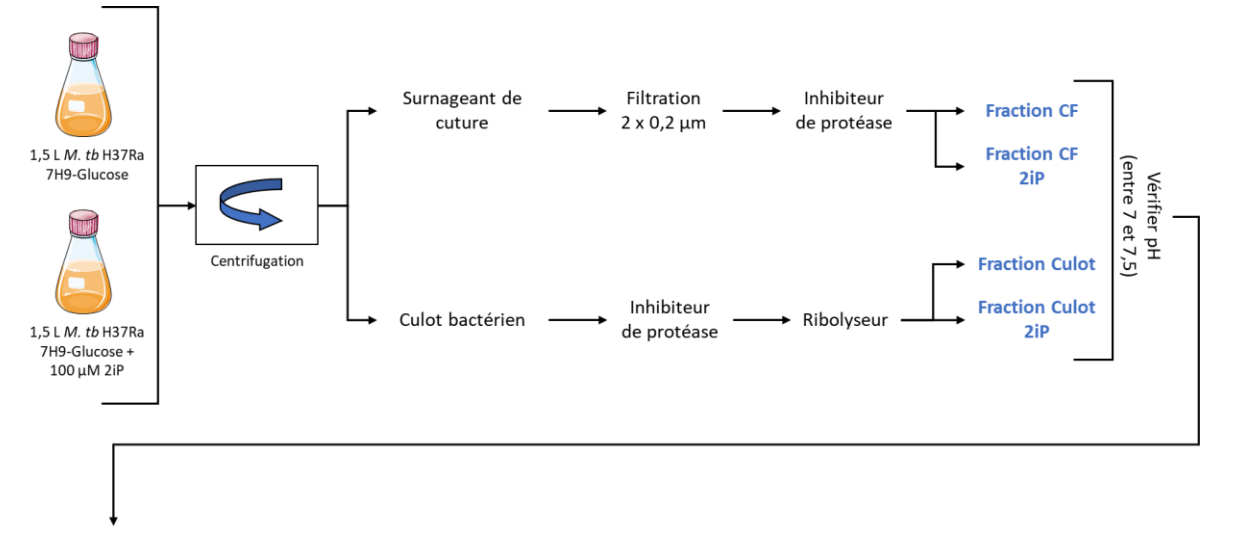
B. Approche méthodologique pour la détection et la purification du ligand de Rv1556

Une approche expérimentale exhaustive a été mise en œuvre afin de détecter et purifier le ligand de Rv1556, en utilisant les conditions expérimentales les plus favorables. Cette expérience a été conçue et réalisée avec l'aide du Dr Camille Grosse, et est schématisée ci-dessous (**Figure 68**).

La culture des bactéries en milieu 7H9-Glucose ou en présence de 2iP permet une surexpression de *mmpL6*. Afin de maximiser nos chances de trouver un ligand, nous avons cultivé un large volume de *M. tb* H37Ra (1,5 L) dans un milieu 7H9-Glucose, avec ou sans 2iP (100 µM). Le ligand a été recherché à la fois dans le surnageant de culture, mais également dans le culot, puisqu'aucune preuve n'existe quant à sa sécrétion (**Tableau 4**).

Tableau 5 : Conditions expérimentales testées pour la purification du ligand putatif de Rv1556

	Tampon	BDM88496	CF	Culot	CF 2iP	Culot 2iP
Colonne vide			x	x	x	x
+ Rv1556	x	x	x	x	x	X



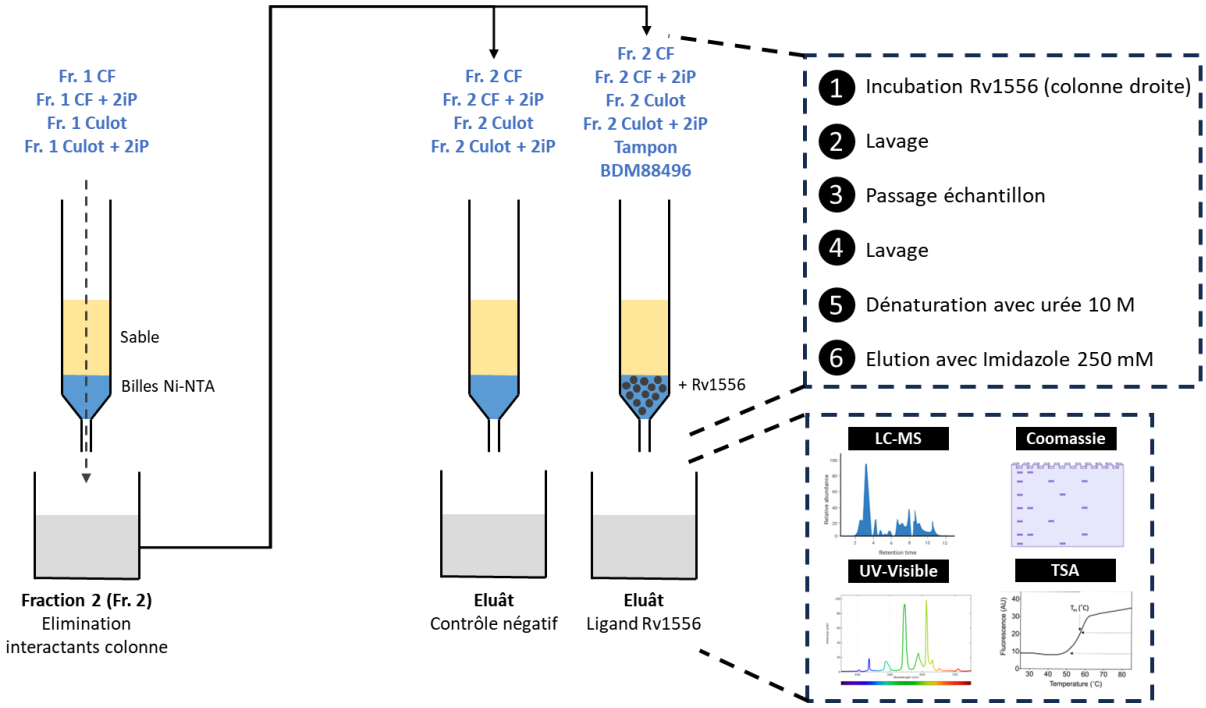


Figure 68 : Schéma expérimental pour détecter et purifier le ligand putatif de Rv1556.
Des cultures de *M. tb* H37Ra traitées ou non avec du 2iP ont été séparées en deux fractions : surnageant et culot. Ces fractions sont passés sur une colonne Ni-NTA pour éliminer les composants présentant une affinité pour la résine Ni-NTA. Les fractions purifiées ont été passées à travers les colonnes Ni-NTA contenant ou non Rv1556 lié de manière covalente grâce à la présence d'un tag 6His sur la protéine. Les éluats récupérés aux différentes étapes du protocole ont été analysés par spectrométrie optique, chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS, *liquid chromatography-mass spectrometry*), migration sur gel d'acrylamide SDS-PAGE, ou TSA. CF : Surnageant. Fr. : Fraction.

Les quatre échantillons décrits ci-dessus ont été préparé de manière à pouvoir être utilisé en toute sécurité. Les surnageants ont été doublement filtrés à 0,22 µm et les culots ribolysés, avant l'ajustement du pH. Les quatre fractions obtenues ont été passés sur une colonne Ni-NTA, identique à celle destinée à accrocher Rv1556, afin d'éliminer toute molécule susceptible de se lier non spécifiquement à la résine. La fraction purifiée ainsi obtenue (fraction 2) a été divisée en deux parties : la moitié a été passée sur une colonne dépourvue de Rv1556 (contrôle négatif), l'autre moitié a été passée sur la colonne à laquelle Rv1556-6His était accrochée, dans le but de récupérer son ligand. Des contrôles ont été inclus : un tampon protéique (contrôle négatif) et une solution contenant BDM88496 (4 mg) (contrôle positif) (**Tableau 5**).

Les colonnes ont été préparées avec un faible volume de résine Ni-NTA (1 mL), tandis que la colonne contenant Rv1556-6His a été chargée avec une quantité importante de protéine (4 mg), afin de maximiser les interactions. La résine a été recouverte d'une couche de sable, destinée à la protéger mécaniquement lors du chargement des échantillons.

Après le passage des échantillons, les colonnes ont été lavées abondamment pour éliminer toute interaction impliquant une liaison non covalente avec Rv1556. Ensuite, la dénaturation de Rv1556 a été induite par 10 M d'urée, permettant la libération du potentiel ligand et son élution. Plusieurs fractions ont été collectées. Enfin, Rv1556 a été éluée à l'imidazole, et un test de TSA a été réalisé afin de vérifier sa dénaturation et confirmer la validité technique de l'expérience. Dans ce même objectif, une colonne contenant Rv1556 sur laquelle ont été passés du tampon ou BDM88496 a directement été éluée à l'imidazole, sans traitement à l'urée, pour contrôler la stabilité de Rv1556 au cours de l'expérience (**Figure 68**).

Des expériences préliminaires ont permis d'optimiser les conditions expérimentales, en évaluant l'impact du pH et de la concentration d'imidazole sur le repliement de Rv1556, ainsi que la concentration en urée nécessaire à sa dénaturation.

À l'issue de l'expérience, les éluats collectés à chaque étape ont été soumis à différentes analyses.

Un spectre ultraviolet (UV)-visible a été déterminé pour chacun d'entre eux, afin de détecter la présence éventuelle d'un ligand, par augmentation de l'absorption, et d'évaluer la pureté des fractions au fur et à mesure des lavages. Globalement, les spectres n'ont montré que du bruit de fond.

Un gel SDS-PAGE a été effectué sur les échantillons initiaux, après l'élution à l'urée et après l'élution à l'imidazole (**Figure 69**). Ces analyses confirment que Rv1556 (22,3 kDa) reste fixée à la résine après la dénaturation à l'urée, puis est correctement éluée par l'imidazole. La plupart des contaminants présents dans la fraction initiale (fractions avant passage sur colonne) ne se sont pas retrouvés dans les deux fractions d'élutions, ce qui suggère que Rv1556 n'a pas été saturé par des composants non spécifiques et contrainte à établir des interactions, contrairement à l'expérience réalisée en présence d'un surnageant concentré.

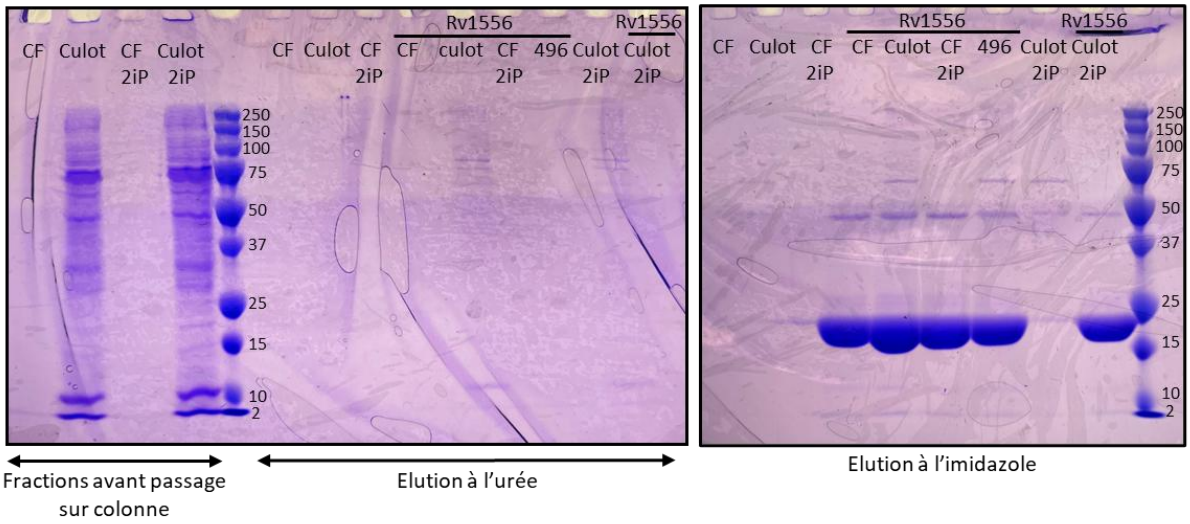


Figure 69 : Analyse par SDS-PAGE des éluats obtenus après passage des échantillons sur colonne avec ou sans Rv1556.
Les surnageants (CF) et culots de cultures de *M. tb* H37Ra cultivée en milieu 7H9-glucose, avec ou sans traitement au 2iP ont été préparés, puis passé sur colonne contenant de la résine Ni-NTA sur laquelle est fixée ou non Rv1556. Les échantillons avant passage sur colonne, élués à l'urée (10 M) ou à l'imidazole (250 mM) ont été déposés sur un gel d'acrylamide 10%. Après migration, les gels ont été colorés au bleu de Coomassie.

Des tests de TSA ont été effectués sur les protéines éluées à l'imidazole, dénaturées ou non à l'urée. Bien que la présence de l'imidazole déforme légèrement le spectre que l'on obtient habituellement, les protéines non dénaturées à l'urée montrent une protéine stable, avec un décalage du signal en présence de BDM88496 (**Figure 70**). En revanche, les protéines traitées à l'urée sont toutes correctement dénaturées, validant le protocole.

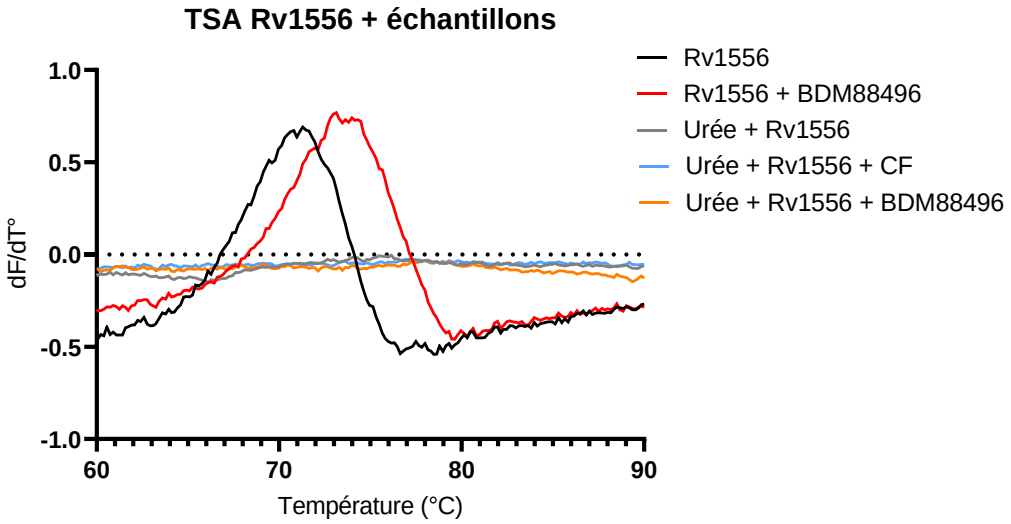


Figure 70 : Analyse par TSA de la dénaturation de Rv1556 suite au traitement à l'urée.

Le surnageant (CF) d'une culture de H37Ra cultivée en milieu 7H9-glucose et le composé BDM884896 à une concentration de 2 mg/mL ont été passé sur une colonne contenant de la résine Ni-NTA sur laquelle est fixée Rv1556. La protéine a été dénaturée ou non avec 10 M d'urée. Ensuite, Rv1556 a été éluée avec 250 mM d'imidazole. Les échantillons ont été préparés et la sonde SYPRO orange a été ajoutée. Les dérivées premières des courbes d'intensité de fluorescence (Ex498-Em640) de la sonde en fonction de la température sont représentées.

Les éluats obtenus après traitement à l'urée, susceptibles de contenir le ligand, ont été incubés en présence de Rv1556 pour un test de TSA, mais aucune interaction n'a pu être mise en évidence. Ces échantillons ont également été analysés par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS). En comparant chaque échantillon passé dans la colonne contenant Rv1556 à son homologue passé dans la colonne sans protéine, deux conditions ont présentés des profils différents : le surnageant de la culture traitée au 2iP, et les culots des cultures traitées ou non au 2iP. Cependant, ces profils n'ont pas été retrouvés lors du second réplicat biologique de cette expérience.

Ainsi, malgré la mise en place de contrôles validés et d'un protocole expérimentale mené avec succès, la détection et la purification d'un ligand potentiel de Rv1556 reste difficile et associée à une faible reproductibilité des résultats.

VI. Discussion

Nous avons observé une différence de formation des DCTB entre les souches *M. tb* L1-500960 et H37Rv, ce qui nous a conduit à explorer plus en détails les facteurs pouvant en être à la source. Une des principales différences décrites entre ces souches réside dans l'absence du locus TbD1 chez *M. tb* H37Rv, qui code pour MmpS6 et une partie de la pompe d'efflux MmpL6. Nous avons montré que le ligand chimique BDM88496 interagit directement avec Rv1556, et inhibe sa capacité de liaison à l'ADN, ce qui résulte en la surexpression de *mmpS6* et *mmpL6*. La cytokinine 2iP, quant à elle, induit la surexpression de *mmpL6* mais indépendamment d'une action sur Rv1556. Nous avons étudié l'implication du locus TbD1 dans la formation des DCTB en combinant deux approches : i) des outils génétiques, avec des souches isogéniques de *M. tb* possédant ou non TbD1 et des souches de lignée moderne ou ancestrale ; et ii) l'utilisation d'un ligand chimique, BDM88496, ciblant le répresseur de *mmpL6*, Rv1556. Nos résultats indiquent que la formation de DCTB varie entre des souches appartenant à différentes lignées du *Mycobacterium tuberculosis* complex, en lien avec la présence du locus TbD1. De plus,

l'expression de *mmpL6* est négativement corrélée au réveil des DCTB. Ces différents outils ont également été utilisé pour caractériser la fonction de TbD1 et rechercher la présence d'un ligand naturel de Rv1556. Toutefois, ces expériences ont fourni peu d'informations concluantes.

Nos résultats indiquent que la présence du locus TbD1 favorise la formation des DCTB et inhibe en partie leur réveil en réponse à des facteurs présents dans le surnageant de culture. Différentes études se sont également intéressées à ce locus. Dans le modèle de Wayne, une souche délétée pour TbD1 forme moins de CFU lorsque la culture est âgée, ce qui a été interprété comme une moindre résistance à l'hypoxie [51]. Toutefois, l'incapacité à former des CFU pourrait également refléter un passage des bactéries vers un état DCTB, d'autant que les auteurs rapportent une légère induction, bien que non significative, du régulon de dormance DosR/S/T chez les souches possédant TbD1. La perte du locus TbD1 a également été associée à des différences dans la résistance au stress oxydant, avec des résultats variables selon les études. Certaines rapportent une résistance accrue au stress oxydant en réponse à l'H_2O_2 chez les souches ΔTbD1 [51], tandis que *chez M. bovis*, la délétion de TbD1 augmente la sensibilité à ce même stress [327]. D'autres études indiquent une surexpression de *mmpL6* en réponse au stress oxydant induit par le triclosan, avec une meilleure résistance chez les souches qui possèdent le gène dans sa forme entière [328,329]. Chez *M. bovis* BCG, la délétion de TbD1 entraîne une diminution de l'expression des gènes impliqués dans la réponse aux stress métalliques, qui se traduit une sensibilité accrue au cuivre [327]. Ces divergences peuvent s'expliquer par d'autres différences génétiques entre les souches utilisées, ou bien des variations dans les conditions expérimentales. Enfin, la délétion du locus TbD1 est associée à une augmentation de la réplication dans certains modèles de macrophage et chez les animaux capables de former des granulomes hypoxiques (hamster, souris C3HeB/FeJ) [51]. L'ensemble de ces observations soulignent le rôle important de TbD1 dans la réponse aux stress rencontrés chez l'hôte et dans la virulence.

Nos résultats complètent ces données et pourraient expliquer, en partie, le ralentissement de la réplication intracellulaire des souches de *M. tb* possédant une protéine MmpL6 fonctionnelle [51]. Afin de tester cette hypothèse, une expérience d'infection avec différentes concentrations bactériennes utilisées pourrait être réalisée. Si le phénotype

de DCTB médié par *mmpL6* influence la réplication intracellulaire, aucune différence de réplication intracellulaire ne devrait être observée entre les souches TbD1 intactes ou tronquées lors d'infections menées à de fortes densités bactériennes, tandis que des différences devraient apparaitre à plus faibles densités, lorsque la formation de DCTB diffère entre ces souches. Dans cette même hypothèse, l'ajout du BDM88496 ou de la cytokinine 2iP, tous deux entrainant la surexpression de *mmpL6*, devrait également induire une diminution de la réplication intracellulaire.

Puisque le locus TbD1 favorise la formation des DCTB, cela suggère que ce locus contribue à la capacité de certaines souches à entrer dans un état non ou faiblement réplicatif ou à initier leur réplication. Cette observation s'inscrit dans un contexte plus large, puisque le locus TbD1 permet la distinction entre lignées ancestrales ($TbD1^+$) et modernes ($TbD1^-$) [42], qui diffèrent profondément dans leur interaction avec l'hôte.

Dans le modèle de Wayne, il a été montré que les souches de lignée 4 sont capables de reprendre leur réplication après une hypoxie prolongée, contrairement aux souches de lignée 2, malgré une expression constitutive de *dosR* chez ces dernières [310,330]. Ces différences suggèrent que la régulation de la dormance et du réveil repose sur des régulations plus complexes que le seul régulon de DosR, jusqu'alors reconnu comme un élément déterminant pour l'entrée en dormance [189,305]. Des études récentes confirment que la formation des DCTB varie selon les lignées. Par exemple, les souches Beijing (L2) génèrent plus facilement des DCTB que les souches LAM (L4) en conditions de carence en carbone, mais ces dernières requièrent plus de CF pour leur réveil, suggérant un état non réplicatif plus marqué [295]. De même, Arbués et al. utilisent la sous-lignée L1.1.1, à laquelle appartient L1-500960, et montrent une croissance très faible dans les granulomes, associée à des marqueurs de dormance [331]. Globalement, les différentes lignées du MTBC diffèrent sur leur capacité à entrer en dormance et leur réveil, suggérant que ce phénotype n'est pas anecdotique, mais au contraire pourrait constituer un trait biologique important au cours du processus évolutif.

Dans le cadre de ce projet, nous avons montré que des souches appartenant aux lignées modernes (Beijing et H37Rv) sont moins prédisposées à former des DCTB que des souches appartenant aux lignées ancestrales (L1-500960, *M. africanum*). Cette différence met en évidence l'impact de la présence du locus TbD1 dans la capacité des différentes

souches à former des DCTB dans notre modèle. Peu d'études jusqu'à présent se sont intéressées aux souches de lignée ancestrales dans des modèles de dormance, ne nous permettant pas de comparer nos observations avec la littérature. Cependant, ce constat fait écho aux différences cliniques décrites entre lignées modernes et ancestrales, tant dans leur interaction avec l'hôte que dans leur transmission.

Plusieurs études ont mis en évidence une corrélation positive entre la réplication de *M. tb* et la formation de cavités pulmonaires, une plus forte transmission, et une faible réponse immunitaire adaptative [331,332]. De plus, les souches appartenant aux lignées modernes se distinguent par une croissance plus rapide dans les macrophages et chez la souris [282] et par des granulomes plus nombreux [331]. À l'inverse, les souches appartenant aux lignées ancestrales présentent une croissance intracellulaire plus lente, induisent une sécrétion de cytokine plus élevée et présentent une distribution géographique plus restreinte [320,331,332]. Les souches de lignée 1, bien que moins étudiée que celles des lignées modernes 2 et 4, représentent une part importante des infections tuberculeuses, en particulier dans des régions à forte incidence comme l'Inde et l'Asie du Sud-Est [50,55,333], et pourraient concerner jusqu'à 28% des cas de tuberculose au niveau mondial [331]. Cliniquement, les souches de lignée 1 ont été associées à une plus grande fréquence de forme extra-pulmonaires de la tuberculose et de cavitation, ainsi qu'à à un risque accru d'échec thérapeutique ou de rechute [316,317,334]. Ces observations semblent suggérer que les lignées ancestrales et modernes de *M. tuberculosis* n'adoptent pas la même stratégie d'adaptation, certaines favorisant la dormance et d'autres la croissance rapide et la transmission. Cependant, aucune étude n'a à ce jour démontré un lien de causalité entre la formation de DCTB et ces observations.

Les souches des lignées ancestrales pourraient exploiter MmpL6 comme un atout pour la survie et la persistance en milieu intracellulaire. Comprendre les mécanismes moléculaires qui entraînent ces différences, et en particulier le rôle de MmpL6, pourrait ouvrir la voie à des approches plus ciblées, adaptées aux spécificités de chaque lignée.

Les systèmes ESX (système de sécrétion de type VII) occupent une place centrale dans la physiopathologie de *M. tuberculosis*, en assurant l'export de nombreuses protéines impliquées dans la virulence et la modulation de l'hôte [335]. Parmi eux, ESX-5 joue un rôle particulier dans l'infection, en sécrétant une grande diversité de substrats dont certains

diffèrent selon les lignées. Plusieurs études montrent que EsxM et ses paralogues (EsxK, EsxW) [336], influencent la réplication intracellulaire et la dissémination [337–339], et sont modifiés chez les souches de lignées modernes [338–340]. Dans notre travail, l'identification de la protéine EsxK, impliquée dans le maintien de l'état DCTB (Chapitre 2), renforce cette idée. Ainsi, au-delà des différences liées à TbD1, les systèmes ESX-5 semblent avoir également une importance particulière dans la modulation de l'infection et la formation des DCTB chez les lignées ancestrales.

Toutefois, il est important de souligner que ces différences cliniques ne s'expliquent pas uniquement par la phylogénique. D'une part, des caractères génétiques parmi les souches d'une même lignée peuvent influencer la sévérité et l'issue clinique [331,332,334]. D'autre part, des facteurs liés à l'hôte, à son immunité et à son environnement, ainsi que des mécanismes de régulation épigénétique contribuent également à cette variabilité [19,341–343]. La diversité clinique de la tuberculose résulte d'une combinaison complexe de tous ces facteurs.

Puisque la modulation de l'expression du locus TbD1 influence la formation des DCTB, nous avons cherché à mieux comprendre sa régulation. En l'absence de MmpL6 la densité bactérienne doit être diminuée pour pouvoir former des DCTB. Nous proposons que les facteurs de réveil produits par *M. tb* dans le surnageant puissent pénétrer dans les bacilles. À partir d'une concentration seuil, ils pourraient constituer un signal déclencheur, induisant directement ou par l'intermédiaire de cascades de signalisation le réveil de *M. tb.* En présence de MmpL6, des DCTB peuvent être formés à des densités bactériennes plus élevées, et leur réveil nécessite une dose de surnageant supérieure lorsque *mmpL6* est surexprimée. Deux hypothèses peuvent être proposées pour expliquer ce phénomène : i) action directe, dans laquelle ce sont les facteurs de réveil du surnageant sont exportés par MmpL6 ; ii) action indirecte, dans laquelle ce sont des facteurs intermédiaires de signalisation qui sont exportés par MmpL6. Nous avons tenté de discriminer ces hypothèses en regardant la liaison potentielle de molécules du surnageant sur Rv1556. Avec l'utilisation d'un surnageant concentré, une éventuelle liaison a été détecté en TSA, mais n'a pas eu d'effet sur l'interaction de Rv1556 avec l'ADN.

Par la suite, nous avons consacré une partie ce projet à l'identification du ligand naturel de Rv1556, en testant les molécules présentes dans le CF ou le culot, ce qui permettrait de

discriminer entre les hypothèses d'action de MmpL6 précédemment énoncées. En outre, cela permettrait d'élucider les conditions biologiques dans lesquelles *mmpL6* est exprimée, et la formation de DCTB favorisée.

Tout d'abord, nous avons recherché des conditions dans lesquelles *mmpL6* est surexprimée, afin de maximiser nos chances d'identifier un ligand. Nos résultats montrent que *mmpL6* est surexprimé entre 10 et 15 fois dans un milieu 7H9 supplémenté en glucose ou en présence de la cytokinine N^6-(2-Isopentenyl)adenine (2iP), comparativement à un milieu de culture standard. L'effet observé avec le 2iP est particulièrement intéressant, car les cytokinines sont des molécules de signalisation impliquées dans la régulation de la croissance chez les végétaux, qui sont également produites par *M. tb* [323]. Bien que, d'après nos résultats, la cytokinine elle-même ne semble pas être un ligand direct de Rv1556, il est possible que le véritable ligand soit un produit de dégradation de la cytokinine ou un métabolite issu d'une voie activée en présence de cytokinine. Cette théorie est motivée par des travaux récents démontrant que certains phénotypes attribués aux cytokinines sont en réalités dus à des aldéhydes dérivés de leur métabolisme [325,326].

Suite à ces observations, nous avons tenté, par différentes approches, d'identifier et d'isoler un ligand de Rv1556 à partir du surnageant de culture ou du culot bactérien, dans des conditions favorisant la surexpression de *mmpL6* (7H9-Glucose ou présence du 2iP). Malgré nos efforts, nous n'avons pas pu purifier de ligand. Plusieurs explications peuvent être envisagées. D'une part, la nature du ligand reste inconnue, il est possible qu'il n'ait pas résisté aux étapes chimiques ou qu'il ne soit pas soluble dans le tampon protéique utilisé. D'autre part, l'interaction avec Rv1556 pourrait être faible ou transitoire, et donc perdue au cours des lavages. Les conditions expérimentales *in vitro* peuvent également ne pas reproduire fidèlement celles rencontrées *in cellulo*, par exemple en raison de tampons non adaptés ou de la nécessité de cofacteurs absents dans nos essais. Enfin, le ligand pourrait être présent en quantité trop faible, instable ou rapidement dégradé, ce qui compliquerait sa détection et son isolement. Ces difficultés suggèrent que l'identification du ligand naturel de Rv1556 n'est peut-être pas réalisable *in vitro* sans informations complémentaires sur sa nature ou ses caractéristiques de liaison. Il est également possible que la surexpression de *mmpL6* observée dans ces conditions ne résulte pas de l'action de Rv1556, mais d'un autre facteur de transcription.

Les perspectives de cette partie du projet consistent d'abord à explorer les interactions potentielles de Rv1556 à l'aide du logiciel AlphaFold, afin d'identifier des ligands candidats prédits *in silico*. Ensuite, il serait intéressant de fractionner le CF, afin de le décomplexifier, puis d'utiliser une construction de gène rapporteur portant le promoteur de *mmpL6*, pour identifier plus précisément les fractions capables d'induire la surexpression de ce gène.

Afin de discriminer les hypothèses d'action de MmpL6, plusieurs approches expérimentales pourraient être effectuées. Selon l'hypothèse d'interaction directe, les molécules du surnageant responsables de la signalisation du réveil seraient également celles qui sont exportées par MmpL6. Dans ce cas, un surnageant issu d'une souche exprimant un MmpL6 fonctionnel devrait être enrichi avec ces molécules, et d'autant plus si la culture est traitée avec BDM88496, et induire un réveil plus marqué chez une souche avec un MmpL6 tronqué. Par ailleurs, une approche d'exométabolomique comparative entre des souches exprimant une protéine MmpL6 intacte ou tronquée, pourrait permettre d'identifier les substrats de MmpL6.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

Au cours de ce travail, nous avons développé et caractérisé un modèle *in vitro* de *Mycobacterium tuberculosis* dans un état différentiellement cultivable. Ce modèle, élaboré à partir de la souche clinique de lignée 1 *M. tb* L1-500960, permet d'obtenir de manière reproductible des bactéries non cultivables dans des milieux de culture standards, mais capables d'initier leur croissance au contact du surnageant d'une culture indépendante de *M. tb* ou de l'albumine. La mise au point de modèle, fondée sur une simple dilution d'une culture en fin de phase exponentielle dans un milieu Sauton, dans laquelle les DCTB sont la population majoritaire, a permis d'obtenir un système robuste, miniaturisable et adaptable à des approches de criblage génétique ou de molécules.

La caractérisation phénotypique du modèle a montré que les DCTB conservent une activité métabolique détectable, bien que réduite par rapport à celle des bactéries en phase exponentielle. L'approche CRISPRi a permis d'identifier des gènes essentiels à la survie dans l'état DCTB, tandis que l'inactivation ciblée de certains gènes a pu d'induire le réveil de ces bacilles. En parallèle, le criblage à haut-débit de petites molécules a permis d'identifier plusieurs composés d'intérêt, capables d'induire le réveil des DCTB.

Au cours de ce projet, nous avons également mis en évidence des différences dans la capacité formation des DCTB entre des souches de *M. tb* appartenant à différentes lignées phylogénétiques. Nos travaux ont souligné l'importance du locus TbD1 l'un des facteurs distinctifs entre souches les modernes et ancestrales. La présence du locus TbD1 chez les lignées ancestrales entraine une plus grande propension à former des DCTB, et à l'inverse une réponse plus faible aux signaux de réveil. Ces phénotypes sont amplifiés lorsque ce locus est surexprimé. Cette observation complète les différences physiologiques déjà décrites entre lignées ancestrales et modernes.

L'ensemble de ces travaux met en lumière la complexité de l'état DCTB. La formation et le réveil des bacilles sont des processus multifactoriels, impliquant à la fois des déterminants génétiques (comme TbD1 ou *esxk*) et des signaux métaboliques en réponse à la présence de CF ou d'albumine. Comme tout modèle *in vitro*, celui que nous avons développé ne capture qu'une partie des mécanismes physiologiques observés chez les patient, mais, il constitue un outil pertinent pour explorer les processus de maintien et de réveil des DCTB et offre une base expérimentale solide pour des approches de criblage à grande échelle.

À plus long terme, ces travaux pourraient contribuer à la conception de nouvelles stratégies diagnostiques et thérapeutiques ciblant les formes non cultivables de *M. tb*, mieux adaptées à la diversité des souches circulantes. En effet, une étude récente suggère que la lignée 1 pourrait aujourd'hui représenter l'une des principales sources de cas de tuberculose dans le monde [344].

MATÉRIELS ET MÉTHODES

I. Matériels

A. Souches bactériennes

Les expériences ont été réalisées avec différentes souches de *Mycobacterium tuberculosis* et *Escherichia coli*, dont les noms et les caractéristiques sont décrites dans le tableau ci-dessous.

Tableau 6 : Description des souches utilisées.

	Construction	Phénotype	Provenance
***M. tb* H37Ra-gfp**	Plasmide pNIP48-gfp codant pour le gène *gfp* sous le promoteur hsp60.	Expression constitutive de la GFP Résistance à l'hygromycine	Laboratoire RMB
***M. tb* H37Rv-gfp (L4)**	Plasmide pNIP48-gfp codant pour le gène *gfp* sous le promoteur hsp60.	Expression constitutive de la GFP Résistance à l'hygromycine	Laboratoire RMB
***M. tb* L1-500960 (L1.1.1)**		wt	Collection BCCM/ITM
***M. tb* L1-500960-gfp (L1.1.1)**	Plasmide pNIP48-gfp codant pour le gène *gfp* sous le promoteur hsp60.	Expression constitutive de la GFP Résistance à l'hygromycine	Construite dans ce projet
***M. tb* 79112 (L1)**		wt	Institut Pasteur [51]
***M. tb* 79112ΔTbD1**	Remplacement de la région TbD1 par le gène codant pour la résistance à la kanamycine	Délétion de TbD1 Résistance à la kanamycine	Institut Pasteur [51]
***M. tb* 79112ΔTbD1-c**	Remplacement de la région TbD1 par le gène codant pour la résistance à la kanamycine Cosmide intégratif 2G12 (TbD1 + pYUB412)	Délétion de TbD1 Complémentation de TbD1 Résistance à la kanamycine et l'hygromycine	Institut Pasteur [51]
***M. tb* H37Rv (L4)**		wt	Institut Pasteur [51]
***M. tb* H37Rv-c**	Cosmide 2G12 (TbD1 + pYUB412)	Complémentation de TbD1	Institut Pasteur [51]

		Résistance à l'hygromycine	
***M. tb* Beijing (L2)**		wt	Laboratoire RMB
***M. africanum* (L5)**		wt	Laboratoire RMB
***M. tb* H37Ra (pMV261-Rv0023)**	Plasmide pMV261 codant pour le gène *rv0023* sous le promoteur hsp60	Surexpression de Rv0023	Construite dans ce projet
***M. tb* H37Ra (pMV261-Rv0081)**	Plasmide pMV261 codant pour le gène *rv0081* sous le promoteur hsp60	Surexpression de Rv0081	Construite dans ce projet
***E. coli* DH5α**		wt	Laboratoire RMB
***E. coli BL21* (pEt15b-Rv1556-6His)**	Plasmide pMV261 codant pour le gène *rv1556*-6His sous le promoteur hsp60	Expression de la protéine Rv1556 avec un tag 6-Histidine en N-ter Résistance à la kanamycine	Construite dans ce projet

E. coli : Escherichia coli ; *M. tb : Mycobacterium tuberculosis*; GFP : Green Fluorescent Protein ; L : lignée ; TbD1 : M. tb specific deletion 1 ; wt : phénotype sauvage (wild-type).

Les souches *M. africanum* et *M. tuberculosis* L1-5000960, Beijing et H37Rv ont été vérifiées pour la taille de leur locus TbD1, grâce à une PCR. Les PCR ont été réalisées avec la polymérase Phusion, du kit Phusion High-Fidelity PCR Master Mix (Thermo Scientific, Réf F532L), avec les amorces : 5' GTGACCCAGATAGCGGATCG 3' et 5' CTGGTAGCTGGCATAGTCCG 3'.

Un locus TbD1 entier donne un fragment PCR de 4478 pb, alors qu'une forme tronquée de ce locus donne un fragment PCR de 2325 pb (**Figure 71**).

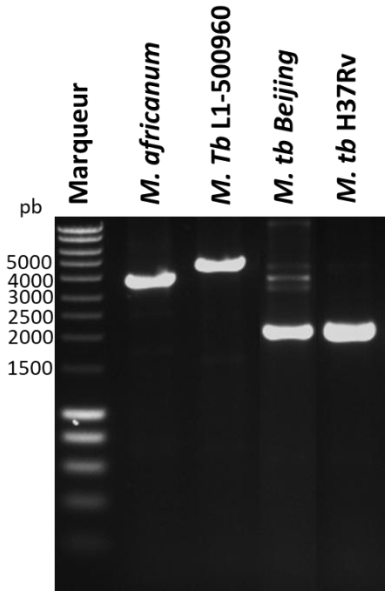


Figure 71 : Vérification du locus TbD1 chez les souches M. *tb* de différentes lignées.
Amplification par PCR du locus TbD1 par les amorces TbD1 sur l'ADN génomique extrait des souches *M. africanum* et *M. tuberculosis* L1-5000960, Beijing et H37Rv. Les produits PCR ont été déposés sur un gel d'agarose 1%. Après la migration par électrophorèse, le gel a été marqué au bromure d'éthidium.

B. Milieux de culture et suppléments

1. Milieux

Les mycobactéries ont été cultivées dans différents milieux :

- **7H9-OADC** : Middlebrook 7H9 standard (BD Difco™) enrichi de 0,2 % (m/v) de glycérol (Euromedex), 0,05 % de Tween 80 (Sigma-Aldrich) et 10 % (v/v) de supplément OADC (acide oléique, albumine, dextrose, catalase) (Sigma-Aldrich). Pour toutes les versions modifiées du milieu 7H9, les composants supplémentaires par rapport à la base standard 7H9 sont spécifiés.
- **7H9-Glucose** : Middlebrook 7H9 standard (BD Difco™) enrichi de 0,2 % (m/v) de glycérol (Euromedex), 0,2 % (m/v) de glucose (Sigma-Aldrich) et 0,025 % (v/v) de tyloxapol (Merck).
- **Sauton** (par litre) : 0,5 g de KH_2PO_4 (Fisher), 1,4 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (Sigma-Aldrich), 4 g de L-asparagine (Sigma-Aldrich), 6 % (m/v) de glycérol, 0,05 g de citrate d'ammonium ferrique (Merck), 2 g d'acide citrique (Sigma-Aldrich), 0,0001 % (m/v) de $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ (Merck) et 0,025 % (v/v) de tyloxapol, et était ajusté à un pH de 7,4 avec du NaOH (Euromedex).

Les souches d'*E. coli* ont été cultivées dans le milieu Luria-Bertani (LB, MP Biomedicals).

Les souches contenant des plasmides, cosmides ou modifications génétiques ont été cultivées en présence de kanamycine (Euromedex UK0010-C) à 25 µg/mL ou hygromycine (Euromedex TO-H011) à 50 µg/mL.

2. Surnageant de culture

Le surnageant de culture (CF) a été préparé à partir d'une culture de *M. tb* H37Ra, H37Rv ou L1-500960 réalisée dans le milieu 7H9-OADC, 7H9-Glucose ou Sauton, jusqu'à une DO_{600} comprise entre 0,6 et 1, sauf mention contraire. Après centrifugation à 4 000 × g pendant 10 minutes, le CF a été filtré à 0,22 µm en conditions stériles, aliquoté et conservé à -80 °C. Avant utilisation, les aliquots décongelés ont été refiltrées. Le CF a été ajouté au milieu à une concentration finale de 50 %. Pour les expériences réalisées avec différentes concentrations en CF, le CF a été diluée au ½ ou au 1/3 dans le milieu dans lequel il a été produit.

3. Sources d'albumine et de carbone

L'albumine sérique bovine standard fraction V (BSA, Sigma-Aldrich) ou sans acides gras (BSA FA, Sigma-Aldrich) a d'abord été dissoute dans 8,5 g/L de NaCl (Euromedex), puis incorporée au milieu de culture à une concentration finale de 5 g/L, avec ou sans 0,2 % (m/v) de glucose. Lorsque cela était indiqué, les milieux 7H9-Glucose ou Sauton ont été supplémentés avec 10 % (v/v) d'OADC.

Lorsque l'OADC et le CF ont été testés conjointement, ils ont été ajoutés à une concentration finale de 12,5% et 37,5% respectivement.

Les différents composants du milieu 7H9-OADC ont été testés individuellement dans un milieu Middlebrook 7H9 supplémenté avec 0,2% (m/v) de glucose aux concentrations auxquelles ils sont habituellement utilisés : acide oléique, glucose (0,2% m/v), BSA fraction V (5 g/L) + glucose (0,2% m/v), OADC (10%, v/v) et Tween 80 (0,05%, v/v).

Les sources de carbone ont été testées individuellement à une concentration finale de 50 µM, dans un milieu Middlebrook 7H9 non enrichi.

4. Composés

Le composé BDM88496 (332.417 g/mol) a été synthétisé et fournit gracieusement par l'équipe du Dr Nicolas Willand (U1177). Il a été solubilisé à une concentration de 10 mg/mL dans du DMSO (Sigma-Aldrich), aliquoté et stocké à -20°C.

La cytokinine N6-(2-Isopentenyl)adenine, aussi appelée 6-(γ,γ-Dimethylallylamino) purine (2iP) (Sigma-Aldrich, Réf D7660), a été achetée en solution dans du PBS (Gibco), aliquotée et stockée à -20°C.

II. Méthodes

A. Conditions de culture

Conditions générales de culture

Les cultures ont été réalisées dans un laboratoire de type BSL-1 pour *Escherichia coli*, BSL-2 pour *M. tb* H37Ra et BSL-3 pour toutes les autres mycobactéries.

Pour l'estimation de l'inoculum des mycobactéries, une DO_{600} de 1 a été considérée comme équivalente à 1×10^8 bactéries/mL.

E. coli a été pré-cultivée dans le milieu LB, en présence ou non d'antibiotiques, sur la nuit. Le lendemain, un aliquot de cette préculture a été utilisé pour lancer une nouvelle culture pour le test.

M. tb a été pré-cultivée à 37°C en condition statique, dans une flasque de culture (Starstedt), dans le milieu d'essai jusqu'à atteindre une croissance exponentielle (DO_{600} comprise entre 0,6 et 1). Un aliquot a ensuite été transféré dans une culture fraîche (DO_{600} 0,2) et incubée dans les mêmes conditions jusqu'à la phase stationnaire précoce (DO_{600} comprise entre 1 et 1,5) ou pendant un temps précisé dans la figure correspondante. La culture peut être stocké à -80°C à cette étape, ou utilisée directement, suivant les expériences. Cette dernière a été lavée trois fois pour éliminer le surnageant résiduel, et les agglomérats ont été éliminés en passant la suspension cinq fois à travers une seringue de 0,22 mm. Les échantillons ont ensuite été dilués à l'inoculum indiqué et transférés dans une plaque 384 puits (Greiner, Réf. 81091). Le milieu, le CF, les sources de carbone ou d'albumine ou les composés ont été ajoutés à l'inoculum bactérien. Le volume final par puit est de 25 ou 50 µL. Les plaques ont été scellées par un film aluminium (Corning™, Réf.

6570) ou respirant (Thermo Fischer Scientific, Réf. 241205) pour le test d'oxygénation, incubées à 37°C en condition statique pendant la durée indiquée (14 à 35 jours) et la croissance a été mesurée.

Traitements antibiotiques et chocs thermiques

M.tb L1-500960 a été incubée pendant 4 semaines, sans agitation, à 37°C. Cette culture en phase stationnaire avancée a été lavée trois fois par centrifugation/resuspension dans du milieu de culture, puis traitée avec de l'isoniazide (Sigma-Aldrich, Réf I3377) à 5 ou 10 µg/mL ou du DMSO (0,1%, v/v), et les flasques sont remises à incuber pendant 4 jours. Une incubation de 2h à 50°C peut être réalisée après le traitement antibiotique. Les cultures sont ensuite lavées 3 fois dans du milieu de culture, puis stockées dans du 7H9 + glycérol 15%, à -80°C. Un aliquot est utilisé par expérience. Chaque aliquot est lavé trois fois par centrifugation/resuspension dans du milieu de culture, puis passé cinq fois à travers une seringue de 0,22 mm, et enfin dilué à l'inoculum précisé pour le test.

B. Mesure et quantification de la croissance bactérienne

1. Lecture de la croissance

La croissance en flasque est estimée par la mesure de la densité optique à 600 nm.

La croissance dans les plaques 384 puits peut être détectée par quatre indicateurs :

- Fluorescence GFP : les bactéries porteuses du plasmide pNIP48-gfp expriment la GFP de manière constitutive, Son expression peut être détectée à une fluorescence d'excitation/émission de 488/510 nm.
- Auto-fluorescence bactérienne : nous avons constaté qu'un maintien prolongé des cultures (4 semaines) entrainait une perte d'expression de la GFP, pourtant portée par un plasmide intégratif. Pour pallier ce problème, nous avons choisi de mesurer la croissance bactérienne par une autre méthode, en exploitant la fluorescence naturellement émise par les bactéries, avec un spectre d'excitation/émission de 420/475 nm.
- Réduction de la résazurine : la résazurine est réduite en résofurine, qui est fluorescent. La résazurine (Thermo Fischer Scientific) a été ajoutée à une

concentration finale de 0,005 % (m/v), les plaques ont été incubées à 37°C pendant 24h, puis la fluorescence a été enregistrée à 585 nm, après une excitation à 535 nm.

- Densité optique à 600 nm

Ces mesures ont été réalisées sur le lecteur de plaque Ensight (PerkinElmer) dans le BSL-3 ou sur le POLARstar Omega (BMG LABTECH) dans le BSL-2. Des lectures ont été effectuées au jour 0 et à la fin du test. La lecture au jour 0 permet de faire une normalisation des données lors de l'analyse.

Des seuils de croissance ont été calculés, afin de déterminer le pourcentage de puits positifs pour la croissance dans les différentes conditions testées. Pour cela, la croissance reflétée par la mesure de la fluorescence (GFP, auto-fluorescence ou résazurine) a été supposée suivre une distribution normale. Un puits était considéré comme « positif » lorsque sa fluorescence dépassait la moyenne du contrôle négatif ou du milieu non inoculé plus trois écarts-types.

2. Estimation du nombre le plus probable (MPN) de *M. tb*

La méthode du nombre le plus probable (MPN) a été appliquée à des cultures liquides de *M. tuberculosis* afin de distinguer les bacilles en phase de réplication active des bacilles tuberculeux différentiellement cultivables (DCTB). Pour chaque condition expérimentale, les cultures ont d'abord été ajustées à une DO_{600} = 0,10, afin de pouvoir comparer différentes conditions entre elles. Des dilutions en série au dixième ont ensuite été réalisés dans des plaques 96 puits. Les différentes dilutions ont été transférées dans des plaques 384 puits, avec entre 4 et 6 réplicats techniques par dilution, puis du milieu ou des facteurs de croissance ont été ajoutés dans les puits. Les bacilles réplicatifs ont été dénombrés dans le milieu seul, tandis que les DCTB ont été quantifiés dans des plaques parallèles supplémentées avec 50 % de CF. La croissance bactérienne a été surveillée en mesurant le signal GFP. Pour définir les puits positifs, la fluorescence GFP a été supposée suivre une distribution normale. Un puits était considéré comme « positif » lorsque sa fluorescence dépassait la moyenne du milieu non inoculé plus trois écarts-types. Le profil des puits positifs à travers les dilutions a été converti en nombre de bactéries à l'aide de l'algorithme MPN de Jarvis-Breslow (Jarvis et al., 2010), ce qui a permis d'obtenir des

estimations distinctes pour les sous-populations réplicatives et DCTB. Afin de calculer le nombre de DCTB dans la culture, il faut diviser les MPN dénombrés en milieu + 50% CF par ceux dénombrés en milieu seul.

C. Techniques de biologie moléculaires

1. Construction de *M. tb* surexprimant la GFP, Rv0023 ou Rv0081

Des cellules d'*E. coli* DH5α ont été rendues chimiocompétentes par traitement au chlorure de calcium, puis transformées par choc thermique (2 min à 42°C) avec les plasmides pMV261-rv0023 et pMV261-rv0081. Les transformants ont été sélectionnés en présence de kanamycine, puis cultivées dans le milieu LB. Les plasmides ont été purifiés à l'aide du kit NucleoSpin Plasmid (Macherey-Nagel).

La souche *M. tb* L1-500960 a été rendue électrocompétente par lavages successifs dans du glycérol 10% froid. Les bactéries électrocompétentes ont ensuite été électroporées (2,5 kV, 1 000 Ohm) avec les plasmides pNIP48-gfp (laboratoire RMB), pMV261-rv0023 ou pMV261-rv0081. Les transformants ont été sélectionnées en présence des antibiotiques appropriés (hygromycine ou kanamycine).

Les souches délétées ou complémentées pour le locus TbD1 nous ont été données par l'Institut Pasteur [51]. Les souches délétées ont été construites par recombinaison homologue, remplaçant le locus TbD1 par un gène de résistance à la kanamycine. Le fragment 5'-TbD1 + kan + 3'-TbD1 a été co-électroporé avec le plasmide pJV53-zeo, qui permet l'expression des protéines de recombinaison (RecET). Les clones recombinants ont été sélectionnés sur un milieu contenant de la kanamycine. Le plasmide pJV53-zeo a été éliminé par culture en absence de zéocine. Le cosmide intégratif 2G12, construit à partir du plasmide pYUB412 contient le locus TbD1 et ses régions flanquantes, ainsi que le site attP et l'intégrase (int) nécessaires à l'intégration au niveau du site attB du chromosome bactérien. Les clones recombinants ont été sélectionnés sur un milieu contenant de l'hygromycine.

2. RT-qPCR

Des cultures en phase exponentielle de croissance de *M. tb* lignée 1, H37Rv ou H37Ra ont été traitées avec du BDM88496 (10 µM), N6-(2-Isopentenyl)adenine (2iP) (100 µM) (Sigma) ou DMSO pendant 24h, dans le milieu indiqué.

A l'issue du traitement, l'ARN a été extrait. Les cultures ont été centrifugées et le culot bactérien resuspendu dans 1 mL de fastRNA Pro (MP Biomedicals), transféré dans un tube à billes Lysing Matrix B du même kit, puis stocké à -80°C. Les culots ont été broyés au ribolyseur (FastPrep-24™ MP Biomedicals). Après centrifugation, le surnageant a été récupéré et mélangé à du chloroforme, puis une nouvelle centrifugation a permis de récupérer la phase aqueuse, contenant les acides nucléiques. Cette phase a été homogénéisée à un ratio 1 :1 avec de l'isopropanol. Une centrifugation a été effectuée pour culoter les acides nucléiques, qui ont par la suite été lavés avec de l'éthanol 75%. Les acides nucléiques ont été récupérés dans de l'H_2O RNase free. Les échantillons ont été traités deux fois à la DNase (Invitrogen), afin de ne conserver que les ARNs, puis purifiés sur billes.

Par la suite, l'ARN a été dosé au nanodrop et ajusté à la même concentration dans chaque condition, avant d'être rétro-transcrit en cDNA avec le kit Verso cDNA synthesis (Thermo Fisher Scientific, Réf AB1453A). La qPCR a été réalisée avec l'enzyme SYBR Green I Master mix (Roche, Réf 04887352001), sur le LightCycler® 480 (Roche). Les amorces utilisées pour l'amplification qPCR sont détaillées dans le tableau ci-dessous (**Tableau 7**) Le calcul d'expression génique a été doublement normalisée par l'expression du gène de ménage sigA et la condition contrôle selon la méthode du 2-ΔΔCt.

Tableau 7 : Amorces utilisées pour l'amplification qPCR.

Gène cible	Séquence de l'amorce
mmpS6	dir : 5' CGACATCAAGCCGTTCAACC 3' rev : 5' CAGCCGATGGAATTGCTGTC 3'
***mmpL6* (L1)**	dir : 5' AGCACGTTCAGGACTTCTGG 3' rev : 5' AACTTTCGCGGTTCCTTTGC 3'
***mmpL6* (H37Rv)**	dir : 5' CGTGACCGTAACCTTGGACA 3' rev : 5' GGCGGCAGATAGAAGGAGTC 3'
sigA	dir : 5'ATCGCGCGAAAAACCATCTG 3' rev : 5'TGATCACCTCGACCATGTGC 3'

rv1556	dir : 5' CGAGAGACCGAGTTACTGGC 3' rev : 5' ACAGATCAGCTCCCCCAGTC 3'

D. Caractérisation phénotypique

1. Microscopie à fluorescence

Une culture de *M. tuberculosis* L1-500960 a été diluée à différents inocula, distribués dans une plaque 384 à fond noir (Greiner 81091). Les bactéries ont été mises au contact de différents marqueurs : l'iodure de propidium (PI, Invitrogen, Réf L13152) à 4 µg/mL pendant 10 min à température ambiante ; le SYBR Gold (Invitrogen, Réf S11494) à 10X pendant 5 min à température ambiante ; la fluorescéine diacétate (FDA, Sigma-Aldrich, Réf F7378) à 25 µg/mL pendant 15 min à 37°C. Les images ont été acquises à l'aide du microscope IN Cell Analyzer 6500 (Cytiva), au grossissement 20x, à Ex488-Em550 pour le FDA et le SYBR Gold et Ex561-Em630 pour le PI. Les images ont ensuite été analysées à l'aide du logiciel Columbus.

2. Cytométrie en flux

Cinétique de *M. tb* dans un état DCTB ou en présence de CF

Un aliquot de *M.tb* L1-500960 âgée de 4 semaines de culture dans un milieu 7H9-OADC, traitée 4 jours avec 5 µg/mL d'INH, puis 2h à 50°C et une culture de *M.tb* L1-500960 en phase exponentielle de croissance sont préparés (trois lavages, cinq passage à travers la seringue). Les bactéries ont été diluées à 10^4 bactéries/mL puis mises en contact pendant 24h avec du milieu standard 7H9-OADC ou 7H9-OADC + 50% CF. Les bactéries ont été distribuées en plaque 384 puits.

A différents temps de cinétique (0, 3, 7, 10 ou 14 jours), les marqueurs ont été ajoutés dans les plaques. Le FDA a été distribué à une concentration finale de 1,35 µM, suivi d'une incubation de 45 min à 37°C, dans le noir. Le PI a été utilisé à une concentration finale de 35 µM et ajouté extemporanément. Un contrôle de bactéries non marquées a été inclus. Les plaques ont été lues sur le cytomètre (Novocyte Quanteon Agilent) avec les canaux FITC (Ex488-Ex519 nm) et PE-Texas Red (Ex561-Ex615 nm), puis les résultats ont été analysés sur le logiciel NovoExpress (Agilent). Les débris ont été exclus de l'analyse.

Caractérisation phénotypique des populations de *M. tb*

Différentes cultures de *M. tb* ont été préparées : i) phase exponentielle de croissance en milieu Sauton ; ii) phénotype DCTB par dilution à 10^3 bactéries/mL en milieu Sauton pendant 7 jours, en présence ; iii) ou non de 10% d'OADC et ; iv) bactéries en croissance exponentielle « heat-killed » avec un traitement de 30 min à 90°C. Ces différentes cultures ont été centrifugées à 4000 g, 10 min, 4°C et resuspendues dans PBS + Tween 80 (0,05% v/v). Les bactéries ont ensuite été marquées à l'iodure de propidium (20 µg/mL, 15 min à température ambiante), au CellROX™ Deep Red (Invitrogen, Réf C10422, 5 µM, 45 min à 37°C), au rouge de Nile (NR, 5 µg/mL, 45 min à 37°C) ou à la fluorescéine diacétate (1,35 µM, 45 min à 37°C). Un contrôle de bactéries non marquées a été inclus. Après le marquage, les échantillons ont été centrifugés à 10 000 g, 2 min, pour enlever le surplus de marquage et fixés dans du paraformaldéhyde (PFA, Thermo Fisher Scientific) à 4% final, pendant au moins 30 min. Ensuite, les échantillons ont été passés dans le cytomètre spectral (Cytek Aurora™ CS). Les résultats ont été analysés sur le logiciel NovoExpress : PI (canal YG3-A, Ex561-Ex615 nm), CellROX™ Deep Red (canal R1-A, Ex637-Ex660 nm), NR (canal YG3-A, Ex561-Ex615 nm). FDA (canal B2-A, Ex488-Ex525 nm). Les débris ont été exclus de l'analyse.

Les acquisitions sur le cytomètre Cytek Aurora™ CS ont été effectuées par le Dr Olivier Molendi-Coste (PLBS-BiCeL).

3. Efficacité des antibiotiques sur les souches

Les antibiotiques ont été distribués à différentes concentrations dans des plaques 384 puits à l'aide du Nanodispenser Echo 550. Les souches de *M. tb* 79112, 79112ΔTbD1, H37Rv et H37Rv-c ont été cultivées en milieu 7H9-OADC, jusqu'en phase exponentielle de croissance. Ensuite, les cultures ont été diluées à une DO_{600} de 0,02, et distribuées dans les puits d'une plaque 384 contenant les antibiotiques aux différentes concentrations. Après 7 jours d'incubation à 37°C, la croissance bactérienne a été mesurée par lecture de l'auto-fluorescence. Les CMI rapportées correspondent à la première concentration d'antibiotique pour laquelle aucune croissance n'a été mesurée.

E. Test d'activité des hits du criblage

Les molécules identifiées lors du criblage ont été fournies par l'équipe du Dr Nicolas Willand (U1177). Les molécules ont été distribués dans des plaques 384 puits en dose-réponse, de 50 µM à 0,39 µM, à l'aide du Nanodispenser Echo 550 (Labcyte). Le DMSO a été ajusté à une concentration finale de 0,5% dans tous les puits. *M. tb* a été cultivée en milieu Sauton jusqu'à atteindre une DO_{600} comprise entre 1 et 1,5, puis diluée à 10^3 bactéries/mL. Les bactéries ont été distribuées dans les plaques contenant les composés, ou en présence de 50% CF Sauton + 10% OADC. Les plaques ont été incubées à 37°C pendant 14 jours avant la lecture de la fluorescence GFP, puis 14 jours supplémentaires avant la lecture de la DO_{600}.

F. Détection et purification du ligand de Rv1556

1. Purification de Rv1556

La protéine recombinante Rv1556-6His (22,3 kDa), clonée dans le plasmide d'expression pEt15b a été produite chez *E. coli* BL21. L'expression a été induite par addition d'IPTG (isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside) à 0,5 mM lorsque la culture atteignait une DO_{600} d'environ 0,6, puis incubée pendant 3h à 37°C. Après centrifugation et lyse cellulaire, la protéine a été purifiée par chromatographie d'affinité sur résine Ni^{2+}-NTA (Cytiva, Réf 17-5248-02), éluée par de l'imidazole à 250 mM, suivie d'une purification par gel filtration. Le tampon utilisé pour la protéine est composé de 50 mM Tris-HCl et 200 mM NaCl, ajusté à pH 7,5. La pureté et la taille apparente de Rv1556 ont été vérifiées par SDS-PAGE 12%, révélé au bleu de Coomassie (**Figure 72**).

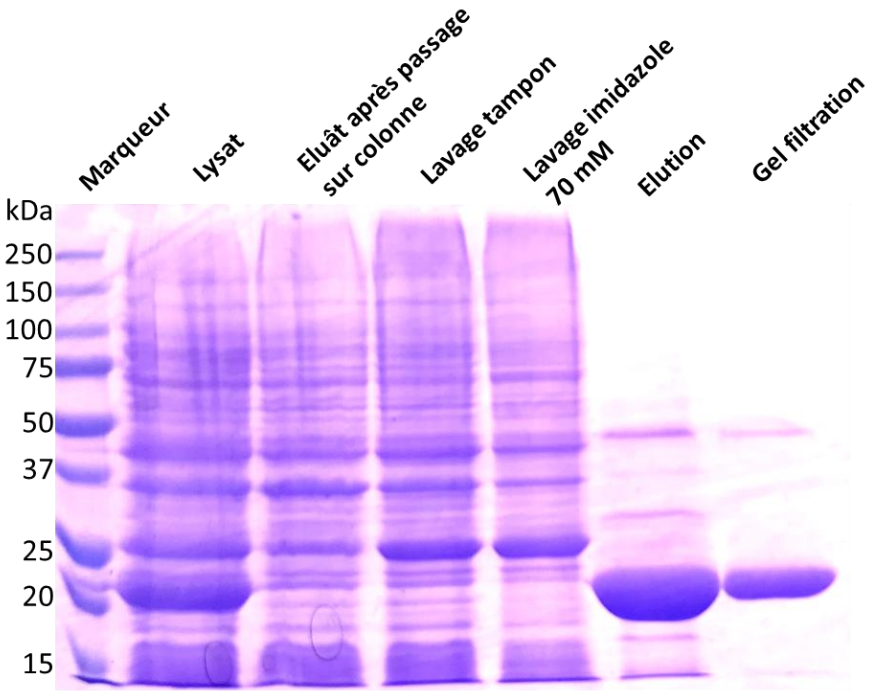


Figure 72 : Etapes de purification de Rv1556 sur gel SDS-PAGE.
Les échantillons récoltés à différentes étapes de la purification de Rv1556 ont été déposés sur un gel de polyacrylamide 12% : lysat cellulaire total, éluât après passage du lysat sur la colonne, lavage de la colonne avec du tampon protéique, lavage de la colonne avec 70 mM d'imidazole, élution de la protéine avec 250 mM d'imidazole, purification par gel filtration. La migration a été effectuée dans un tampon SDS, puis le gel a été révélé au bleu de Coomassie.

2. Concentration du surnageant

Le surnageant d'une culture de *M. tb* H37Ra cultivée dans un milieu 7H9-OADC et amené à une DO_{600} entre 0,6 et 1 a d'abord été déprotéiné, afin d'éliminer la BSA présente dans le milieu. Un volume égal d'acétonitrile a été ajouté au surnageant et mélangé par rotation sur la nuit. Le mélange a été centrifugé et la partie aqueuse, déplétée en protéine a été récupérée. Cette fraction a été concentrée à 60°C et 1300 rpm pendant plusieurs heures dans le SpeedVac™, jusqu'à évaporation complète du liquide. Le culot a été resuspendu dans de l'H_2O, ce qui constitue la fraction hydrosoluble. Le reste du culot non solubilisé a été dissout dans du DMSO et constitue la fraction insoluble. Au final, le surnageant a été concentré 1 000 fois.

3. *Thermal Shift Assay*

Rv1556 a été utilisée à une concentration finale de 10 µM. Le mélange réactionnel est composé du tampon protéique Tris NaCl précédemment décrit, de la sonde fluorescence SYPRO Orange (Invitrogen, Réf S6650) à une concentration finale de 2,5X et de DMSO à 5%. La protéine a été mise en présence de la fraction de surnageant concentrée à 5% final, de BDM88496 à 10 ou 50 µM final, ou de 2iP à 1, 10 ou 100 µM final, pendant 15 min. La fluorescence (Ex498-Em640) de la sonde en fonction de la température a été mesurée sur le LightCycler® 480. Les dérivées premières de ces courbes d'intensité de fluorescence ont été calculées pour déterminer la température de fusion de la protéine.

4. Retard sur gel

La sonde d'ADN a été générée à partir d'un motif consensus retrouvé sur le promoteur de *rv1556* et *mmpS6/L6* déterminé par le logiciel GLAM2Scan. Le motif choisi est celui présent sur le promoteur de *rv1556*, 5' ACGGTACGGTACGGACCTGTACCACCACAACGGTTC 3'.

La protéine Rv1556 a été utilisée à une concentration finale de 3 µM et incubée pendant 5 min en présence de différentes concentrations en surnageant concentré ou du ligand BDM88496 à 50 µM. Le mélange réactionnel contenait le tampon Tris NaCl, $MgCl_2$ à 10 mM et DMSO à 5%. La sonde d'ADN d'ADN double brin correspondant au promoteur de *rv1556* a ensuite été ajoutée à une concentration finale de 10µM, puis le mélange a été incubé 25 min à température ambiante. Les différentes réactions ont été déposées sur un gel de polyacrylamide natif à 10%, préparé dans un tampon Tris-glycine. Après migration, le gel a été coloré au bromure d'éthidium. L'intensité relative des bandes correspondant aux complexes ADN-protéine a été mesurée à l'aide du logiciel ImageJ

5. Test de purification du ligand

Cette expérience a été effectuée avec le Dr Camille Grosse.

Une culture de 1,5L de *M. tb* H37Ra a été effectuée dans un milieu 7H9-Glucose, en l'absence ou en présence de 100 µM de 2iP. Cette culture a été centrifugée à 4 000g pendant 10 min. Le surnageant a été doublement filtré sur une membrane 0,22 µm et

traité à l'inhibiteur de protéase (Complete EDTA-free, Roche). Le culot bactérien a été resuspendu dans le tampon protéique (Tris 50mM, NaCl 200 mM, pH 7.5), aliquoté dans des tubes Lysing Matrix B, puis lysé mécaniquement à l'aide d'un ribolyser. Le lysat a été centrifugé à 4 000g pendant 2 min et le surnageant dépourvu de billes a été récupéré, puis ultracentrifuger à 40 000g pendant 20 min à 4°C. Le surnageant obtenu a ensuite été dilué 10 fois dans le tampon protéique, traité à l'inhibiteur de protéase et son pH ajusté entre 7 et 7,4.

Les colonnes de Ni-NTA ont été préparées dans des tubes vides (Roth, Réf : 1516.1), dans lesquels nous avons ajouté 1,5 mL de volume de billes d'agarose Ni-NTA (Qiagen, Réf 30210). Après sédimentation des billes, 1 cm de sable (ChemLab, Réf : CL00.2631.1000) a été ajouté afin que le niveau de la colonne reste droit. Les colonnes ont été rincées avec du tampon protéique, puis du tampon contenant 20 mM d'imidazole, avant équilibrage.

Les fractions de surnageant et de lysat bactérien ont ensuite été passées sur les différentes colonnes, et les éluats collectés (fraction 2).

Sur certaines colonnes, Rv1556-6His (4 mg) a été greffée par incubation de 30 min, avant rinçage avec le tampon. Les différents échantillons ont ensuite été passés sur la colonne, puis les éluats ont été collectés. Après un lavage abondant avec le tampon, certaines colonnes ont été incubées avec 10 M d'urée, afin de dénaturer la protéine et libérer les ligands associés. L'éluât correspondant a été récupéré, suivi d'un lavage avec du tampon, puis d'un passage de 20 mM d'imidazole pour récupérer Rv1556.

G. Analyse statistique

Tous les graphiques et les analyses statistiques ont été réalisés à l'aide du logiciel GraphPad Prism version 10.4.2 (GraphPad Software, San Diego, Californie, États-Unis). Les données sont présentées sous forme de moyenne ± écart-type. Les seuils de positivités ont été calculé comme suit, (médiane + 3*SEM)*2, en fonction de la valeur mesurée pour le milieu seul ou le contrôle négatif. Les comparaisons entre les groupes ont été effectuées à l'aide d'une ANOVA à deux facteurs, suivie d'un test de comparaisons multiples de Sidak lorsque cela était approprié. Les analyses ont été réalisées en partant du principe d'une distribution normale et d'une homogénéité des variances. Une valeur $p < 0,05$ a été considérée comme statistiquement significative.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Barberis, I., Bragazzi, N.L., Galluzzo, L., and Martini, M. (2017). The history of tuberculosis: from the first historical records to the isolation of Koch's bacillus. J Prev Med Hyg *58*, E9–E12.
2. WHO (2025). Tuberculosis (TB). https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/tuberculosis.
3. Wirth, T., Hildebrand, F., Allix-Béguec, C., Wölbeling, F., Kubica, T., Kremer, K., Soolingen, D. van, Rüsch-Gerdes, S., Locht, C., Brisse, S., et al. (2008). Origin, Spread and Demography of the Mycobacterium tuberculosis Complex. PLOS Pathogens *4*, e1000160. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000160.
4. Comas, I., Coscolla, M., Luo, T., Borrell, S., Holt, K.E., Kato-Maeda, M., Parkhill, J., Malla, B., Berg, S., Thwaites, G., et al. (2013). Out-of-Africa migration and Neolithic co-expansion of Mycobacterium tuberculosis with modern humans. Nat Genet *45*, 1176–1182. https://doi.org/10.1038/ng.2744.
5. Morse, D., Brothwell, D.R., and Ucko, P.J. (1964). TUBERCULOSIS IN ANCIENT EGYPT. Am Rev Respir Dis *90*, 524–541. https://doi.org/10.1164/arrd.1964.90.4.524.
6. Zimmerman, M.R. (1979). Pulmonary and osseous tuberculosis in an Egyptian mummy. Bull N Y Acad Med *55*, 604–608.
7. Zink, A.R., Sola, C., Reischl, U., Grabner, W., Rastogi, N., Wolf, H., and Nerlich, A.G. (2003). Characterization of Mycobacterium tuberculosis Complex DNAs from Egyptian Mummies by Spoligotyping. J Clin Microbiol *41*, 359–367. https://doi.org/10.1128/JCM.41.1.359-367.2003.
8. Daniel, T.M., and Iversen, P.A. (2015). Hippocrates and tuberculosis. Int J Tuberc Lung Dis *19*, 373–374. https://doi.org/10.5588/ijtld.14.0736.
9. Frith, J. (2014). History of tuberculosis. Part 1 - phthisis, consumption and the white plague. Journal of Military and Veterans Health *22*, 29–35. https://doi.org/10.3316/informit.430338287813994.
10. Laennec, R.-T.-H. (1819). De l'auscultation médiate ou Traité du diagnostic des maladies des poumons et du coeur, fondé principalement sur ce nouveau moyen d'exploration. J.-A. Brosson et J.-S. Chaudé.
11. Cambau, E., and Drancourt, M. (2014). Steps towards the discovery of Mycobacterium tuberculosis by Robert Koch, 1882. Clin Microbiol Infect *20*, 196–201. https://doi.org/10.1111/1469-0691.12555.
12. Koch, R. (1882). Die Ätiologie der Tuberkulose. Berliner klinische Wochenschrift *15*, 221–230. https://doi.org/10.25646/5088.
13. Koch, R. (1884). Die Ätiologie der Tuberkulose. Mittbeihgen aus dem Kaiserlichen Gesundbeitsamte, *2*, 1–88.
14. Boire, N.A., Riedel, V.A.A., and Parrish, N.M. (2013). Tuberculosis: From an Untreatable Disease in Antiquity to an Untreatable Disease in Modern Times? Journal of Infectious Diseases & Preventive Medicine *1*, 1–11. https://doi.org/10.4172/2329-8731.1000106.

15. Pease, A.S. (1940). Some Remarks on the Diagnosis and Treatment of Tuberculosis in Antiquity. Isis *31*, 380–393.

16. Villemin, J.-A. (1865). Cause et nature de la tuberculose. Bulletin de l'Académie nationale de médecine, 211–216.

17. Churchyard, G., Kim, P., Shah, N.S., Rustomjee, R., Gandhi, N., Mathema, B., Dowdy, D., Kasmar, A., and Cardenas, V. (2017). What We Know About Tuberculosis Transmission: An Overview. J Infect Dis *216*, S629–S635. https://doi.org/10.1093/infdis/jix362.

18. Torrelles, J.B., and Schlesinger, L.S. (2017). Integrating Lung Physiology, Immunology and Tuberculosis. Trends Microbiol *25*, 688–697. https://doi.org/10.1016/j.tim.2017.03.007.

19. Turner, R.D., Chiu, C., Churchyard, G.J., Esmail, H., Lewinsohn, D.M., Gandhi, N.R., and Fennelly, K.P. (2017). Tuberculosis Infectiousness and Host Susceptibility. J Infect Dis *216*, S636–S643. https://doi.org/10.1093/infdis/jix361.

20. Yates, T.A., Khan, P.Y., Knight, G.M., Taylor, J.G., McHugh, T.D., Lipman, M., White, R.G., Cohen, T., Cobelens, F.G., Wood, R., et al. (2016). The transmission of <i>Mycobacterium tuberculosis in high burden settings. The Lancet Infectious Diseases *16*, 227–238. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(15)00499-5.

21. Mol, A., Sánchez-Montalvá, A., Espinosa-Pereiro, J., Aznar, M.L., Salvador, F., Bosch-Nicolau, P., de Souza-Galvão, M.-L., Jiménez, M.Á., Rodrigo-Pendás, J.Á., Millet, J.-P., et al. (2024). Usefulness of Xpert MTB/RIF and Xpert Ultra to Categorize Risk of Tuberculosis Transmission to Household Contacts. Open Forum Infect Dis *11*, ofae450. https://doi.org/10.1093/ofid/ofae450.

22. Tostmann, A., Kik, S.V., Kalisvaart, N.A., Sebek, M.M., Verver, S., Boeree, M.J., and van Soolingen, D. (2008). Tuberculosis transmission by patients with smear-negative pulmonary tuberculosis in a large cohort in the Netherlands. Clin Infect Dis *47*, 1135–1142. https://doi.org/10.1086/591974.

23. Fennelly, K.P., and Jones-López, E.C. (2015). Quantity and Quality of Inhaled Dose Predicts Immunopathology in Tuberculosis. Front. Immunol. *6*. https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00313.

24. Zelner, J.L., Murray, M.B., Becerra, M.C., Galea, J., Lecca, L., Calderon, R., Yataco, R., Contreras, C., Zhang, Z., Grenfell, B.T., et al. (2014). Age-Specific Risks of Tuberculosis Infection From Household and Community Exposures and Opportunities for Interventions in a High-Burden Setting. Am J Epidemiol *180*, 853–861. https://doi.org/10.1093/aje/kwu192.

25. Jilani, T.N., Avula, A., Zafar Gondal, A., and Siddiqui, A.H. (2025). Active Tuberculosis. In StatPearls (StatPearls Publishing).

26. WHO (2024). Global Tuberculosis Report 2024.

27. Kirby, T. (2021). Global tuberculosis progress reversed by COVID-19 pandemic. Lancet Respir Med *9*, e118–e119. https://doi.org/10.1016/S2213-2600(21)00496-3.

28. Fitzgerald, D.W., Sterling, T.R., and Haas, D.W. (2015). Mycobacterium tuberculosis. In Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases, pp. 2787–2818.

29. Zumla, A., Sahu, S., Ditiu, L., Singh, U., Park, Y.-J., Yeboah-Manu, D., Osei-Wusu, S., Asogun, D., Nyasulu, P., Tembo, J., et al. (2025). Inequities underlie the alarming resurgence of Tuberculosis as the world's top cause of death from an Infectious Disease - Breaking the silence and addressing the underlying root causes. IJID Reg *14*, 100587. https://doi.org/10.1016/j.ijregi.2025.100587.

30. WHO (2014). The End TB Strategy. https://www.who.int/teams/global-programme-on-tuberculosis-and-lung-health/the-end-tb-strategy.

31. Cole, S.T., Brosch, R., Parkhill, J., Garnier, T., Churcher, C., Harris, D., Gordon, S.V., Eiglmeier, K., Gas, S., Barry, C.E., et al. (1998). Deciphering the biology of Mycobacterium tuberculosis from the complete genome sequence. Nature *393*, 537–544. https://doi.org/10.1038/31159.

32. Llorens-Fons, M., Pérez-Trujillo, M., Julián, E., Brambilla, C., Alcaide, F., Byrd, T.F., and Luquin, M. (2017). Trehalose Polyphleates, External Cell Wall Lipids in Mycobacterium abscessus, Are Associated with the Formation of Clumps with Cording Morphology, Which Have Been Associated with Virulence. Front. Microbiol. *8*. https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01402.

33. Parmar, S., and Tocheva, E.I. (2023). The cell envelope of Mycobacterium abscessus and its role in pathogenesis. PLoS Pathog *19*, e1011318. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1011318.

34. Daffé, M., and Marrakchi, H. (2019). Unraveling the Structure of the Mycobacterial Envelope. Microbiology Spectrum *7*, 10.1128/microbiolspec.gpp3-0027–2018. https://doi.org/10.1128/microbiolspec.gpp3-0027-2018.

35. Dulberger, C.L., Rubin, E.J., and Boutte, C.C. (2020). The mycobacterial cell envelope - a moving target. Nat Rev Microbiol *18*, 47–59. https://doi.org/10.1038/s41579-019-0273-7.

36. Bishop, P.J., and Neumann, G. (1970). The history of the Ziehl-Neelsen stain. Tubercle *51*, 196–206. https://doi.org/10.1016/0041-3879(70)90073-5.

37. Laifangbam, S., Singh, H.L., Singh, N.B., Devi, K.M., and Singh, N.T. (2009). A comparative study of fluorescent microscopy with Ziehl-Neelsen staining and culture for the diagnosis of pulmonary tuberculosis. Kathmandu Univ Med J (KUMJ) *7*, 226–230. https://doi.org/10.3126/kumj.v7i3.2728.

38. Roy, D., Prakash, S.M., Somanna, P., Raj, J.A., Malave, N., and Theresa, K.S.J. (2024). Comparison of Two Staining Methods (Ziehl–Neelsen Staining and Auramine O Staining) in Detecting Mycobacterium tuberculosis in Cytology Samples: A Cross-sectional Study. The Journal of Medical Sciences *10*, 142–145. https://doi.org/10.5005/jp-journals-10045-00305.

39. Hug, L.A., Baker, B.J., Anantharaman, K., Brown, C.T., Probst, A.J., Castelle, C.J., Butterfield, C.N., Hernsdorf, A.W., Amano, Y., Ise, K., et al. (2016). A new view of the tree of life. Nat Microbiol *1*, 16048. https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.48.

40. Magee, J.G., and Ward, A.C. (2012). Mycobacteriaceae Chester 1897, 63AL. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume 5: The Actinobacteria (Springer), p. 312.

41. Gutierrez, M.C., Supply, P., and Brosch, R. (2009). Pathogenomics of Mycobacteria. https://doi.org/10.1159/000235772.

42. Brosch, R., Gordon, S.V., Marmiesse, M., Brodin, P., Buchrieser, C., Eiglmeier, K., Garnier, T., Gutierrez, C., Hewinson, G., Kremer, K., et al. (2002). A new evolutionary scenario for the Mycobacterium tuberculosis complex. Proc Natl Acad Sci U S A *99*, 3684–3689. https://doi.org/10.1073/pnas.052548299.

43. Meehan, C.J., Goig, G.A., Kohl, T.A., Verboven, L., Dippenaar, A., Ezewudo, M., Farhat, M.R., Guthrie, J.L., Laukens, K., Miotto, P., et al. (2019). Whole genome sequencing of Mycobacterium tuberculosis: current standards and open issues. Nat Rev Microbiol *17*, 533–545. https://doi.org/10.1038/s41579-019-0214-5.

44. Orgeur, M., Sous, C., Madacki, J., and Brosch, R. (2024). Evolution and emergence of Mycobacterium tuberculosis. FEMS Microbiol Rev *48*, fuae006. https://doi.org/10.1093/femsre/fuae006.

45. Boritsch, E.C., and Brosch, R. (2016). Evolution of Mycobacterium tuberculosis: New Insights into Pathogenicity and Drug Resistance. Microbiology Spectrum *4*, 10.1128/microbiolspec.tbtb2-0020–2016. https://doi.org/10.1128/microbiolspec.tbtb2-0020-2016.

46. Gutierrez, M.C., Brisse, S., Brosch, R., Fabre, M., Omaïs, B., Marmiesse, M., Supply, P., and Vincent, V. (2005). Ancient Origin and Gene Mosaicism of the Progenitor of Mycobacterium tuberculosis. PLoS Pathog *1*, e5. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0010005.

47. Supply, P., Marceau, M., Mangenot, S., Roche, D., Rouanet, C., Khanna, V., Majlessi, L., Criscuolo, A., Tap, J., Pawlik, A., et al. (2013). Genomic analysis of smooth tubercle bacilli provides insights into ancestry and pathoadaptation of Mycobacterium tuberculosis. Nat Genet *45*, 172–179. https://doi.org/10.1038/ng.2517.

48. Koleske, B.N., Jacobs, W.R., and Bishai, W.R. (2023). The *Mycobacterium tuberculosis* genome at 25 years: lessons and lingering questions. J Clin Invest *133*. https://doi.org/10.1172/JCI173156.

49. Gröschel, M.I., Pérez-Llanos, F.J., Diel, R., Vargas, R., Escuyer, V., Musser, K., Trieu, L., Meissner, J.S., Knorr, J., Klinkenberg, D., et al. (2024). Differential rates of Mycobacterium tuberculosis transmission associate with host-pathogen sympatry. Nat Microbiol *9*, 2113–2127. https://doi.org/10.1038/s41564-024-01758-y.

50. Gagneux, S., and Small, P.M. (2007). Global phylogeography of Mycobacterium tuberculosis and implications for tuberculosis product development. Lancet Infect Dis *7*, 328–337. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(07)70108-1.

51. Bottai, D., Frigui, W., Sayes, F., Di Luca, M., Spadoni, D., Pawlik, A., Zoppo, M., Orgeur, M., Khanna, V., Hardy, D., et al. (2020). TbD1 deletion as a driver of the evolutionary success of modern epidemic Mycobacterium tuberculosis lineages. Nat Commun *11*, 684. https://doi.org/10.1038/s41467-020-14508-5.

52. Coscolla, M., Gagneux, S., Menardo, F., Loiseau, C., Ruiz-Rodriguez, P., Borrell, S., Otchere, I.D., Asante-Poku, A., Asare, P., Sánchez-Busó, L., et al. (2021). Phylogenomics of Mycobacterium africanum reveals a new lineage and a complex evolutionary history. Microb Genom *7*, 000477. https://doi.org/10.1099/mgen.0.000477.

53. Guyeux, C., Senelle, G., Le Meur, A., Supply, P., Gaudin, C., Phelan, J.E., Clark, T.G., Rigouts, L., de Jong, B., Sola, C., et al. (2024). Newly Identified Mycobacterium

africanum Lineage 10, Central Africa. Emerg Infect Dis *30*, 560–563. https://doi.org/10.3201/eid3003.231466.

54. Ngabonziza, J.C.S., Loiseau, C., Marceau, M., Jouet, A., Menardo, F., Tzfadia, O., Antoine, R., Niyigena, E.B., Mulders, W., Fissette, K., et al. (2020). A sister lineage of the Mycobacterium tuberculosis complex discovered in the African Great Lakes region. Nat Commun *11*, 2917. https://doi.org/10.1038/s41467-020-16626-6.

55. Wiens, K.E., Woyczynski, L.P., Ledesma, J.R., Ross, J.M., Zenteno-Cuevas, R., Goodridge, A., Ullah, I., Mathema, B., Djoba Siawaya, J.F., Biehl, M.H., et al. (2018). Global variation in bacterial strains that cause tuberculosis disease: a systematic review and meta-analysis. BMC Medicine *16*, 196. https://doi.org/10.1186/s12916-018-1180-x.

56. Minch, K.J., Rustad, T.R., Peterson, E.J.R., Winkler, J., Reiss, D.J., Ma, S., Hickey, M., Brabant, W., Morrison, B., Turkarslan, S., et al. (2015). The DNA-binding network of Mycobacterium tuberculosis. Nat Commun *6*, 5829. https://doi.org/10.1038/ncomms6829.

57. Shell, S.S., Wang, J., Lapierre, P., Mir, M., Chase, M.R., Pyle, M.M., Gawande, R., Ahmad, R., Sarracino, D.A., Ioerger, T.R., et al. (2015). Leaderless Transcripts and Small Proteins Are Common Features of the Mycobacterial Translational Landscape. PLoS Genet *11*, e1005641. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005641.

58. Kapopoulou, A., Lew, J.M., and Cole, S.T. (2011). The MycoBrowser portal: a comprehensive and manually annotated resource for mycobacterial genomes. Tuberculosis (Edinb) *91*, 8–13. https://doi.org/10.1016/j.tube.2010.09.006.

59. Melly, G., and Purdy, G.E. (2019). MmpL Proteins in Physiology and Pathogenesis of M. tuberculosis. Microorganisms *7*. https://doi.org/10.3390/microorganisms7030070.

60. Székely, R., and Cole, S.T. (2016). Mechanistic insight into mycobacterial MmpL protein function. Mol Microbiol *99*, 831–834. https://doi.org/10.1111/mmi.13306.

61. Domenech, P., Reed, M.B., and Barry, C.E. (2005). Contribution of the Mycobacterium tuberculosis MmpL protein family to virulence and drug resistance. Infect Immun *73*, 3492–3501. https://doi.org/10.1128/IAI.73.6.3492-3501.2005.

62. Viljoen, A., Dubois, V., Girard-Misguich, F., Blaise, M., Herrmann, J.-L., and Kremer, L. (2017). The diverse family of MmpL transporters in mycobacteria: from regulation to antimicrobial developments. Mol Microbiol *104*, 889–904. https://doi.org/10.1111/mmi.13675.

63. Delmar, J.A., Chou, T.-H., Wright, C.C., Licon, M.H., Doh, J.K., Radhakrishnan, A., Kumar, N., Lei, H.-T., Bolla, J.R., Rajashankar, K.R., et al. (2015). Structural Basis for the Regulation of the MmpL Transporters of Mycobacterium tuberculosis. J Biol Chem *290*, 28559–28574. https://doi.org/10.1074/jbc.M115.683797.

64. Richard, M., Gutiérrez, A.V., Viljoen, A.J., Ghigo, E., Blaise, M., and Kremer, L. (2018). Mechanistic and Structural Insights Into the Unique TetR-Dependent Regulation of a Drug Efflux Pump in Mycobacterium abscessus. Front Microbiol *9*, 649. https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00649.

65. Ramos, J.L., Martínez-Bueno, M., Molina-Henares, A.J., Terán, W., Watanabe, K., Zhang, X., Gallegos, M.T., Brennan, R., and Tobes, R. (2005). The TetR family of

transcriptional repressors. Microbiol Mol Biol Rev *69*, 326–356. https://doi.org/10.1128/MMBR.69.2.326-356.2005.

66. Balhana, R.J.C., Singla, A., Sikder, M.H., Withers, M., and Kendall, S.L. (2015). Global analyses of TetR family transcriptional regulators in mycobacteria indicates conservation across species and diversity in regulated functions. BMC Genomics *16*, 479. https://doi.org/10.1186/s12864-015-1696-9.

67. Ryndak, M.B., and Laal, S. (2019). Mycobacterium tuberculosis Primary Infection and Dissemination: A Critical Role for Alveolar Epithelial Cells. Front. Cell. Infect. Microbiol. *9*. https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00299.

68. Luo, Y., Suliman, S., Asgari, S., Amariuta, T., Baglaenko, Y., Martínez-Bonet, M., Ishigaki, K., Gutierrez-Arcelus, M., Calderon, R., Lecca, L., et al. (2019). Early progression to active tuberculosis is a highly heritable trait driven by 3q23 in Peruvians. Nat Commun *10*, 3765. https://doi.org/10.1038/s41467-019-11664-1.

69. Sankar, P., and Mishra, B.B. (2023). Early innate cell interactions with Mycobacterium tuberculosis in protection and pathology of tuberculosis. Front Immunol *14*, 1260859. https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1260859.

70. Pai, M., Behr, M.A., Dowdy, D., Dheda, K., Divangahi, M., Boehme, C.C., Ginsberg, A., Swaminathan, S., Spigelman, M., Getahun, H., et al. (2016). Tuberculosis. Nat Rev Dis Primers *2*, 16076. https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.76.

71. Carranza, C., and Chavez-Galan, L. (2019). Several Routes to the Same Destination: Inhibition of Phagosome-Lysosome Fusion by Mycobacterium tuberculosis. Am J Med Sci *357*, 184–194. https://doi.org/10.1016/j.amjms.2018.12.003.

72. Houben, D., Demangel, C., van Ingen, J., Perez, J., Baldeón, L., Abdallah, A.M., Caleechurn, L., Bottai, D., van Zon, M., de Punder, K., et al. (2012). ESX-1-mediated translocation to the cytosol controls virulence of mycobacteria. Cell Microbiol *14*, 1287–1298. https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2012.01799.x.

73. Simeone, R., Bobard, A., Lippmann, J., Bitter, W., Majlessi, L., Brosch, R., and Enninga, J. (2012). Phagosomal Rupture by Mycobacterium tuberculosis Results in Toxicity and Host Cell Death. PLOS Pathogens *8*, e1002507. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002507.

74. Cohen, S.B., Gern, B.H., Delahaye, J.L., Adams, K.N., Plumlee, C.R., Winkler, J.K., Sherman, D.R., Gerner, M.Y., and Urdahl, K.B. (2018). Alveolar Macrophages Provide an Early Mycobacterium tuberculosis Niche and Initiate Dissemination. Cell Host Microbe *24*, 439-446.e4. https://doi.org/10.1016/j.chom.2018.08.001.

75. Cronan, M.R. (2022). In the Thick of It: Formation of the Tuberculous Granuloma and Its Effects on Host and Therapeutic Responses. Front Immunol *13*, 820134. https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.820134.

76. Delgado, B.J., and Bajaj, T. (2025). Ghon Complex. In StatPearls (StatPearls Publishing).

77. Shim, D., Kim, H., and Shin, S.J. (2020). Mycobacterium tuberculosis Infection-Driven Foamy Macrophages and Their Implications in Tuberculosis Control as Targets for Host-Directed Therapy. Front Immunol *11*, 910. https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00910.

78. Esmail, H., Barry, C.E., Young, D.B., and Wilkinson, R.J. (2014). The ongoing challenge of latent tuberculosis. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci *369*, 20130437. https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0437.

79. Shleeva, M.O., Salina, E.G., and Kaprelyants, A.S. (2010). Dormant forms of mycobacteria. Microbiology *79*, 1–12. https://doi.org/10.1134/S0026261710010017.

80. Dartois, V.A., and Rubin, E.J. (2022). Anti-tuberculosis treatment strategies and drug development: challenges and priorities. Nat Rev Microbiol *20*, 685–701. https://doi.org/10.1038/s41579-022-00731-y.

81. de Martino, M., Lodi, L., Galli, L., and Chiappini, E. (2019). Immune Response to Mycobacterium tuberculosis: A Narrative Review. Front Pediatr *7*, 350. https://doi.org/10.3389/fped.2019.00350.

82. Lambert, M.-L., Hasker, E., Deun, A.V., Roberfroid, D., Boelaert, M., and Van Der Stuyft, P. (2003). Recurrence in tuberculosis: relapse or reinfection? The Lancet Infectious Diseases *3*, 282–287. https://doi.org/10.1016/s1473-3099(03)00607-8.

83. Sonnenberg, P., Glynn, J.R., Fielding, K., Murray, J., Godfrey-Faussett, P., and Shearer, S. (2005). How soon after infection with HIV does the risk of tuberculosis start to increase? A retrospective cohort study in South African gold miners. J Infect Dis *191*, 150–158. https://doi.org/10.1086/426827.

84. Keane, J., Gershon, S., Wise, R.P., Mirabile-Levens, E., Kasznica, J., Schwieterman, W.D., Siegel, J.N., and Braun, M.M. (2001). Tuberculosis associated with infliximab, a tumor necrosis factor alpha-neutralizing agent. N Engl J Med *345*, 1098–1104. https://doi.org/10.1056/NEJMoa011110.

85. Möller, M., and Hoal, E.G. (2010). Current findings, challenges and novel approaches in human genetic susceptibility to tuberculosis. Tuberculosis *90*, 71–83. https://doi.org/10.1016/j.tube.2010.02.002.

86. Elkington, P., Polak, M.E., Reichmann, M.T., and Leslie, A. (2022). Understanding the tuberculosis granuloma: the matrix revolutions. Trends Mol Med *28*, 143–154. https://doi.org/10.1016/j.molmed.2021.11.004.

87. Baykan, A.H., Sayiner, H.S., Aydin, E., Koc, M., Inan, I., and Erturk, S.M. (2022). Extrapulmonary tuberculosıs: an old but resurgent problem. Insights Imaging *13*, 39. https://doi.org/10.1186/s13244-022-01172-0.

88. Smith, I. (2003). Mycobacterium tuberculosis Pathogenesis and Molecular Determinants of Virulence. Clin Microbiol Rev *16*, 463–496. https://doi.org/10.1128/CMR.16.3.463-496.2003.

89. Golden, M.P., and Vikram, H.R. (2005). Extrapulmonary tuberculosis: an overview. Am Fam Physician *72*, 1761–1768.

90. Gopalaswamy, R., Dusthackeer, V.N.A., Kannayan, S., and Subbian, S. (2021). Extrapulmonary Tuberculosis—An Update on the Diagnosis, Treatment and Drug Resistance. Journal of Respiration *1*, 141–164. https://doi.org/10.3390/jor1020015.

91. Alabd, M.Y. (2025). Extrapulmonary tuberculosis | Radiology Reference Article | Radiopaedia.org. Radiopaedia. https://doi.org/10.53347/rID-39930.

92. Upadhyay, S., Mittal, E., and Philips, J.A. (2018). Tuberculosis and the art of macrophage manipulation. Pathog Dis *76*, fty037. https://doi.org/10.1093/femspd/fty037.

93. Choudhary, E., Sharma, R., Pal, P., and Agarwal, N. (2022). Deciphering the Proteomic Landscape of Mycobacterium tuberculosis in Response to Acid and Oxidative Stresses. ACS Omega *7*, 26749–26766. https://doi.org/10.1021/acsomega.2c03092.

94. Laudouze, J., Canaan, S., Gouzy, A., and Santucci, P. (2025). Unraveling Mycobacterium tuberculosis acid resistance and pH homeostasis mechanisms. FEBS Letters *599*, 1634–1648. https://doi.org/10.1002/1873-3468.70023.

95. Rahman, F. (2024). Characterizing the immune response to Mycobacterium tuberculosis: a comprehensive narrative review and implications in disease relapse. Front Immunol *15*, 1437901. https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1437901.

96. Warner, D.F. (2015). Mycobacterium tuberculosis Metabolism. Cold Spring Harb Perspect Med *5*, a021121. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a021121.

97. Ernst, J.D. (2012). The immunological life cycle of tuberculosis. Nat Rev Immunol *12*, 581–591. https://doi.org/10.1038/nri3259.

98. Lin, Z., Sun, L., Wang, C., Wang, F., Wang, J., Li, Q., and Lu, H. (2023). Bottlenecks and recent advancements in detecting Mycobacterium tuberculosis in patients with HIV. iLABMED *1*, 44–57. https://doi.org/10.1002/ila2.11.

99. Burrill, J., Williams, C.J., Bain, G., Conder, G., Hine, A.L., and Misra, R.R. (2007). Tuberculosis: a radiologic review. Radiographics *27*, 1255–1273. https://doi.org/10.1148/rg.275065176.

100. Jeong, Y.J., and Lee, K.S. (2008). Pulmonary Tuberculosis: Up-to-Date Imaging and Management. American Journal of Roentgenology *191*, 834–844. https://doi.org/10.2214/AJR.07.3896.

101. Cuevas, L.E., Al-Sonboli, N., Lawson, L., Yassin, M.A., Arbide, I., Al-Aghbari, N., Bahadur Sherchand, J., Al-Absi, A., Emenyonu, E.N., Merid, Y., et al. (2011). LED Fluorescence Microscopy for the Diagnosis of Pulmonary Tuberculosis: A Multi-Country Cross-Sectional Evaluation. PLoS Med *8*, e1001057. https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001057.

102. Tortoli, E., Cichero, P., Piersimoni, C., Simonetti, M.T., Gesu, G., and Nista, D. (1999). Use of BACTEC MGIT 960 for Recovery of Mycobacteria from Clinical Specimens: Multicenter Study. J Clin Microbiol *37*, 3578–3582. https://doi.org/10.1128/jcm.37.11.3578-3582.1999.

103. Chengalroyen, M.D., Beukes, G.M., Gordhan, B.G., Streicher, E.M., Churchyard, G., Hafner, R., Warren, R., Otwombe, K., Martinson, N., and Kana, B.D. (2016). Detection and Quantification of Differentially Culturable Tubercle Bacteria in Sputum from Patients with Tuberculosis. Am J Respir Crit Care Med *194*, 1532–1540. https://doi.org/10.1164/rccm.201604-0769OC.

104. Mukamolova, G.V., Turapov, O., Malkin, J., Woltmann, G., and Barer, M.R. (2010). Resuscitation-promoting factors reveal an occult population of tubercle Bacilli in Sputum. Am J Respir Crit Care Med *181*, 174–180. https://doi.org/10.1164/rccm.200905-0661OC.

105. Moore, D.A.J., Evans, C.A.W., Gilman, R.H., Caviedes, L., Coronel, J., Vivar, A., Sanchez, E., Piñedo, Y., Saravia, J.C., Salazar, C., et al. (2006). Microscopic-observation drug-susceptibility assay for the diagnosis of TB. N Engl J Med *355*, 1539–1550. https://doi.org/10.1056/NEJMoa055524.

106. Ketema, W., Woubishet, K., Tesfaye, S., Gutema, S., Taye, K., Shibeshi, M.S., and Tagesse, N. (2022). A Breakthrough in the Challenges of Tuberculosis Diagnosis: Lateral Flow Urine Lipoarabinomannan (LAM) Assay for the Diagnosis of Active Tuberculosis in a Subset of Human Immuno Deficiency Virus (HIV) Patients at Hawassa University Comprehensive Specialized Hospital, Hawassa, Ethiopia. Int Med Case Rep J *15*, 393–397. https://doi.org/10.2147/IMCRJ.S373197.

107. Opota, O., Mazza-Stalder, J., Greub, G., and Jaton, K. (2019). The rapid molecular test Xpert MTB/RIF ultra: towards improved tuberculosis diagnosis and rifampicin resistance detection. Clin Microbiol Infect *25*, 1370–1376. https://doi.org/10.1016/j.cmi.2019.03.021.

108. Luetkemeyer, A.F., Kendall, M.A., Wu, X., Lourenço, M.C., Jentsch, U., Swindells, S., Qasba, S.S., Sanchez, J., Havlir, D.V., Grinsztejn, B., et al. (2014). Evaluation of Two Line Probe Assays for Rapid Detection of Mycobacterium tuberculosis, Tuberculosis (TB) Drug Resistance, and Non-TB Mycobacteria in HIV-Infected Individuals with Suspected TB. J Clin Microbiol *52*, 1052–1059. https://doi.org/10.1128/JCM.02639-13.

109. Nikolayevskyy, V., Kranzer, K., Niemann, S., and Drobniewski, F. (2016). Whole genome sequencing of Mycobacterium tuberculosis for detection of recent transmission and tracing outbreaks: A systematic review. Tuberculosis (Edinb) *98*, 77–85. https://doi.org/10.1016/j.tube.2016.02.009.

110. Feuerriegel, S., Kohl, T.A., Utpatel, C., Andres, S., Maurer, F.P., Heyckendorf, J., Jouet, A., Badalato, N., Foray, L., Fouad Kamara, R., et al. (2021). Rapid genomic first- and second-line drug resistance prediction from clinical Mycobacterium tuberculosis specimens using Deeplex-MycTB. Eur Respir J *57*, 2001796. https://doi.org/10.1183/13993003.01796-2020.

111. CDC (2024). Clinical Testing Guidance for Tuberculosis: Interferon Gamma Release Assay. Tuberculosis (TB). https://www.cdc.gov/tb/hcp/testing-diagnosis/interferon-gamma-release-assay.html.

112. WHO (2013). Systematic screening for active tuberculosis: principles and recommendations (World Health Organization).

113. Murray, J.F., Schraufnagel, D.E., and Hopewell, P.C. (2015). Treatment of Tuberculosis. A Historical Perspective. Ann Am Thorac Soc *12*, 1749–1759. https://doi.org/10.1513/AnnalsATS.201509-632PS.

114. Schön, T., Werngren, J., Machado, D., Borroni, E., Wijkander, M., Lina, G., Mouton, J., Matuschek, E., Kahlmeter, G., Giske, C., et al. (2020). Antimicrobial susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis complex isolates - the EUCAST broth microdilution reference method for MIC determination. Clin Microbiol Infect *26*, 1488–1492. https://doi.org/10.1016/j.cmi.2020.07.036.

115. Heinrichs, M.T., May, R.J., Heider, F., Reimers, T., Sy, S.K.B., Peloquin, C.A., and Derendorf, H. (2018). Mycobacterium tuberculosis Strains H37ra and H37rv have Equivalent Minimum Inhibitory Concentrations to Most Antituberculosis Drugs. The

International Journal of Mycobacteriology *7*, 156. https://doi.org/10.4103/ijmy.ijmy_33_18.

116. EUCAST (2025). EUCAST MIC and zone distributions and ECOFFs — Mycobacterium tuberculosis. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing MIC distribution website. https://mic.eucast.org/search/?search%5Bmethod%5D=mic&search%5Bantibiotic%5D=-1&search%5Bspecies%5D=331&search%5Bdisk_content%5D=-1&search%5Blimit%5D=50.

117. de Miranda Silva, C., Hajihosseini, A., Myrick, J., Nole, J., Louie, A., Schmidt, S., and Drusano, G.L. (2018). Effect of Moxifloxacin plus Pretomanid against Mycobacterium tuberculosis in Log Phase, Acid Phase, and Nonreplicating-Persister Phase in an In Vitro Assay. Antimicrob Agents Chemother *63*, e01695-18. https://doi.org/10.1128/AAC.01695-18.

118. Zhu, Y., Zhu, L., Davies Forsman, L., Paues, J., Werngren, J., Niward, K., Schön, T., Bruchfeld, J., Xiong, H., Alffenaar, J.-W., et al. Population Pharmacokinetics and Dose Evaluation of Cycloserine among Patients with Multidrug-Resistant Tuberculosis under Standardized Treatment Regimens. Antimicrob Agents Chemother *67*, e01700-22. https://doi.org/10.1128/aac.01700-22.

119. Economou Lundeberg, E., Andersson, V., Wijkander, M., Groenheit, R., Mansjö, M., Werngren, J., Cortes, T., Barilar, I., Niemann, S., Merker, M., et al. (2023). In vitro activity of new combinations of β-lactam and β-lactamase inhibitors against the Mycobacterium tuberculosis complex. Microbiology Spectrum *11*, e01781-23. https://doi.org/10.1128/spectrum.01781-23.

120. Feuerriegel, S., Köser, C., Trübe, L., Archer, J., Rüsch Gerdes, S., Richter, E., and Niemann, S. (2010). Thr202Ala in thyA Is a Marker for the Latin American Mediterranean Lineage of the Mycobacterium tuberculosis Complex Rather than Para-Aminosalicylic Acid Resistance. Antimicrobial Agents and Chemotherapy *54*, 4794–4798. https://doi.org/10.1128/aac.00738-10.

121. WHO (2025). WHO consolidated guidelines on tuberculosis: module 4: treatment and care.

122. Rozwarski, D.A., Grant, G.A., Barton, D.H.R., Jacobs, W.R., and Sacchettini, J.C. (1998). Modification of the NADH of the Isoniazid Target (InhA) from Mycobacterium tuberculosis. Science *279*, 98–102. https://doi.org/10.1126/science.279.5347.98.

123. Timmins, G.S., and Deretic, V. (2006). Mechanisms of action of isoniazid. Molecular Microbiology *62*, 1220–1227. https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05467.x.

124. Banerjee, A., Dubnau, E., Quemard, A., Balasubramanian, V., Um, K.S., Wilson, T., Collins, D., de Lisle, G., and Jacobs, W.R. (1994). inhA, a gene encoding a target for isoniazid and ethionamide in Mycobacterium tuberculosis. Science *263*, 227–230. https://doi.org/10.1126/science.8284673.

125. Sensi, P. (1983). History of the Development of Rifampin. Rev Infect Dis *5*, S402–S406. https://doi.org/10.1093/clinids/5.Supplement_3.S402.

126. Campbell, E.A., Korzheva, N., Mustaev, A., Murakami, K., Nair, S., Goldfarb, A., and Darst, S.A. (2001). Structural Mechanism for Rifampicin Inhibition of Bacterial RNA Polymerase. Cell *104*, 901–912. https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00286-0.

127. Hu, Y., Coates, A.R., and Mitchison, D.A. (2006). Sterilising action of pyrazinamide in models of dormant and rifampicin-tolerant Mycobacterium tuberculosis. Int J Tuberc Lung Dis *10*, 317–322.

128. Zhang, Y., Shi, W., Zhang, W., and Mitchison, D. (2013). Mechanisms of Pyrazinamide Action and Resistance. Microbiol Spectr *2*, 1–12. https://doi.org/10.1128/microbiolspec.MGM2-0023-2013.

129. Zhang, Y., Wade, M.M., Scorpio, A., Zhang, H., and Sun, Z. (2003). Mode of action of pyrazinamide: disruption of Mycobacterium tuberculosis membrane transport and energetics by pyrazinoic acid. J Antimicrob Chemother *52*, 790–795. https://doi.org/10.1093/jac/dkg446.

130. Sun, Q., Li, X., Perez, L.M., Shi, W., Zhang, Y., and Sacchettini, J.C. (2020). The molecular basis of pyrazinamide activity on Mycobacterium tuberculosis PanD. Nat Commun *11*, 339. https://doi.org/10.1038/s41467-019-14238-3.

131. Deng, L., Mikusová, K., Robuck, K.G., Scherman, M., Brennan, P.J., and McNeil, M.R. (1995). Recognition of multiple effects of ethambutol on metabolism of mycobacterial cell envelope. Antimicrob Agents Chemother *39*, 694–701. https://doi.org/10.1128/AAC.39.3.694.

132. Goude, R., Amin, A.G., Chatterjee, D., and Parish, T. (2009). The Arabinosyltransferase EmbC Is Inhibited by Ethambutol in Mycobacterium tuberculosis. Antimicrobial Agents and Chemotherapy *53*, 4138–4146. https://doi.org/10.1128/aac.00162-09.

133. Telenti, A., Philipp, W.J., Sreevatsan, S., Bernasconi, C., Stockbauer, K.E., Wieles, B., Musser, J.M., and Jacobs, W.R. (1997). The emb operon, a gene cluster of Mycobacterium tuberculosis involved in resistance to ethambutol. Nat Med *3*, 567–570. https://doi.org/10.1038/nm0597-567.

134. Zhang, L., Zhao, Y., Gao, Y., Wu, L., Gao, R., Zhang, Q., Wang, Y., Wu, C., Wu, F., Gurcha, S.S., et al. (2020). Structures of cell wall arabinosyltransferases with the anti-tuberculosis drug ethambutol. Science *368*, 1211–1219. https://doi.org/10.1126/science.aba9102.

135. Schubert, K., Sieger, B., Meyer, F., Giacomelli, G., Böhm, K., Rieblinger, A., Lindenthal, L., Sachs, N., Wanner, G., and Bramkamp, M. (2017). The Antituberculosis Drug Ethambutol Selectively Blocks Apical Growth in CMN Group Bacteria. mBio *8*, e02213-16. https://doi.org/10.1128/mBio.02213-16.

136. Sarathy, J.P., Gruber, G., and Dick, T. (2019). Re-Understanding the Mechanisms of Action of the Anti-Mycobacterial Drug Bedaquiline. Antibiotics (Basel) *8*, 261. https://doi.org/10.3390/antibiotics8040261.

137. Stancil, S.L., Mirzayev, F., and Abdel-Rahman, S.M. (2021). Profiling Pretomanid as a Therapeutic Option for TB Infection: Evidence to Date. Drug Des Devel Ther *15*, 2815–2830. https://doi.org/10.2147/DDDT.S281639.

138. Abrahams, K.A., Batt, S.M., Gurcha, S.S., Veerapen, N., Bashiri, G., and Besra, G.S. (2023). DprE2 is a molecular target of the anti-tubercular nitroimidazole compounds pretomanid and delamanid. Nat Commun *14*, 3828. https://doi.org/10.1038/s41467-023-39300-z.

139. Hashemian, S.M.R., Farhadi, T., and Ganjparvar, M. (2018). Linezolid: a review of its properties, function, and use in critical care. Drug Des Devel Ther *12*, 1759–1767. https://doi.org/10.2147/DDDT.S164515.

140. Drusano, G.L., Myrick, J., Maynard, M., Nole, J., Duncanson, B., Brown, D., Schmidt, S., Neely, M., Scanga, C.A., Peloquin, C., et al. (2018). Linezolid Kills Acid-Phase and Nonreplicative-Persister-Phase Mycobacterium tuberculosis in a Hollow-Fiber Infection Model. Antimicrob Agents Chemother *62*, e00221-18. https://doi.org/10.1128/AAC.00221-18.

141. Naidoo, A., Naidoo, K., McIlleron, H., Essack, S., and Padayatchi, N. (2017). A review of moxifloxacin for the treatment of drug-susceptible tuberculosis. J Clin Pharmacol *57*, 1369–1386. https://doi.org/10.1002/jcph.968.

142. Quenard, F., Fournier, P.E., Drancourt, M., and Brouqui, P. (2017). Role of second-line injectable antituberculosis drugs in the treatment of MDR/XDR tuberculosis. International Journal of Antimicrobial Agents *50*, 252–254. https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2017.01.042.

143. Dheda, K., Mirzayev, F., Cirillo, D.M., Udwadia, Z., Dooley, K.E., Chang, K.-C., Omar, S.V., Reuter, A., Perumal, T., Horsburgh, C.R., et al. (2024). Multidrug-resistant tuberculosis. Nat Rev Dis Primers *10*, 22. https://doi.org/10.1038/s41572-024-00504-2.

144. Williamson, T., Adderley, J., Quinn, K., Clark, T.G., Lewin, S.R., and Doerig, C. (2025). A timeline of reckoning: Tracking the historical rise of antimicrobial resistance across HIV, TB, and malaria. Journal of Global Antimicrobial Resistance *44*, 420–431. https://doi.org/10.1016/j.jgar.2025.07.014.

145. Singh, R., Dwivedi, S. p., Gaharwar, U. s., Meena, R., Rajamani, P., and Prasad, T. (2020). Recent updates on drug resistance in Mycobacterium tuberculosis. Journal of Applied Microbiology *128*, 1547–1567. https://doi.org/10.1111/jam.14478.

146. Stagg, H.R., Lipman, M.C., McHugh, T.D., and Jenkins, H.E. (2017). Isoniazid-resistant tuberculosis: a cause for concern? Int J Tuberc Lung Dis *21*, 129–139. https://doi.org/10.5588/ijtld.16.0716.

147. WHO (2021). Meeting Report of the WHO Expert Consultation on the Definition of Extensively Drug-Resistant Tuberculosis, 27-29 October 2020 (World Health Organization).

148. Mayer, C., and Takiff, H. (2014). The Molecular Genetics of Fluoroquinolone Resistance in Mycobacterium tuberculosis. Microbiol Spectr *2*, MGM2-0009–2013. https://doi.org/10.1128/microbiolspec.MGM2-0009-2013.

149. An, Q., Lin, R., Yang, Q., Wang, C., and Wang, D. (2023). Evaluation of genetic mutations associated with phenotypic resistance to fluoroquinolones, bedaquiline, and linezolid in clinical Mycobacterium tuberculosis: A systematic review and meta-analysis. J Glob Antimicrob Resist *34*, 214–226. https://doi.org/10.1016/j.jgar.2023.05.001.

150. Koo, H.-K., Min, J., Kim, H.W., Lee, J., Kim, J.S., Park, J.S., and Lee, S.-S. (2020). Prediction of treatment failure and compliance in patients with tuberculosis. BMC Infectious Diseases *20*, 622. https://doi.org/10.1186/s12879-020-05350-7.

151. Vega, V., Rodríguez, S., Van der Stuyft, P., Seas, C., and Otero, L. (2021). Recurrent tuberculosis: a systematic review and meta-analysis of the incidence rates and the proportions of relapse and reinfection. Thorax *76*, 494–502. https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2020-215449.

152. Colangeli, R., Jedrey, H., Kim, S., Connell, R., Ma, S., Venkata, U.D.C., Chakravorty, S., Gupta, A., Sizemore, E.E., Diem, L., et al. (2018). Bacterial Factors That Predict Relapse after Tuberculosis Therapy. New England Journal of Medicine *379*, 823–833. https://doi.org/10.1056/NEJMoa1715849.

153. Cadena, A.M., Fortune, S.M., and Flynn, J.L. (2017). Heterogeneity in tuberculosis. Nat Rev Immunol *17*, 691–702. https://doi.org/10.1038/nri.2017.69.

154. Dartois, V.A., Mizrahi, V., Savic, R.M., Silverman, J.A., Hermann, D., and Barry, C.E. (2025). Strategies for shortening tuberculosis therapy. Nat Med *31*, 1765–1775. https://doi.org/10.1038/s41591-025-03742-3.

155. Drain, P.K., Bajema, K.L., Dowdy, D., Dheda, K., Naidoo, K., Schumacher, S.G., Ma, S., Meermeier, E., Lewinsohn, D.M., and Sherman, D.R. (2018). Incipient and Subclinical Tuberculosis: a Clinical Review of Early Stages and Progression of Infection. Clin Microbiol Rev *31*, e00021-18. https://doi.org/10.1128/CMR.00021-18.

156. Petroff, S.A., and Branch, A. (1928). Bacillus Calmette-Guérin (B.C.G.): Animal Experimentation and Prophylactic Immunization of Children. Am J Public Health Nations Health *18*, 843–864. https://doi.org/10.2105/ajph.18.7.843-b.

157. Setiabudiawan, T.P., Reurink, R.K., Hill, P.C., Netea, M.G., van Crevel, R., and Koeken, V.A.C.M. (2022). Protection against tuberculosis by Bacillus Calmette-Guérin (BCG) vaccination: A historical perspective. Med *3*, 6–24. https://doi.org/10.1016/j.medj.2021.11.006.

158. Harris, R.C., Dodd, P.J., and White, R.G. (2016). The potential impact of BCG vaccine supply shortages on global paediatric tuberculosis mortality. BMC Medicine *14*, 138. https://doi.org/10.1186/s12916-016-0685-4.

159. Konjengbam, B.D., Meitei, H.N., Pandey, A., and Haobam, R. (2025). Goals and strategies in vaccine development against tuberculosis. Mol Immunol *183*, 56–71. https://doi.org/10.1016/j.molimm.2025.04.016.

160. Mandal, S., Njikan, S., Kumar, A., Early, J.V., and Parish, T. (2019). The relevance of persisters in tuberculosis drug discovery. Microbiology (Reading) *165*, 492–499. https://doi.org/10.1099/mic.0.000760.

161. Balaban, N.Q., Helaine, S., Lewis, K., Ackermann, M., Aldridge, B., Andersson, D.I., Brynildsen, M.P., Bumann, D., Camilli, A., Collins, J.J., et al. (2019). Definitions and guidelines for research on antibiotic persistence. Nat Rev Microbiol *17*, 441–448. https://doi.org/10.1038/s41579-019-0196-3.

162. Balaban, N.Q., Merrin, J., Chait, R., Kowalik, L., and Leibler, S. (2004). Bacterial persistence as a phenotypic switch. Science *305*, 1622–1625. https://doi.org/10.1126/science.1099390.

163. Zou, J., Peng, B., Qu, J., and Zheng, J. (2021). Are Bacterial Persisters Dormant Cells Only? Front Microbiol *12*, 708580. https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.708580.

164. Lewis, K. (2007). Persister cells, dormancy and infectious disease. Nat Rev Microbiol *5*, 48–56. https://doi.org/10.1038/nrmicro1557.

165. Dannenberg, N., Bravo, V.J.C., Weijers, T., Spaink, H.P., Ottenhoff, T.H.M., Briegel, A., and Claessen, D. (2022). Mycobacteria form viable cell wall-deficient cells that are undetectable by conventional diagnostics. Preprint at bioRxiv, https://doi.org/10.1101/2022.11.16.516772 https://doi.org/10.1101/2022.11.16.516772.

166. Manina, G., Dhar, N., and McKinney, J.D. (2015). Stress and host immunity amplify Mycobacterium tuberculosis phenotypic heterogeneity and induce nongrowing metabolically active forms. Cell Host Microbe *17*, 32–46. https://doi.org/10.1016/j.chom.2014.11.016.

167. Orman, M.A., and Brynildsen, M.P. (2013). Dormancy Is Not Necessary or Sufficient for Bacterial Persistence. Antimicrob Agents Chemother *57*, 3230–3239. https://doi.org/10.1128/AAC.00243-13.

168. Rahman, K.M.T., Amaratunga, R., Butzin, X.Y., Singh, A., Hossain, T., and Butzin, N.C. (2025). Rethinking dormancy: Antibiotic persisters are metabolically active, non-growing cells. Int J Antimicrob Agents *65*, 107386. https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2024.107386.

169. Ayrapetyan, M., Williams, T., and Oliver, J.D. (2018). Relationship between the Viable but Nonculturable State and Antibiotic Persister Cells. J Bacteriol *200*, e00249-18. https://doi.org/10.1128/JB.00249-18.

170. Pinto, D., Santos, M.A., and Chambel, L. (2015). Thirty years of viable but nonculturable state research: unsolved molecular mechanisms. Crit Rev Microbiol *41*, 61–76. https://doi.org/10.3109/1040841X.2013.794127.

171. Dong, K., Pan, H., Yang, D., Rao, L., Zhao, L., Wang, Y., and Liao, X. (2020). Induction, detection, formation, and resuscitation of viable but non-culturable state microorganisms. Compr Rev Food Sci Food Saf *19*, 149–183. https://doi.org/10.1111/1541-4337.12513.

172. İzgördü, Ö.K., Darcan, C., and Kariptaş, E. (2022). Overview of VBNC, a survival strategy for microorganisms. 3 Biotech *12*, 307. https://doi.org/10.1007/s13205-022-03371-4.

173. Mishra, S., and Saito, K. (2022). Clinically encountered growth phenotypes of tuberculosis-causing bacilli and their in vitro study: A review. Front Cell Infect Microbiol *12*, 1029111. https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.1029111.

174. Pazos-Rojas, L.A., Cuellar-Sánchez, A., Romero-Cerón, A.L., Rivera-Urbalejo, A., Van Dillewijn, P., Luna-Vital, D.A., Muñoz-Rojas, J., Morales-García, Y.E., and Bustillos-Cristales, M.D.R. (2023). The Viable but Non-Culturable (VBNC) State, a Poorly Explored Aspect of Beneficial Bacteria. Microorganisms *12*, 39. https://doi.org/10.3390/microorganisms12010039.

175. Shleeva, M.O., Kudykina, Y.K., Vostroknutova, G.N., Suzina, N.E., Mulyukin, A.L., and Kaprelyants, A.S. (2011). Dormant ovoid cells of Mycobacterium tuberculosis are formed in response to gradual external acidification. Tuberculosis (Edinb) *91*, 146–154. https://doi.org/10.1016/j.tube.2010.12.006.

176. Mukamolova, G.V., Murzin, A.G., Salina, E.G., Demina, G.R., Kell, D.B., Kaprelyants, A.S., and Young, M. (2006). Muralytic activity of Micrococcus luteus Rpf and its relationship to physiological activity in promoting bacterial growth and

resuscitation. Mol Microbiol *59*, 84–98. https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04930.x.

177. Mukamolova, G.V., Turapov, O.A., Young, D.I., Kaprelyants, A.S., Kell, D.B., and Young, M. (2002). A family of autocrine growth factors in Mycobacterium tuberculosis. Mol Microbiol *46*, 623–635. https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.03184.x.

178. Zhao, R., Chen, J., Wang, Y., Li, Y., Kong, X., and Han, Y. (2020). Proteolytic activity of Vibrio harveyi YeaZ is related with resuscitation on the viable but non-culturable state. Lett Appl Microbiol *71*, 126–133. https://doi.org/10.1111/lam.13304.

179. Liao, H., Zhong, X., Xu, L., Ma, Q., Wang, Y., Cai, Y., and Guo, X. (2019). Quorum-sensing systems trigger catalase expression to reverse the *oxyR* deletion-mediated VBNC state in *Salmonella typhimurium*. Research in Microbiology *170*, 65–73. https://doi.org/10.1016/j.resmic.2018.10.004.

180. Wakamoto, Y., Dhar, N., Chait, R., Schneider, K., Signorino-Gelo, F., Leibler, S., and McKinney, J.D. (2013). Dynamic persistence of antibiotic-stressed mycobacteria. Science *339*, 91–95. https://doi.org/10.1126/science.1229858.

181. Wayne, L.G. (1976). Dynamics of submerged growth of Mycobacterium tuberculosis under aerobic and microaerophilic conditions. Am Rev Respir Dis *114*, 807–811. https://doi.org/10.1164/arrd.1976.114.4.807.

182. Wayne, L.G., and Hayes, L.G. (1996). An in vitro model for sequential study of shiftdown of Mycobacterium tuberculosis through two stages of nonreplicating persistence. Infect Immun *64*, 2062–2069. https://doi.org/10.1128/iai.64.6.2062-2069.1996.

183. Bacon, J., James, B.W., Wernisch, L., Williams, A., Morley, K.A., Hatch, G.J., Mangan, J.A., Hinds, J., Stoker, N.G., Butcher, P.D., et al. (2004). The influence of reduced oxygen availability on pathogenicity and gene expression in Mycobacterium tuberculosis. Tuberculosis (Edinb) *84*, 205–217. https://doi.org/10.1016/j.tube.2003.12.011.

184. Bonnett, S.A., Dennison, D., Files, M., Bajpai, A., and Parish, T. (2018). A class of hydrazones are active against non-replicating Mycobacterium tuberculosis. PLoS One *13*, e0198059. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198059.

185. Cho, S.H., Warit, S., Wan, B., Hwang, C.H., Pauli, G.F., and Franzblau, S.G. (2007). Low-oxygen-recovery assay for high-throughput screening of compounds against nonreplicating Mycobacterium tuberculosis. Antimicrob Agents Chemother *51*, 1380–1385. https://doi.org/10.1128/AAC.00055-06.

186. Murugasu-Oei, B., and Dick, T. (2000). Bactericidal activity of nitrofurans against growing and dormant Mycobacterium bovis BCG. J Antimicrob Chemother *46*, 917–919. https://doi.org/10.1093/jac/46.6.917.

187. Sarker, S.D., Nahar, L., and Kumarasamy, Y. (2007). Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the in vitro antibacterial screening of phytochemicals. Methods *42*, 321–324. https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2007.01.006.

188. Taneja, N.K., and Tyagi, J.S. (2007). Resazurin reduction assays for screening of anti-tubercular compounds against dormant and actively growing Mycobacterium tuberculosis, Mycobacterium bovis BCG and Mycobacterium smegmatis. J Antimicrob Chemother *60*, 288–293. https://doi.org/10.1093/jac/dkm207.

189. Galagan, J.E., Minch, K., Peterson, M., Lyubetskaya, A., Azizi, E., Sweet, L., Gomes, A., Rustad, T., Dolganov, G., Glotova, I., et al. (2013). The Mycobacterium tuberculosis regulatory network and hypoxia. Nature *499*, 178–183. https://doi.org/10.1038/nature12337.

190. Rustad, T.R., Harrell, M.I., Liao, R., and Sherman, D.R. (2008). The Enduring Hypoxic Response of Mycobacterium tuberculosis. PLOS ONE *3*, e1502. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001502.

191. Voskuil, M.I., Visconti, K.C., and Schoolnik, G.K. (2004). Mycobacterium tuberculosis gene expression during adaptation to stationary phase and low-oxygen dormancy. Tuberculosis (Edinb) *84*, 218–227. https://doi.org/10.1016/j.tube.2004.02.003.

192. Baek, S.-H., Li, A.H., and Sassetti, C.M. (2011). Metabolic regulation of mycobacterial growth and antibiotic sensitivity. PLoS Biol *9*, e1001065. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001065.

193. Negi, A., and Sharma, R. (2024). The significance of persisters in tuberculosis drug discovery: Exploring the potential of targeting the glyoxylate shunt pathway. European Journal of Medicinal Chemistry *265*, 116058. https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2023.116058.

194. Chang, D.P.S., and Guan, X.L. (2021). Metabolic Versatility of Mycobacterium tuberculosis during Infection and Dormancy. Metabolites *11*, 88. https://doi.org/10.3390/metabo11020088.

195. Daniel, J., Maamar, H., Deb, C., Sirakova, T.D., and Kolattukudy, P.E. (2011). Mycobacterium tuberculosis Uses Host Triacylglycerol to Accumulate Lipid Droplets and Acquires a Dormancy-Like Phenotype in Lipid-Loaded Macrophages. PLoS Pathog *7*, e1002093. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002093.

196. Schnappinger, D., Ehrt, S., Voskuil, M.I., Liu, Y., Mangan, J.A., Monahan, I.M., Dolganov, G., Efron, B., Butcher, P.D., Nathan, C., et al. (2003). Transcriptional Adaptation of Mycobacterium tuberculosis within Macrophages: Insights into the Phagosomal Environment. J Exp Med *198*, 693–704. https://doi.org/10.1084/jem.20030846.

197. Gibson, S., Harrison, J., and Cox, J. (2018). Modelling a Silent Epidemic: A Review of the In Vitro Models of Latent Tuberculosis. Pathogens *7*, 88. https://doi.org/10.3390/pathogens7040088.

198. Iona, E., Giannoni, F., Pardini, M., Brunori, L., Orefici, G., and Fattorini, L. (2007). Metronidazole plus Rifampin Sterilizes Long-Term Dormant Mycobacterium tuberculosis. Antimicrob Agents Chemother *51*, 1537–1540. https://doi.org/10.1128/AAC.01468-06.

199. Alnimr, A.M. (2015). Dormancy models for Mycobacterium tuberculosis: A minireview. Braz J Microbiol *46*, 641–647. https://doi.org/10.1590/S1517-838246320140507.

200. Zhang, Y. (2004). Persistent and dormant tubercle bacilli and latent tuberculosis. Front Biosci *9*, 1136–1156. https://doi.org/10.2741/1291.

201. Loebel, R.O., Shorr, E., and Richardson, H.B. (1933). The Influence of Adverse Conditions upon the Respiratory Metabolism and Growth of Human Tubercle Bacilli 1. J Bacteriol *26*, 167–200. https://doi.org/10.1128/jb.26.2.167-200.1933.

202. Betts, J.C., Lukey, P.T., Robb, L.C., McAdam, R.A., and Duncan, K. (2002). Evaluation of a nutrient starvation model of Mycobacterium tuberculosis persistence by gene and protein expression profiling. Molecular Microbiology *43*, 717–731. https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.02779.x.

203. Gengenbacher, M., Rao, S.P.S., Pethe, K., and Dick, T. (2010). Nutrient-starved, non-replicating Mycobacterium tuberculosis requires respiration, ATP synthase and isocitrate lyase for maintenance of ATP homeostasis and viability. Microbiology *156*, 81–87. https://doi.org/10.1099/mic.0.033084-0.

204. Murphy, D.J., and Brown, J.R. (2007). Identification of gene targets against dormant phase Mycobacterium tuberculosis infections. BMC Infect Dis *7*, 84. https://doi.org/10.1186/1471-2334-7-84.

205. Primm, T.P., Andersen, S.J., Mizrahi, V., Avarbock, D., Rubin, H., and Barry, C.E. (2000). The Stringent Response of Mycobacterium tuberculosis Is Required for Long-Term Survival. Journal of Bacteriology *182*, 4889–4898. https://doi.org/10.1128/jb.182.17.4889-4898.2000.

206. Matern, W.M., Harris, H.T., Danchik, C., McDonald, M., Patel, G., Srivastava, A., Ioerger, T.R., Bader, J.S., and Karakousis, P.C. (2023). Functional Whole Genome Screen of Nutrient-Starved Mycobacterium tuberculosis Identifies Genes Involved in Rifampin Tolerance. Microorganisms *11*, 2269. https://doi.org/10.3390/microorganisms11092269.

207. Sturm, A., Sun, P., Avila-Pacheco, J., Clatworthy, A.E., Bloom-Ackermann, Z., Wuo, M.G., Gomez, J.E., Jin, S., Clish, C.B., Kiessling, L.L., et al. (2024). Genetic factors affecting storage and utilization of lipids during dormancy in Mycobacterium tuberculosis. mBio *15*, e03208-23. https://doi.org/10.1128/mbio.03208-23.

208. Epstein, W. (2003). The roles and regulation of potassium in bacteria. Prog Nucleic Acid Res Mol Biol *75*, 293–320. https://doi.org/10.1016/s0079-6603(03)75008-9.

209. Cholo, M.C., van Rensburg, E.J., Osman, A.G., and Anderson, R. (2015). Expression of the Genes Encoding the Trk and Kdp Potassium Transport Systems of Mycobacterium tuberculosis during Growth In Vitro. Biomed Res Int *2015*, 608682. https://doi.org/10.1155/2015/608682.

210. MacGilvary, N.J., Kevorkian, Y.L., and Tan, S. (2019). Potassium response and homeostasis in Mycobacterium tuberculosis modulates environmental adaptation and is important for host colonization. PLoS Pathog *15*, e1007591. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007591.

211. Salina, E.G., Waddell, S.J., Hoffmann, N., Rosenkrands, I., Butcher, P.D., and Kaprelyants, A.S. (2014). Potassium availability triggers Mycobacterium tuberculosis transition to, and resuscitation from, non-culturable (dormant) states. Open Biol *4*, 140106. https://doi.org/10.1098/rsob.140106.

212. Rohde, K.H., Abramovitch, R.B., and Russell, D.G. (2007). Mycobacterium tuberculosis invasion of macrophages: linking bacterial gene expression to environmental cues. Cell Host Microbe *2*, 352–364. https://doi.org/10.1016/j.chom.2007.09.006.

213. Baker, J.J., Johnson, B.K., and Abramovitch, R.B. (2014). Slow growth of Mycobacterium tuberculosis at acidic pH is regulated by phoPR and host-associated carbon sources. Mol Microbiol *94*, 56–69. https://doi.org/10.1111/mmi.12688.

214. Baker, J.J., and Abramovitch, R.B. (2018). Genetic and metabolic regulation of Mycobacterium tuberculosis acid growth arrest. Sci Rep *8*, 4168. https://doi.org/10.1038/s41598-018-22343-4.

215. Deb, C., Lee, C.-M., Dubey, V.S., Daniel, J., Abomoelak, B., Sirakova, T.D., Pawar, S., Rogers, L., and Kolattukudy, P.E. (2009). A Novel In Vitro Multiple-Stress Dormancy Model for Mycobacterium tuberculosis Generates a Lipid-Loaded, Drug-Tolerant, Dormant Pathogen. PLOS ONE *4*, e6077. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006077.

216. Sun, Z., and Zhang, Y. (1999). Spent Culture Supernatant of Mycobacterium tuberculosis H37Ra Improves Viability of Aged Cultures of This Strain and Allows Small Inocula To Initiate Growth. J Bacteriol *181*, 7626–7628.

217. Shleeva, M., Mukamolova, G.V., Young, M., Williams, H.D., and Kaprelyants, A.S. (2004). Formation of "non-culturable" cells of Mycobacterium smegmatis in stationary phase in response to growth under suboptimal conditions and their Rpf-mediated resuscitation. Microbiology (Reading) *150*, 1687–1697. https://doi.org/10.1099/mic.0.26893-0.

218. Trutneva, K.A., Shleeva, M.O., Demina, G.R., Vostroknutova, G.N., and Kaprelyans, A.S. (2020). One-Year Old Dormant, "Non-culturable" Mycobacterium tuberculosis Preserves Significantly Diverse Protein Profile. Front Cell Infect Microbiol *10*, 26. https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00026.

219. Hu, Y., Liu, A., Ortega-Muro, F., Alameda-Martin, L., Mitchison, D., and Coates, A. (2015). High-dose rifampicin kills persisters, shortens treatment duration, and reduces relapse rate in vitro and in vivo. Front Microbiol *6*, 641. https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00641.

220. Hampshire, T., Soneji, S., Bacon, J., James, B.W., Hinds, J., Laing, K., Stabler, R.A., Marsh, P.D., and Butcher, P.D. (2004). Stationary phase gene expression of Mycobacterium tuberculosis following a progressive nutrient depletion: a model for persistent organisms?,. Tuberculosis (Edinb) *84*, 228–238. https://doi.org/10.1016/j.tube.2003.12.010.

221. Voskuil, M.I., Schnappinger, D., Visconti, K.C., Harrell, M.I., Dolganov, G.M., Sherman, D.R., and Schoolnik, G.K. (2003). Inhibition of Respiration by Nitric Oxide Induces a Mycobacterium tuberculosis Dormancy Program. J Exp Med *198*, 705–713. https://doi.org/10.1084/jem.20030205.

222. Rodríguez, J.G., Hernández, A.C., Helguera-Repetto, C., Aguilar Ayala, D., Guadarrama-Medina, R., Anzóla, J.M., Bustos, J.R., Zambrano, M.M., González-Y-Merchand, J., García, M.J., et al. (2014). Global adaptation to a lipid environment triggers the dormancy-related phenotype of Mycobacterium tuberculosis. mBio *5*, e01125-01114. https://doi.org/10.1128/mBio.01125-14.

223. Hu, Y., Coates, A.R.M., and Mitchison, D.A. (2003). Sterilizing Activities of Fluoroquinolones against Rifampin-Tolerant Populations of Mycobacterium tuberculosis. Antimicrob Agents Chemother *47*, 653–657. https://doi.org/10.1128/AAC.47.2.653-657.2003.

224. Hu, Y., Mangan, J.A., Dhillon, J., Sole, K.M., Mitchison, D.A., Butcher, P.D., and Coates, A.R.M. (2000). Detection of mRNA Transcripts and Active Transcription in Persistent

Mycobacterium tuberculosis Induced by Exposure to Rifampin or Pyrazinamide. J Bacteriol *182*, 6358–6365. https://doi.org/10.1128/jb.182.22.6358-6365.2000.

225. Zhang, M., Sala, C., Hartkoorn, R.C., Dhar, N., Mendoza-Losana, A., and Cole, S.T. (2012). Streptomycin-Starved Mycobacterium tuberculosis 18b, a Drug Discovery Tool for Latent Tuberculosis. Antimicrob Agents Chemother *56*, 5782–5789. https://doi.org/10.1128/AAC.01125-12.

226. Karakousis, P.C., Yoshimatsu, T., Lamichhane, G., Woolwine, S.C., Nuermberger, E.L., Grosset, J., and Bishai, W.R. (2004). Dormancy Phenotype Displayed by Extracellular Mycobacterium tuberculosis within Artificial Granulomas in Mice. J Exp Med *200*, 647–657. https://doi.org/10.1084/jem.20040646.

227. Sarathy, J.P., Via, L.E., Weiner, D., Blanc, L., Boshoff, H., Eugenin, E.A., Barry, C.E., and Dartois, V.A. (2018). Extreme Drug Tolerance of Mycobacterium tuberculosis in Caseum. Antimicrob Agents Chemother *62*, e02266-17. https://doi.org/10.1128/AAC.02266-17.

228. Sarathy, J.P., Xie, M., Jones, R.M., Chang, A., Osiecki, P., Weiner, D., Tsao, W.-S., Dougher, M., Blanc, L., Fotouhi, N., et al. (2023). A Novel Tool to Identify Bactericidal Compounds against Vulnerable Targets in Drug-Tolerant M. tuberculosis found in Caseum. mBio *14*, e0059823. https://doi.org/10.1128/mbio.00598-23.

229. McCune, R.M., Feldmann, F.M., Lambert, H.P., and McDermott, W. (1966). Microbial persistence. I. The capacity of tubercle bacilli to survive sterilization in mouse tissues. J Exp Med *123*, 445–468. https://doi.org/10.1084/jem.123.3.445.

230. McCune, R.M., Tompsett, R., and McDermott, W. (1956). THE FATE OF MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS IN MOUSE TISSUES AS DETERMINED BY THE MICROBIAL ENUMERATION TECHNIQUE. J Exp Med *104*, 763–802. https://doi.org/10.1084/jem.104.5.763.

231. McCune, R.M., and Tompsett, R. (1956). FATE OF MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS IN MOUSE TISSUES AS DETERMINED BY THE MICROBIAL ENUMERATION TECHNIQUE. J Exp Med *104*, 737–762. https://doi.org/10.1084/jem.104.5.737.

232. Scanga, C.A., Mohan, V.P., Joseph, H., Yu, K., Chan, J., and Flynn, J.L. (1999). Reactivation of Latent Tuberculosis: Variations on the Cornell Murine Model. Infect Immun *67*, 4531–4538. https://doi.org/10.1128/iai.67.9.4531-4538.1999.

233. Su, H., Lin, K., Tiwari, D., Healy, C., Trujillo, C., Liu, Y., Ioerger, T.R., Schnappinger, D., and Ehrt, S. (2021). Genetic models of latent tuberculosis in mice reveal differential influence of adaptive immunity. J Exp Med *218*, e20210332. https://doi.org/10.1084/jem.20210332.

234. Orme, I.M. (1988). A Mouse Model of the Recrudescence of Latent Tuberculosis in the Elderly. Am Rev Respir Dis *137*, 716–718. https://doi.org/10.1164/ajrccm/137.3.716.

235. Plumlee, C.R., Duffy, F.J., Gern, B.H., Delahaye, J.L., Cohen, S.B., Stoltzfus, C.R., Rustad, T.R., Hansen, S.G., Axthelm, M.K., Picker, L.J., et al. (2021). Ultra-low Dose Aerosol Infection of Mice with Mycobacterium tuberculosis More Closely Models Human Tuberculosis. Cell Host Microbe *29*, 68-82.e5. https://doi.org/10.1016/j.chom.2020.10.003.

236. Barry, C.E., Boshoff, H.I., Dartois, V., Dick, T., Ehrt, S., Flynn, J., Schnappinger, D., Wilkinson, R.J., and Young, D. (2009). The spectrum of latent tuberculosis: rethinking the biology and intervention strategies. Nat Rev Microbiol *7*, 845–855. https://doi.org/10.1038/nrmicro2236.

237. Kramnik, I., and Beamer, G. (2016). Mouse models of human TB pathology: roles in the analysis of necrosis and the development of host-directed therapies. Semin Immunopathol *38*, 221–237. https://doi.org/10.1007/s00281-015-0538-9.

238. Lanoix, J.-P., Lenaerts, A.J., and Nuermberger, E.L. (2015). Heterogeneous disease progression and treatment response in a C3HeB/FeJ mouse model of tuberculosis. Dis Model Mech *8*, 603–610. https://doi.org/10.1242/dmm.019513.

239. Harper, J., Skerry, C., Davis, S.L., Tasneen, R., Weir, M., Kramnik, I., Bishai, W.R., Pomper, M.G., Nuermberger, E.L., and Jain, S.K. (2012). Mouse Model of Necrotic Tuberculosis Granulomas Develops Hypoxic Lesions. J Infect Dis *205*, 595–602. https://doi.org/10.1093/infdis/jir786.

240. Via, L.E., Lin, P.L., Ray, S.M., Carrillo, J., Allen, S.S., Eum, S.Y., Taylor, K., Klein, E., Manjunatha, U., Gonzales, J., et al. (2008). Tuberculous Granulomas Are Hypoxic in Guinea Pigs, Rabbits, and Nonhuman Primates. Infect Immun *76*, 2333–2340. https://doi.org/10.1128/IAI.01515-07.

241. Clark, S., Hall, Y., and Williams, A. (2015). Animal Models of Tuberculosis: Guinea Pigs. Cold Spring Harb Perspect Med *5*, a018572. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a018572.

242. Kesavan, A.K., Brooks, M., Tufariello, J., Chan, J., and Manabe, Y.C. (2009). Tuberculosis genes expressed during persistence and reactivation in the resistant rabbit model. Tuberculosis (Edinb) *89*, 17–21. https://doi.org/10.1016/j.tube.2008.08.004.

243. Rifat, D., Prideaux, B., Savic, R.M., Urbanowski, M.E., Parsons, T.L., Luna, B., Marzinke, M.A., Ordonez, A.A., DeMarco, V.P., Jain, S.K., et al. (2018). Pharmacokinetics of rifapentine and rifampin in a rabbit model of tuberculosis and correlation with clinical trial data. Sci Transl Med *10*, eaai7786. https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aai7786.

244. Capuano, S.V., Croix, D.A., Pawar, S., Zinovik, A., Myers, A., Lin, P.L., Bissel, S., Fuhrman, C., Klein, E., and Flynn, J.L. (2003). Experimental Mycobacterium tuberculosis Infection of Cynomolgus Macaques Closely Resembles the Various Manifestations of Human M. tuberculosis Infection. Infect Immun *71*, 5831–5844. https://doi.org/10.1128/IAI.71.10.5831-5844.2003.

245. Scanga, C.A., and Flynn, J.L. (2014). Modeling Tuberculosis in Nonhuman Primates. Cold Spring Harb Perspect Med *4*, a018564. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a018564.

246. Shleeva, M.O., Demina, G.R., and Kaprelyants, A.S. (2025). Biochemistry of Reactivation of Dormant Mycobacteria. Biochemistry (Mosc) *90*, S193–S213. https://doi.org/10.1134/S0006297924603757.

247. Shleeva, M.O., Bagramyan, K., Telkov, M.V., Mukamolova, G.V., Young, M., Kell, D.B., and Kaprelyants, A.S. (2002). Formation and resuscitation of 'non-culturable' cells of Rhodococcus rhodochrous and Mycobacterium tuberculosis in prolonged stationary

phase. Microbiology *148*, 1581–1591. https://doi.org/10.1099/00221287-148-5-1581.

248. Downing, K.J., Mischenko, V.V., Shleeva, M.O., Young, D.I., Young, M., Kaprelyants, A.S., Apt, A.S., and Mizrahi, V. (2005). Mutants of Mycobacterium tuberculosis Lacking Three of the Five rpf-Like Genes Are Defective for Growth In Vivo and for Resuscitation In Vitro. Infect Immun *73*, 3038–3043. https://doi.org/10.1128/IAI.73.5.3038-3043.2005.

249. Kana, B.D., Gordhan, B.G., Downing, K.J., Sung, N., Vostroktunova, G., Machowski, E.E., Tsenova, L., Young, M., Kaprelyants, A., Kaplan, G., et al. (2008). The resuscitation-promoting factors of Mycobacterium tuberculosis are required for virulence and resuscitation from dormancy but are collectively dispensable for growth in vitro. Mol Microbiol *67*, 672–684. https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.06078.x.

250. Gordhan, B.G., Peters, J.S., McIvor, A., Machowski, E.E., Ealand, C., Waja, Z., Martinson, N., and Kana, B.D. (2021). Detection of differentially culturable tubercle bacteria in sputum using mycobacterial culture filtrates. Sci Rep *11*, 6493. https://doi.org/10.1038/s41598-021-86054-z.

251. Mukamolova, G.V., Kaprelyants, A.S., Young, D.I., Young, M., and Kell, D.B. (1998). A bacterial cytokine. Proc Natl Acad Sci U S A *95*, 8916–8921. https://doi.org/10.1073/pnas.95.15.8916.

252. Gupta, R.Kr., and Srivastava, R. (2012). Resuscitation Promoting Factors: a Family of Microbial Proteins in Survival and Resuscitation of Dormant Mycobacteria. Indian J Microbiol *52*, 114–121. https://doi.org/10.1007/s12088-011-0202-6.

253. Tufariello, J.M., Jacobs, W.R., and Chan, J. (2004). Individual Mycobacterium tuberculosis resuscitation-promoting factor homologues are dispensable for growth in vitro and in vivo. Infect Immun *72*, 515–526. https://doi.org/10.1128/IAI.72.1.515-526.2004.

254. Russell-Goldman, E., Xu, J., Wang, X., Chan, J., and Tufariello, J.M. (2008). A Mycobacterium tuberculosis Rpf double-knockout strain exhibits profound defects in reactivation from chronic tuberculosis and innate immunity phenotypes. Infect Immun *76*, 4269–4281. https://doi.org/10.1128/IAI.01735-07.

255. Tufariello, J.M., Mi, K., Xu, J., Manabe, Y.C., Kesavan, A.K., Drumm, J., Tanaka, K., Jacobs, W.R., and Chan, J. (2006). Deletion of the Mycobacterium tuberculosis Resuscitation-Promoting Factor Rv1009 Gene Results in Delayed Reactivation from Chronic Tuberculosis. Infect Immun *74*, 2985–2995. https://doi.org/10.1128/IAI.74.5.2985-2995.2006.

256. Kana, B.D., Mizrahi, V., and Gordhan, B.G. (2010). Depletion of resuscitation-promoting factors has limited impact on the drug susceptibility of Mycobacterium tuberculosis. J Antimicrob Chemother *65*, 1583–1585. https://doi.org/10.1093/jac/dkq199.

257. Nikitushkin, V.D., Demina, G.R., Shleeva, M.O., Guryanova, S.V., Ruggiero, A., Berisio, R., and Kaprelyants, A.S. (2015). A product of RpfB and RipA joint enzymatic action promotes the resuscitation of dormant mycobacteria. FEBS J *282*, 2500–2511. https://doi.org/10.1111/febs.13292.

258. Kana, B.D., and Mizrahi, V. (2010). Resuscitation-promoting factors as lytic enzymes for bacterial growth and signaling. FEMS Immunol Med Microbiol *58*, 39–50. https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2009.00606.x.

259. Mir, M., Asong, J., Li, X., Cardot, J., Boons, G.-J., and Husson, R.N. (2011). The Extracytoplasmic Domain of the Mycobacterium tuberculosis Ser/Thr Kinase PknB Binds Specific Muropeptides and Is Required for PknB Localization. PLoS Pathog *7*, e1002182. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002182.

260. Zhang, Y., Yang, Y., Woods, A., Cotter, R.J., and Sun, Z. (2001). Resuscitation of dormant Mycobacterium tuberculosis by phospholipids or specific peptides. Biochem Biophys Res Commun *284*, 542–547. https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.4993.

261. Shleeva, M., Goncharenko, A., Kudykina, Y., Young, D., Young, M., and Kaprelyants, A. (2013). Cyclic Amp-Dependent Resuscitation of Dormant Mycobacteria by Exogenous Free Fatty Acids. PLoS One *8*, e82914. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0082914.

262. Shleeva, M.O., Kondratieva, T.K., Demina, G.R., Rubakova, E.I., Goncharenko, A.V., Apt, A.S., and Kaprelyants, A.S. (2017). Overexpression of Adenylyl Cyclase Encoded by the Mycobacterium tuberculosis Rv2212 Gene Confers Improved Fitness, Accelerated Recovery from Dormancy and Enhanced Virulence in Mice. Front Cell Infect Microbiol *7*, 370. https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00370.

263. Low, K.L., Rao, P.S.S., Shui, G., Bendt, A.K., Pethe, K., Dick, T., and Wenk, M.R. (2009). Triacylglycerol utilization is required for regrowth of in vitro hypoxic nonreplicating Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guerin. J Bacteriol *191*, 5037–5043. https://doi.org/10.1128/JB.00530-09.

264. Shleeva, M.O., Trutneva, K.A., Demina, G.R., Zinin, A.I., Sorokoumova, G.M., Laptinskaya, P.K., Shumkova, E.S., and Kaprelyants, A.S. (2017). Free Trehalose Accumulation in Dormant Mycobacterium smegmatis Cells and Its Breakdown in Early Resuscitation Phase. Front Microbiol *8*, 524. https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00524.

265. Epstein, S.S. (2009). Microbial awakenings. Nature *457*, 1083. https://doi.org/10.1038/4571083a.

266. McAulay, K., Saito, K., Warrier, T., Walsh, K.F., Mathurin, L.D., Royal-Mardi, G., Lee, M.H., Ocheretina, O., Pape, J.W., Fitzgerald, D.W., et al. (2018). Differentially Detectable Mycobacterium tuberculosis Cells in Sputum from Treatment-Naive Subjects in Haiti and Their Proportionate Increase after Initiation of Treatment. mBio *9*, e02192-18. https://doi.org/10.1128/mBio.02192-18.

267. Zainabadi, K., Walsh, K.F., Vilbrun, S.C., Mathurin, L.D., Lee, M.H., Saito, K., Mishra, S., Ocheretina, O., Pape, J.W., Nathan, C., et al. (2021). Characterization of Differentially Detectable Mycobacterium tuberculosis in the Sputum of Subjects with Drug-Sensitive or Drug-Resistant Tuberculosis before and after Two Months of Therapy. Antimicrobial Agents and Chemotherapy *65*, 10.1128/aac.00608-21. https://doi.org/10.1128/aac.00608-21.

268. Castellani, L.G.S., Brunetti, M.N., Ferreira, M.A.M., Tristão, T.C., de Almeida Júnior, P.S., Jones-López, E.C., Fennelly, K.P., Barer, M.R., Ellner, J.J., Dietze, R., et al. (2025). Differentially culturable Mycobacterium tuberculosis in cough-generated aerosols of

patients with pulmonary tuberculosis DCTB in cough-generated aerosols. J Med Microbiol *74*, 002027. https://doi.org/10.1099/jmm.0.002027.

269. Rosser, A., Pareek, M., Turapov, O., Wiselka, M.J., and Mukamolova, G.V. (2018). Differentially Culturable Tubercule Bacilli Are Generated during Nonpulmonary Tuberculosis Infection. Am J Respir Crit Care Med *197*, 818–821. https://doi.org/10.1164/rccm.201705-1048LE.

270. March, V.F.A., Maghradze, N., Mchedlishvili, K., Avaliani, T., Aspindzelashvili, R., Avaliani, Z., Kipiani, M., Tukvadze, N., Jugheli, L., Bouaouina, S., et al. (2025). Drug-induced differential culturability in diverse strains of Mycobacterium tuberculosis. Sci Rep *15*, 3588. https://doi.org/10.1038/s41598-024-85092-7.

271. Dusthackeer, A., Balasubramanian, M., Shanmugam, G., Priya, S., Nirmal, C.R., Sam Ebenezer, R., Balasubramanian, A., Mondal, R.K., Thiruvenkadam, K., Hemanth Kumar, A.K., et al. (2019). Differential Culturability of Mycobacterium tuberculosis in Culture-Negative Sputum of Patients With Pulmonary Tuberculosis and in a Simulated Model of Dormancy. Frontiers in Microbiology *10*.

272. Gordhan, B.G., Sewcharran, A., Letsoalo, M., Chinappa, T., Yende-Zuma, N., Padayatchi, N., Naidoo, K., and Kana, B.D. (2022). Detection of differentially culturable tubercle bacteria in sputum from drug-resistant tuberculosis patients. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology *12*.

273. Dartois, V., Saito, K., Warrier, T., and Nathan, C. (2016). New Evidence for the Complexity of the Population Structure of Mycobacterium tuberculosis Increases the Diagnostic and Biologic Challenges. Am J Respir Crit Care Med *194*, 1448–1451. https://doi.org/10.1164/rccm.201607-1431ED.

274. Jarvis, B., Wilrich, C., and Wilrich, P.-T. (2010). Reconsideration of the derivation of Most Probable Numbers, their standard deviations, confidence bounds and rarity values. J Appl Microbiol *109*, 1660–1667. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2010.04792.x.

275. Turapov, O., O'Connor, B.D., Sarybaeva, A.A., Williams, C., Patel, H., Kadyrov, A.S., Sarybaev, A.S., Woltmann, G., Barer, M.R., and Mukamolova, G.V. (2016). Phenotypically Adapted Mycobacterium tuberculosis Populations from Sputum Are Tolerant to First-Line Drugs. Antimicrob Agents Chemother *60*, 2476–2483. https://doi.org/10.1128/AAC.01380-15.

276. Peters, J.S., McIvor, A., Papadopoulos, A.O., Masangana, T., Gordhan, B.G., Waja, Z., Otwombe, K., Letutu, M., Kamariza, M., Sterling, T.R., et al. (2023). Differentially culturable tubercle bacteria as a measure of tuberculosis treatment response. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology *12*.

277. Levin-Reisman, I., Ronin, I., Gefen, O., Braniss, I., Shoresh, N., and Balaban, N.Q. (2017). Antibiotic tolerance facilitates the evolution of resistance. Science *355*, 826–830. https://doi.org/10.1126/science.aaj2191.

278. Hu, Y., Pertinez, H., Liu, Y., Davies, G., and Coates, A. (2019). Bedaquiline kills persistent Mycobacterium tuberculosis with no disease relapse: an in vivo model of a potential cure. J Antimicrob Chemother *74*, 1627–1633. https://doi.org/10.1093/jac/dkz052.

279. Verma, A., Ghoshal, A., Dwivedi, V.P., and Bhaskar, A. (2022). Tuberculosis: The success tale of less explored dormant Mycobacterium tuberculosis. Front. Cell. Infect. Microbiol. *12*. https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.1079569.

280. Borges, Á.H., Russell, M., Tait, D., Scriba, T.J., Nemes, E., Skallerup, P., van Brakel, E., Cabibbe, A.M., Cirillo, D.M., Leuvennink-Steyn, M., et al. (2025). Immunogenicity, safety, and efficacy of the vaccine H56:IC31 in reducing the rate of tuberculosis disease recurrence in HIV-negative adults successfully treated for drug-susceptible pulmonary tuberculosis: a double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 2b trial. The Lancet Infectious Diseases *25*, 751–763. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(24)00814-4.

281. Dubos, R.J., and Davis, B.D. (1946). FACTORS AFFECTING THE GROWTH OF TUBERCLE BACILLI IN LIQUID MEDIA. J Exp Med *83*, 409–423.

282. Reiling, N., Homolka, S., Walter, K., Brandenburg, J., Niwinski, L., Ernst, M., Herzmann, C., Lange, C., Diel, R., Ehlers, S., et al. (2013). Clade-specific virulence patterns of Mycobacterium tuberculosis complex strains in human primary macrophages and aerogenically infected mice. mBio *4*, e00250-13. https://doi.org/10.1128/mBio.00250-13.

283. Goossens, S.N., Sampson, S.L., and Van Rie, A. (2020). Mechanisms of Drug-Induced Tolerance in Mycobacterium tuberculosis. Clin Microbiol Rev *34*, e00141-20. https://doi.org/10.1128/CMR.00141-20.

284. Hu, Y.M., Butcher, P.D., Sole, K., Mitchison, D.A., and Coates, A.R. (1998). Protein synthesis is shutdown in dormant Mycobacterium tuberculosis and is reversed by oxygen or heat shock. FEMS Microbiol Lett *158*, 139–145. https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1998.tb12813.x.

285. Shi, L., Sohaskey, C.D., Pfeiffer, C., Datta, P., Parks, M., McFadden, J., North, R.J., and Gennaro, M.L. (2010). Carbon flux rerouting during Mycobacterium tuberculosis growth arrest. Mol Microbiol *78*, 1199–1215. https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07399.x.

286. Lynn, M., Wilson, A.R., and Solotorovsky, M. (1979). Role of bovine serum albumin in the nutrition of Mycobacterium tuberculosis. Appl Environ Microbiol *38*, 806–810.

287. Beltran, C.G.G., Venter, R., Mann, T.N., Davis, J.H., Kana, B.D., and Walzl, G. (2022). Culture filtrate supplementation can be used to improve Mycobacterium tuberculosis culture positivity for spinal tuberculosis diagnosis. Front Cell Infect Microbiol *12*, 1065893. https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.1065893.

288. O'Connor, B.D., Woltmann, G., Patel, H., Turapov, O., Haldar, P., and Mukamolova, G.V. (2015). Can resuscitation-promoting factors be used to improve culture rates of extra-pulmonary tuberculosis? Int J Tuberc Lung Dis *19*, 1556–1557. https://doi.org/10.5588/ijtld.15.0682.

289. Francis, G.L. (2010). Albumin and mammalian cell culture: implications for biotechnology applications. Cytotechnology *62*, 1–16. https://doi.org/10.1007/s10616-010-9263-3.

290. Dhar, N., McKinney, J., and Manina, G. (2016). Phenotypic Heterogeneity in Mycobacterium tuberculosis. Microbiol Spectr *4*. https://doi.org/10.1128/microbiolspec.TBTB2-0021-2016.

291. Aldridge, B.B., Fernandez-Suarez, M., Heller, D., Ambravaneswaran, V., Irimia, D., Toner, M., and Fortune, S.M. (2012). Asymmetry and aging of mycobacterial cells lead to variable growth and antibiotic susceptibility. Science *335*, 100–104. https://doi.org/10.1126/science.1216166.

292. Ahmad, Z., Klinkenberg, L.G., Pinn, M.L., Fraig, M.M., Peloquin, C.A., Bishai, W.R., Nuermberger, E.L., Grosset, J.H., and Karakousis, P.C. (2009). Biphasic Kill Curve of Isoniazid Reveals the Presence of Drug-Tolerant, Not Drug-Resistant, Mycobacterium tuberculosis in the Guinea Pig. The Journal of Infectious Diseases *200*, 1136–1143. https://doi.org/10.1086/605605.

293. Miller, M.B., and Bassler, B.L. (2001). Quorum sensing in bacteria. Annu Rev Microbiol *55*, 165–199. https://doi.org/10.1146/annurev.micro.55.1.165.

294. Boopathi, S., Ramasamy, S., Haridevamuthu, B., Murugan, R., Veerabadhran, M., Jia, A.-Q., and Arockiaraj, J. (2022). Intercellular communication and social behaviors in mycobacteria. Front Microbiol *13*, 943278. https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.943278.

295. Gordhan, B.G., Padarath, K., Sewcharran, A., McIvor, A., VanNieuwenhze, M.S., Waja, Z., Martinson, N., and Kana, B.D. (2024). Clinical Strains of Mycobacterium tuberculosis Representing Different Genotype Families Exhibit Distinct Propensities to Adopt the Differentially Culturable State. Pathogens *13*, 318. https://doi.org/10.3390/pathogens13040318.

296. Foreman, M., Kolodkin-Gal, I., and Barkan, D. (2022). A Pivotal Role for Mycobactin/mbtE in Growth and Adaptation of Mycobacterium abscessus. Microbiology Spectrum *10*, e02623-22. https://doi.org/10.1128/spectrum.02623-22.

297. Davis, B.D., and Dubos, R.J. (1947). THE BINDING OF FATTY ACIDS BY SERUM ALBUMIN, A PROTECTIVE GROWTH FACTOR IN BACTERIOLOGICAL MEDIA. J Exp Med *86*, 215–228. https://doi.org/10.1084/jem.86.3.215.

298. Kundu, M., and Basu, J. (2021). Applications of Transcriptomics and Proteomics for Understanding Dormancy and Resuscitation in Mycobacterium tuberculosis. Front Microbiol *12*, 642487. https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.642487.

299. Salina, E.G., Mollenkopf, H.J., Kaufmann, S.H.E., and Kaprelyants, A.S. (2009). M. tuberculosis Gene Expression during Transition to the “Non-Culturable” State. Acta Naturae *1*, 73–77.

300. McCune, R.M., Feldmann, F.M., Lambert, H.P., and McDermott, W. (1966). Microbial persistence. I. The capacity of tubercle bacilli to survive sterilization in mouse tissues. J Exp Med *123*, 445–468. https://doi.org/10.1084/jem.123.3.445.

301. Hendon-Dunn, C.L., Doris, K.S., Thomas, S.R., Allnutt, J.C., Marriott, A.A.N., Hatch, K.A., Watson, R.J., Bottley, G., Marsh, P.D., Taylor, S.C., et al. (2016). A Flow Cytometry Method for Rapidly Assessing Mycobacterium tuberculosis Responses to Antibiotics with Different Modes of Action. Antimicrob Agents Chemother *60*, 3869–3883. https://doi.org/10.1128/AAC.02712-15.

302. Nikitushkin, V., Shleeva, M., Loginov, D., F, F.D., Sterba, J., and Kaprelyants, A. (2022). Shotgun proteomic profiling of dormant, ‘non-culturable’ Mycobacterium tuberculosis. PLOS ONE *17*, e0269847. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0269847.

303. Del Portillo, P., García-Morales, L., Menéndez, M.C., Anzola, J.M., Rodríguez, J.G., Helguera-Repetto, A.C., Ares, M.A., Prados-Rosales, R., Gonzalez-y-Merchand, J.A., and García, M.J. (2019). Hypoxia Is Not a Main Stress When Mycobacterium tuberculosis Is in a Dormancy-Like Long-Chain Fatty Acid Environment. Front. Cell. Infect. Microbiol. *8*. https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00449.

304. Gap-Gaupool, B., Glenn, S.M., Milburn, E., Turapov, O., Crosatti, M., Hincks, J., Stewart, B., Bacon, J., Kendall, S.L., Voskuil, M.I., et al. (2024). Nitric oxide induces the distinct invisibility phenotype of Mycobacterium tuberculosis. Commun Biol *7*, 1206. https://doi.org/10.1038/s42003-024-06912-0.

305. Leistikow, R.L., Morton, R.A., Bartek, I.L., Frimpong, I., Wagner, K., and Voskuil, M.I. (2010). The Mycobacterium tuberculosis DosR Regulon Assists in Metabolic Homeostasis and Enables Rapid Recovery from Nonrespiring Dormancy. J Bacteriol *192*, 1662–1670. https://doi.org/10.1128/JB.00926-09.

306. Salina, E.G., Grigorov, A.S., Bychenko, O.S., Skvortsova, Y.V., Mamedov, I.Z., Azhikina, T.L., and Kaprelyants, A.S. (2019). Resuscitation of Dormant "Non-culturable" Mycobacterium tuberculosis Is Characterized by Immediate Transcriptional Burst. Front. Cell. Infect. Microbiol. *9*. https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00272.

307. Coetzee, J.L., Kriel, N.L., Loubser, J., Dippenaar, A., Sampson, S.L., Malherbe, S.T., and Mouton, J.M. (2024). Assessing the propensity of TB clinical isolates to form viable but non-replicating subpopulations. Sci Rep *14*, 27686. https://doi.org/10.1038/s41598-024-79389-w.

308. Parbhoo, T., Mouton, J.M., and Sampson, S.L. (2022). Phenotypic adaptation of Mycobacterium tuberculosis to host-associated stressors that induce persister formation. Front. Cell. Infect. Microbiol. *12*. https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.956607.

309. Barr, D.A., Omollo, C., Mason, M., Koch, A., Wilkinson, R.J., Lalloo, D.G., Meintjes, G., Mizrahi, V., Warner, D.F., and Davies, G. (2021). Flow cytometry method for absolute counting and single-cell phenotyping of mycobacteria. Sci Rep *11*, 18661. https://doi.org/10.1038/s41598-021-98176-5.

310. Tizzano, B., Dallenga, T.K., Utpatel, C., Behrends, J., Homolka, S., Kohl, T.A., and Niemann, S. (2021). Survival of hypoxia-induced dormancy is not a common feature of all strains of the Mycobacterium tuberculosis complex. Sci Rep *11*, 2628. https://doi.org/10.1038/s41598-021-81223-6.

311. Mouton, J.M., Helaine, S., Holden, D.W., and Sampson, S.L. (2016). Elucidating population-wide mycobacterial replication dynamics at the single-cell level. Microbiology (Reading) *162*, 966–978. https://doi.org/10.1099/mic.0.000288.

312. Dechow, S.J., Baker, J.J., Murto, M., and Abramovitch, R.B. (2022). ppe51 Variants Enable Growth of Mycobacterium tuberculosis at Acidic pH by Selectively Promoting Glycerol Uptake. J Bacteriol *204*, e0021222. https://doi.org/10.1128/jb.00212-22.

313. Salina, E.G., and Makarov, V. (2022). Mycobacterium tuberculosis Dormancy: How to Fight a Hidden Danger. Microorganisms *10*, 2334. https://doi.org/10.3390/microorganisms10122334.

314. McIvor, A., Gordhan, B.G., Waja, Z., Otwombe, K., Martinson, N.A., and Kana, B.D. (2021). Supplementation of sputum cultures with culture filtrate to detect

tuberculosis in a cross-sectional study of HIV-infected individuals. Tuberculosis (Edinb) *129*, 102103. https://doi.org/10.1016/j.tube.2021.102103.

315. Click, E.S., Winston, C.A., Oeltmann, J.E., Moonan, P.K., and Mac Kenzie, W.R. (2013). Association between Mycobacterium tuberculosis lineage and time to sputum culture conversion. Int J Tuberc Lung Dis *17*, 878–884. https://doi.org/10.5588/ijtld.12.0732.

316. Du, D.H., Geskus, R.B., Zhao, Y., Codecasa, L.R., Cirillo, D.M., Crevel, R. van, Pascapurnama, D.N., Chaidir, L., Niemann, S., Diel, R., et al. (2023). The effect of M. tuberculosis lineage on clinical phenotype. PLOS Global Public Health *3*, e0001788. https://doi.org/10.1371/journal.pgph.0001788.

317. Long, R., Croxen, M., Lee, R., Doroshenko, A., Lau, A., Asadi, L., Heffernan, C., Paulsen, C., Egedahl, M.L., Lloyd, C., et al. (2024). The association between phylogenetic lineage and the subclinical phenotype of pulmonary tuberculosis: A retrospective 2-cohort study. J Infect *88*, 123–131. https://doi.org/10.1016/j.jinf.2023.12.006.

318. Chakraborty, P., Kulkarni, S., Rajan, R., and Sainis, K. (2018). Mycobacterium tuberculosis strains from ancient and modern lineages induce distinct patterns of immune responses. J Infect Dev Ctries *11*, 904–911. https://doi.org/10.3855/jidc.8596.

319. Freschi, L., Vargas, R., Husain, A., Kamal, S.M.M., Skrahina, A., Tahseen, S., Ismail, N., Barbova, A., Niemann, S., Cirillo, D.M., et al. (2021). Population structure, biogeography and transmissibility of Mycobacterium tuberculosis. Nat Commun *12*, 6099. https://doi.org/10.1038/s41467-021-26248-1.

320. Krishnan, N., Malaga, W., Constant, P., Caws, M., Chau, T.T.H., Salmons, J., Lan, N.T.N., Bang, N.D., Daffé, M., Young, D.B., et al. (2011). Mycobacterium tuberculosis Lineage Influences Innate Immune Response and Virulence and Is Associated with Distinct Cell Envelope Lipid Profiles. PLOS ONE *6*, e23870. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023870.

321. Xiong, Z., Yang, X., Wang, S., Smart, C.J., Sisson, H.M., Lin, Z., Hu, T., Ran, Y., Xu, C., Yang, X., et al. (2025). Structure and assembly of the MmpL5/MmpS5 efflux transporter from Mycobacterium tuberculosis. Nat Commun *16*, 4976. https://doi.org/10.1038/s41467-025-60365-5.

322. Samanovic, M.I., Hsu, H.-C., Jones, M.B., Jones, V., McNeil, M.R., Becker, S.H., Jordan, A.T., Strnad, M., Xu, C., Jackson, M., et al. (2018). Cytokinin Signaling in Mycobacterium tuberculosis. mBio *9*, e00989-18. https://doi.org/10.1128/mBio.00989-18.

323. Samanovic, M.I., and Darwin, K.H. (2015). Cytokinins beyond plants: synthesis by Mycobacterium tuberculosis. Microb Cell *2*, 168–170. https://doi.org/10.15698/mic2015.05.203.

324. Kabbara, S., Bidon, B., Kilani, J., Osman, M., Hamze, M., Stock, A.M., and Papon, N. (2020). Cytokinin Sensing in Bacteria. Biomolecules *10*, 186. https://doi.org/10.3390/biom10020186.

325. Samanovic, M.I., Tu, S., Novák, O., Iyer, L.M., McAllister, F.E., Aravind, L., Gygi, S.P., Hubbard, S.R., Strnad, M., and Darwin, K.H. (2015). Proteasomal Control of Cytokinin Synthesis Protects Mycobacterium tuberculosis against Nitric Oxide. Molecular Cell *57*, 984–994. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.01.024.

326. Limón, G., Samhadaneh, N.M., Pironti, A., and Darwin, K.H. (2023). Aldehyde accumulation in Mycobacterium tuberculosis with defective proteasomal degradation results in copper sensitivity. mBio *14*, e0036323. https://doi.org/10.1128/mbio.00363-23.

327. Ma, R., Farrell, D., Gonzalez, G., Browne, J.A., Nakajima, C., Suzuki, Y., and Gordon, S.V. (2022). The TbD1 Locus Mediates a Hypoxia-Induced Copper Response in Mycobacterium bovis. Front Microbiol *13*, 817952. https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.817952.

328. Arumugam, P., Shankaran, D., Bothra, A., Gandotra, S., and Rao, V. (2019). The MmpS6-MmpL6 Operon Is an Oxidative Stress Response System Providing Selective Advantage to Mycobacterium tuberculosis in Stress. J Infect Dis *219*, 459–469. https://doi.org/10.1093/infdis/jiy526.

329. Betts, J.C., McLaren, A., Lennon, M.G., Kelly, F.M., Lukey, P.T., Blakemore, S.J., and Duncan, K. (2003). Signature gene expression profiles discriminate between isoniazid-, thiolactomycin-, and triclosan-treated Mycobacterium tuberculosis. Antimicrob Agents Chemother *47*, 2903–2913. https://doi.org/10.1128/AAC.47.9.2903-2913.2003.

330. Domenech, P., Zou, J., Averback, A., Syed, N., Curtis, D., Donato, S., and Reed, M.B. (2016). Unique Regulation of the DosR Regulon in the Beijing Lineage of Mycobacterium tuberculosis. J Bacteriol *199*, e00696-16. https://doi.org/10.1128/JB.00696-16.

331. Arbués, A., Schmidiger, S., Reinhard, M., Borrell, S., Gagneux, S., and Portevin, D. (2025). Soluble immune mediators orchestrate protective in vitro granulomatous responses across Mycobacterium tuberculosis complex lineages. Elife *13*, RP99062. https://doi.org/10.7554/eLife.99062.

332. Portevin, D., Gagneux, S., Comas, I., and Young, D. (2011). Human Macrophage Responses to Clinical Isolates from the Mycobacterium tuberculosis Complex Discriminate between Ancient and Modern Lineages. PLoS Pathog *7*, e1001307. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001307.

333. Gutierrez, M.C., Ahmed, N., Willery, E., Narayanan, S., Hasnain, S.E., Chauhan, D.S., Katoch, V.M., Vincent, V., Locht, C., and Supply, P. (2006). Predominance of Ancestral Lineages of Mycobacterium tuberculosis in India. Emerg Infect Dis *12*, 1367–1374. https://doi.org/10.3201/eid1209.050017.

334. Stanley, S., Spaulding, C.N., Liu, Q., Chase, M.R., Ha, D.T.M., Thai, P.V.K., Lan, N.H., Thu, D.D.A., Quang, N.L., Brown, J., et al. (2024). Identification of bacterial determinants of tuberculosis infection and treatment outcomes: a phenogenomic analysis of clinical strains. Lancet Microbe *5*.

335. Gröschel, M.I., Sayes, F., Simeone, R., Majlessi, L., and Brosch, R. (2016). ESX secretion systems: mycobacterial evolution to counter host immunity. Nat Rev Microbiol *14*, 677–691. https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.131.

336. Shah, S., and Briken, V. (2016). Modular Organization of the ESX-5 Secretion System in Mycobacterium tuberculosis. Front. Cell. Infect. Microbiol. *6*. https://doi.org/10.3389/fcimb.2016.00049.

337. Bukka, A., Price, C.T.D., Kernodle, D.S., and Graham, J.E. (2012). Mycobacterium tuberculosis RNA Expression Patterns in Sputum Bacteria Indicate Secreted Esx

Factors Contributing to Growth are Highly Expressed in Active Disease. Front Microbiol *2*, 266. https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00266.

338. Holt, K.E., McAdam, P., Thai, P.V.K., Thuong, N.T.T., Ha, D.T.M., Lan, N.N., Lan, N.H., Nhu, N.T.Q., Hai, H.T., Ha, V.T.N., et al. (2018). Frequent transmission of the Mycobacterium tuberculosis Beijing lineage and positive selection for EsxW Beijing variant in Vietnam. Nat Genet *50*, 849–856. https://doi.org/10.1038/s41588-018-0117-9.

339. Saelens, J.W., Sweeney, M.I., Viswanathan, G., Xet-Mull, A.M., Jurcic Smith, K.L., Sisk, D.M., Hu, D.D., Cronin, R.M., Hughes, E.J., Brewer, W.J., et al. (2022). An ancestral mycobacterial effector promotes dissemination of infection. Cell *185*, 4507-4525.e18. https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.10.019.

340. Yang, J.-J., Hu, Y., Sun, P., Wang, L., Xie, X.-J., and Wang, T.-T. (2025). Type VII secretion system gene mutations driving global mycobacterium tuberculosis transmission revealed by whole genomic sequence. Front. Cell. Infect. Microbiol. *15*. https://doi.org/10.3389/fcimb.2025.1573643.

341. Lin, P.L., Ford, C.B., Coleman, M.T., Myers, A.J., Gawande, R., Ioerger, T., Sacchettini, J., Fortune, S.M., and Flynn, J.L. (2014). Sterilization of granulomas is common in active and latent tuberculosis despite within-host variability in bacterial killing. Nat Med *20*, 75–79. https://doi.org/10.1038/nm.3412.

342. Mvubu, N.E., and Jacoby, K. (2023). Mycobacterium tuberculosis complex molecular networks and their regulation: Implications of strain heterogeneity on epigenetic diversity and transcriptome regulation. Heliyon *9*, e22611. https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e22611.

343. Vargas, R., Luna, M.J., Freschi, L., Marin, M., Froom, R., Murphy, K.C., Campbell, E.A., Ioerger, T.R., Sassetti, C.M., and Farhat, M.R. (2023). Phase variation as a major mechanism of adaptation in Mycobacterium tuberculosis complex. Proc Natl Acad Sci U S A *120*, e2301394120. https://doi.org/10.1073/pnas.2301394120.

344. Rojas, V.M.R., Zwyer, M., Bouaouina, S., Brites, D., Borrell, S., and Gagneux, S. (2025). Mycobacterium tuberculosis complex Lineage 1: A neglected cause of tuberculosis. PLOS Neglected Tropical Diseases *19*, e0013513. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0013513.