

Thèse de doctorat  
de l'Université Sorbonne Paris Cité  
Préparée à l'Université Paris Diderot  
**Ecole doctorale BioSPC 562**

*Unité Pathogénomique Mycobactérienne Intégrée,  
Institut Pasteur*

# IMPACT DES ANTIBIOTIQUES SUR LA REPONSE DES MACROPHAGES HUMAINS : L'EXEMPLE DE LA BEDAQUILINE

Par **Alexandre Giraud--Gatineau**

Thèse de doctorat d'Infectiologie

Dirigée par le Dr. Ludovic Tailleux

Présentée et soutenue publiquement à Paris le 7 Novembre 2019

Présidente du jury : Martin-Verstraete Isabelle, Professeure, Université Paris-Diderot.

Rapporteuse : Cougoule Céline, Chargée de recherche, IPBS Toulouse.

Rapporteur : Herrmann Jean-Louis, PU-PH, Hôpital Raymond Poincaré.

Examinatrice : Brodin Priscille, Directrice de recherche, Institut Pasteur Lille

Examinateur : Neyrolles Olivier, Directeur de recherche, IPBS Toulouse.

Directeur de thèse : Tailleux Ludovic, Chargée de recherche, Institut Pasteur Paris.

Membre invitée : Gicquel Brigitte, Professeure, Institut Pasteur Paris.

Membre invité : Brosch Roland, Professeur, Institut Pasteur Paris.



# REMERCIEMENTS

---

Je voudrais tout d'abord remercier grandement mon directeur de thèse, Dr Ludovic Tailleux, pour toute son aide. Je suis ravie d'avoir travaillé en sa compagnie durant ces trois années. Il a toujours été là pour me soutenir et me conseiller au cours de l'élaboration de cette thèse. Je ne rencontrerai probablement jamais un chef comme toi, aussi bien sur le plan personnel que professionnel.

Je tiens à remercier l'ensemble des membres de mon jury. Je remercie le Dr. Céline Cougoule et le Pr. Jean-Louis Herrmann de l'honneur qu'ils m'ont fait en acceptant d'être rapporteurs de cette thèse. J'exprime ma gratitude au Dr. Priscille Brodin et au Dr. Olivier Neyrolles pour avoir accepté d'être examinateurs et au Pr. Isabelle Martin-Verstraete qui a accepté d'être la présidente de mon jury.

Pr. Brigitte Gicquel a pu me permettre de réaliser mon stage de master 2 au sein de son unité et de continuer ce projet au cours de ma thèse. Pour avoir été là pour moi et d'être un des membres invités de ma thèse, je la remercie. Je remercie également le Pr. Roland Brosch de m'avoir permis de mener cette thèse à son terme et qui m'a accueillie pendant toute ma thèse au sein de son unité. Je le remercie également d'être un des membres de ma thèse.

Je remercie chaleureusement toutes les personnes ayant contribué à ce projet de thèse : Juan-Manuel, pour m'avoir encadré lors de mon stage de master 2 et pour toutes nos discussions scientifiques et sur l'Espagne ; Alexandra pour son aide précieuse, de sa bonne humeur constante et pour les magnifiques gâteaux (qui vont terriblement me manquer) ; Jade pour son énergie débordante et sa gentillesse ; Anne pour les nombreuses discussions, de ton aide et de tes nombreux conseils. Je remercie également Patricia, Sandrine, Ména et Natacha pour les bons moments passés ensemble. Je tiens à remercier Alexandre pour sa bonne humeur, Roxane pour les nombreuses discussions et les conseils que tu as pu m'apporter, Mickael pour nos discussions intéressantes et de ton aide, Wafa pour toute ton aide que tu as pu m'apporter quand j'avais des difficultés et Fadel pour nos discussions intéressantes. Je remercie Judicael, Françoise, Véronique et Laurence pour leur aide et nos discussions passionnantes. J'ai pu passer 3 inoubliables années grâce à vous tous. Vous m'avez permis de me sentir à l'aise et je n'oublierai jamais votre soutien quotidien. Je tiens à remercier l'ensemble des plates-formes de l'institut Pasteur qui m'ont permis de mener à bien ce projet, particulièrement Pierre-Henri pour son aide qu'il a pu m'apporter et Anne-Marie pour nos discussions.

Mes derniers remerciements vont à ma famille, à Manon et à mes proches qui m'ont soutenu et aidé durant cette thèse.

## LISTE DES ABREVIATIONS

---

<b>AC</b> : Amphiphile cationique	<b>MOX</b> : Moxifloxacine
<b>AMPK</b> : Protéine kinase 5-adenosine monophosphate	<b>Mφs</b> : Macrophages
<b>ATP</b> : Adenosine-triphosphate	<b>NO</b> : Oxyde nitrique
<b>BCG</b> : Bacille de Calmette et Guérin	<b>OMS</b> : Organisation Mondiale de la Santé
<b>BDQ</b> : Bédaquiline	<b>NPs</b> : Nanoparticules
<b>BDQr-MTB</b> : Souche de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> résistante à la bédaquiline	<b>PAMP</b> : <i>Pathogen Associated Molecular Patterns</i>
<b>CFP-10</b> : <i>Culture Filtrate Protein 10</i>	<b>PBMC</b> : Cellules mononuclées du sang périphérique
<b>CMH</b> : Complexe majeur d'histocompatibilité	<b>PI3P</b> : Phosphatidylinositol-3-phosphate
<b>CS-NPs</b> : nanoparticules compose de chitosan	<b>PI</b> : Phosphatidylinositol
<b>CS-NPS-tri</b> : CS-NPs contenant des tri-mannose	<b>PIM</b> : Phosphatidylinositol mannoside
<b>ESAT-6</b> : <i>Early Secreted Antigenic Target 6</i>	<b>PRR</b> : <i>Pattern Recognition Receptors</i>
<b>EMB</b> : Ethambutol	<b>PZA</b> : Pyrazinamide
<b>HDT</b> : <i>Host-Directed Therapy</i>	<b>RIF</b> : Rifampicine
<b>IDR</b> : Intradermoréaction à la tuberculine	<b>RNS</b> : Espèces réactives azotées
<b>IFN-γ</b> : Interféron-gamma	<b>ROS</b> : Espèces réactives oxygénées
<b>IGRA</b> : Test de détection de l'IFN-γ	<b>TB</b> : Tuberculose
<b>IL-</b> : Interleukine	<b>TFEB</b> : Facteur de transcription EB
<b>INH</b> : Isoniazide	<b>TNF-α</b> : Facteur de nécrose tumorale alpha
<b>iNOS</b> : NO synthase inductible	<b>VIH</b> : Virus de l'immunodéficience humaine
<b>LAM</b> : Lipoarabinomanne	<b>XDR-TB</b> : Souche de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> ultra-résistante
<b>LEVO</b> : Lévofloxacine	
<b>LPS</b> : Lipopolysaccharides	
<b>MDR-TB</b> : Souche de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> multi-résistante	
<b>MTB</b> : <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	

# TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS .....	2
LISTE DES ABREVIATIONS .....	3
TABLES DES ILLUSTRATIONS.....	6
INTRODUCTION.....	7
1.    LA TUBERCULOSE.....	7
1.    ÉPIDEMIOLOGIE.....	7
a. <i>Définition</i> .....	7
b. <i>La tuberculose active et la tuberculose latente</i> .....	7
c. <i>Facteurs de risques</i> .....	9
2.    PREVENTION.....	14
a. <i>Stratégies de lutte contre la tuberculose</i> .....	14
b. <i>Diagnostic</i> .....	14
3.    TRAITEMENT.....	17
a. <i>Les antibiotiques de premières intentions</i> .....	17
b. <i>La tuberculose résistante aux antibiotiques</i> .....	20
c. <i>Les approches contre la résistance aux antibiotiques</i> .....	22
II.    MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS ET LE SYSTEME IMMUNITAIRE .....	27
1.    CYCLE D'INFECTION A MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS.....	27
a. <i>Infection à Mycobacterium tuberculosis</i> .....	27
b. <i>Recrutement des cellules de l'immunité innée</i> .....	28
c. <i>Reconnaissance de Mycobacterium tuberculosis par les macrophages</i> .....	29
d. <i>La réponse immunitaire adaptative contre Mycobacterium tuberculosis</i> .....	29
e. <i>Le granulome chez Mycobacterium tuberculosis</i> .....	32
2.    VIRULENCE ET ADAPTATION DE MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS.....	36
a. <i>Les facteurs de virulence de Mycobacterium tuberculosis</i> .....	36
b. <i>Changement métabolique de Mycobacterium tuberculosis</i> .....	36
c. <i>Tolérance intrinsèque aux antibiotiques</i> .....	37
3.    LES MACROPHAGES FACE À MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS.....	41
a. <i>Régulation de l'inflammation des macrophages</i> .....	41
b. <i>Phagocytose et maturation des phagosomes</i> .....	42
c. <i>Autophagie</i> .....	44
d. <i>Espèces réactives</i> .....	45
e. <i>Mort cellulaire</i> .....	46
f. <i>L'inflammasome</i> .....	48
g. <i>Les ions cuivre et zinc face à Mycobacterium tuberculosis</i> .....	50
h. <i>La vitamine D et la cathélicidine</i> .....	50
III.    L'IMPACT DE L'ANTIBIOTHERAPIE SUR LE SYSTEME IMMUNITAIRE .....	53
1.    LE MICROBIOTE ET LES ANTI-TUBERCULEUX.....	53
a. <i>La relation entre le microbiote et le système immunitaire</i> .....	53
b. <i>Le microbiome et la tuberculose</i> .....	54
c. <i>Les anti-tuberculeux sur le microbiote</i> .....	55
2.    MODULATION DE LA REPOSE DES CELLULES IMMUNITAIRES PAR LES ANTI-TUBERCULEUX.....	57
a. <i>Impact sur l'immunité innée</i> .....	57
b. <i>Impact sur l'immunité adaptative</i> .....	58

RESULTATS.....	59
I. INTRODUCTION.....	59
II. RESUME DES RESULTATS.....	63
III. PUBLICATION.....	65
DISCUSSION .....	97
I. L'IMPACT DE LA BEDAQUILINE SUR LA REPONSE IMMUNITAIRE INNEE.....	97
BIBLIOGRAPHIE .....	102
ANNEXES.....	115
I. ARTICLE EN COLLABORATION – COYA ET AL. (2019). <i>JOURNAL OF NANOBIO TECHNOLOGY</i> . .....	115
II. L'ISONIAZIDE N'INDUIT PAS L'AUTOPHAGIE DANS LES MACROPHAGES HUMAINS INFECTES PAR <i>MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS</i> .....	131

# TABLES DES ILLUSTRATIONS

---

<b>FIGURE 1.</b> ESTIMATION DE L'INCIDENCE DE LA TB DANS LE MONDE EN 2017.	8
<b>TABLEAU 1.</b> GROUPES DES ANTIBIOTIQUES RECOMMANDES POUR LE TRAITEMENT DE MDR-TB LONG.	19
<b>FIGURE 2.</b> DEVELOPPEMENT DES NOUVEAUX ANTI-TUBERCULEUX EN PHASE CLINIQUE.	21
<b>FIGURE 3.</b> DEVELOPPEMENT DES AGENTS HDT POUR LA TB EN PHASE CLINIQUE.	23
<b>FIGURE 4.</b> TRANSMISSION ET PATHOLOGIE DE LA TUBERCULOSE	26
<b>FIGURE 5.</b> CYCLE DE LA VIE PATHOGENIQUE DE <i>MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS</i> AU SEIN DE SON HOTE ASSOCIE A LA FORMATION DE GRANULOMES.	31
<b>FIGURE 6.</b> NOTION D'EQUILIBRE AU SEIN DU GRANULOME POUR CONTROLER LA REPLICATION DE <i>MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS</i> .	33
<b>TABLEAU 2.</b> EXEMPLES DE FACTEURS DE VIRULENCE DE <i>MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS</i> MODULANT LES ACTIVITES BACTERICIDES DES MACROPHAGES.	35
<b>FIGURE 7.</b> DIFFERENTS MECANISMES DE DEFENSES DES MACROPHAGES CONTRE <i>MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS</i> .	40
<b>FIGURE 8.</b> EFFETS DES ANTIBIOTIQUES LORS D'UN TRAITEMENT ANTI-TUBERCULEUX SUR L'HOTE.	52
<b>TABLEAU 3.</b> ACTIVITE DES ANTI-TUBERCULEUX SUR LE SYSTEME IMMUNITAIRE.	56
<b>FIGURE 9.</b> IMAGERIE MALDI-MS MS AU COURS DU TEMPS DE LA BDQ ET DU METABOLITE M2 CHEZ LES SOURIS BALB/C APRES UNE DOSE ORALE DE 25 MG/KG DE BDQ.	61
<b>FIGURE 10.</b> IMAGERIE MALDI-MS MS AU COURS DU TEMPS DE LA BDQ ET DU METABOLITE M2 CHEZ LES SOURIS C3HEB/FEJ APRES UNE DOSE ORALE DE 25 MG/KG DE BDQ.	61
<b>ANNEXE 2.</b> L'ISONIAZIDE N'INDUIT PAS L'AUTOPHAGIE DANS LES MACROPHAGES HUMAINS INFECTES PAR <i>MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS</i> .	131

# INTRODUCTION

---

## 1. LA TUBERCULOSE

### 1. ÉPIDEMIOLOGIE

#### a. Définition

La tuberculose (TB) reste une cause majeure de morbidité et de mortalité dans le monde. En 2017, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) estime à 10 millions le nombre de nouveaux cas de TB diagnostiqués et 1,3 millions le nombre de morts<sup>1</sup>. Elle représente ainsi la première cause de décès due à un agent infectieux.

La TB est causée par des bactéries appartenant au complexe *Mycobacterium tuberculosis*, dont l'espèce pathogène principale de l'homme est *Mycobacterium tuberculosis* (MTB)<sup>2</sup>. La TB est une maladie majoritairement pulmonaire (85% des cas) mais des cas de TB extra-pulmonaire sont observés (par exemple au niveaux des ganglions lymphatiques ou de la plèvre)<sup>1</sup>.

#### b. La tuberculose active et la tuberculose latente

D'un point de vue clinique, les personnes infectées par MTB ont soit une TB dite latente, asymptomatique et non transmissible, ou soit une TB active, ayant les signes cliniques de la maladie<sup>2</sup>. La propagation de MTB s'effectue à partir des voies aériennes chez les patients ayant une TB pulmonaire active et présentant des cavités pulmonaires. Ces cavités sont l'un des signes cliniques de l'établissement de la maladie<sup>3</sup>. Ces individus infectés vont tousser, éternuer ou cracher libérant dans l'air des gouttelettes contenant le bacille. Par la suite, ces gouttelettes vont pouvoir être inhalées par une personne saine et de même, l'infecter.

*Élément sous droit, diffusion non autorisée*

**Figure 1. Estimation de l'incidence de la TB dans le monde en 2017 (OMS, rapport 2018).**

Dans 10% des cas d'infection à MTB, les individus développeront une TB active<sup>2</sup>, dont le temps d'incubation est d'environ de 3 à 9 mois<sup>4</sup>. Ils vont présenter des symptômes généraux, tels que la fièvre, la fatigue, une perte d'appétit, une toux persistante et une hémoptysie (rejet de sang en toussant). Toutefois, dans la majorité des cas (90%), la personne infectée ne développera pas la TB. Une réponse immunitaire va pouvoir contrôler l'infection en éliminant ou non le bacille. De ce fait, MTB peut rester présent chez l'hôte expliquant la TB dite latente. Ce stade peut perdurer durant toute la vie de l'individu.

D'après le dernier rapport de l'OMS, il est estimé à 1,7 milliard le nombre de personnes infectées de manière latente (soit 23% de la population mondiale), ce qui représente un réservoir considérable du pathogène<sup>1</sup>. Cependant, cette estimation serait surestimée. Elle est obtenue à partir d'une immunoréactivité positive à la TB, avec le test de l'intradermoréaction à la tuberculine ou avec le test de détection de l'interféron- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ )<sup>4</sup>. Ces tests d'immunoréactivités reposent sur la réponse immunitaire adaptative de l'hôte et donc sur la mémoire immunitaire à la suite d'une exposition à des agents pathogènes<sup>4</sup>. Ces tests peuvent rester positifs même lorsque l'agent pathogène est éliminé, ne pouvant donc pas différencier une infection passée ou présente.

### **c. Facteurs de risques**

La distribution du taux d'incidence de la TB est hétérogène à travers le monde (Figure 1) dont les plus fortes incidences se trouvent en Asie du sud-est et en Afrique. Par exemple, en Afrique du Sud, l'incidence de la TB est 63 fois supérieure (567 cas pour 100 000 habitants) qu'en France (9 cas pour 100 000 habitants)<sup>1</sup>. Cette distribution hétérogène peut s'expliquer par un défaut du système de santé dans certains pays mais également par l'implication de facteurs de risques dans le développement d'une TB active. Le contexte environnemental et les différents facteurs de l'individu vont avoir une incidence sur le système immunitaire de l'hôte face à MTB.

*Co-infection avec le Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH)* – Le facteur de risque le plus important dans le développement de la TB est la co-infection par le VIH. Il a été estimé à 464 633 le nombre de nouveaux cas reportés de co-infection par la TB et le VIH et 300 000 le nombre de décès chez les individus co-infectés en 2017<sup>1</sup>. La réplication du VIH chez un individu va mener à des défauts du système immunitaire tels qu'une perte progressive des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> ou une modulation de l'activité des macrophages<sup>5,6</sup>. Par conséquent, chez les individus infectés, cette immunodéficience va augmenter le risque de développer une TB active de 20 fois<sup>5</sup>.

*Polymorphismes génétiques* – Les études épidémiologiques et cliniques ont pu suggérer dès les années 1910 que la TB pourrait être contrôlée par des facteurs génétiques de l'individu<sup>7</sup>. Par exemple, il a été constaté que le taux de TB était plus fréquent chez les vrais jumeaux, soulignant l'implication de facteurs génétiques<sup>8</sup>.

De par l'importance du système immunitaire à lutter contre MTB, les facteurs génétiques sont principalement des mutations associées à des gènes de l'immunité. Les gènes du complexe majeur d'histocompatibilité, du récepteur de type Toll, des cytokines et de leurs récepteurs ou encore du récepteur de la vitamine D<sup>9</sup> sont ainsi des marqueurs génétiques associés au développement de la TB. Cependant, des études criblant le génome entier (*Genome-wide association study*, GWAS) nuancent ces résultats puisque ces mutations génétiques n'ont pas pu être retrouvées<sup>7</sup>. Ces résultats contradictoires s'expliquent par l'association des facteurs génétiques à une population spécifique. L'une des découvertes les plus convaincantes fut l'identification des polymorphismes associés au gène *slc11a1* (*Solute Carrier Family 11 Member 1*). Une méta-analyse a pu révéler que des polymorphismes du gène *slc11a1* étaient associés dans la susceptibilité à développer une TB dans les populations africaines et asiatiques mais pas associés dans les populations d'ascendance européenne<sup>10</sup>.

*L'âge* – Le système immunitaire évolue avec l'âge, et plus particulièrement lors de l'enfance où ces changements sont plus importants. Les individus sont plus susceptibles de développer une TB avant l'âge de 4 ans et après 15 ans<sup>1</sup>. Le vieillissement de la population mondiale a également des conséquences sur l'incidence de la TB chez les individus ayant plus de 65 ans. Cette population associée à un affaiblissement des défenses immunitaires

augmenterait le risque de développer une TB. Mais il est nécessaire de souligner qu'un individu, à tout âge, peut développer une TB active.

*Le genre* – Au-delà de l'âge, une différence de susceptibilité de développer une TB est observée entre les hommes et les femmes<sup>11</sup>. D'après les données de l'OMS en 2017, 5,8 millions d'hommes (63%) et 3,2 millions de femmes (37%) ont développé une TB. Plusieurs facteurs pourraient expliquer cette différence. La difficulté pour l'accès aux soins ainsi que pour le diagnostic chez les femmes, particulièrement dans les pays à revenus faibles, pourraient expliquer cette prévalence mais fait l'objet de discussion<sup>11</sup>. Des études suggèrent également que les hormones stéroïdiennes pourraient jouer un rôle dans la protection ou dans la susceptibilité à la TB. Par exemple, chez des souris infectées par MTB, une mortalité plus importante et une production de cytokines plus faible a été constaté chez les souris mâles en comparaison à des souris mâles castrés ou à des souris femelles<sup>12</sup>.

*La virulence de la souche bactérienne* – Les différentes souches de MTB peuvent être divisées en cinq lignées phylogénétiques : L1, L2, L3, L4 et L7<sup>13</sup>. Ces lignées ont la particularité d'être structurées géographiquement dans le monde et leurs propriétés génétiques possèdent des conséquences épidémiologiques. Certaines lignées développent une progression plus rapide de la TB active comparées à d'autres. C'est le cas pour la lignée L2 (connue aussi comme lignée de l'Asie de l'est incluant les souches Beijing) et L4 (connu aussi comme lignée Euro-Américaine) qui sont responsables de la plupart des cas de TB dans le monde. Cette augmentation de la virulence pour ces lignées est associée à une réduction de la réponse inflammatoire de l'hôte, une plus grande sévérité de la maladie et une augmentation de la transmission<sup>14</sup>.

*Le diabète* – Le développement de la TB est influencée par de nombreux facteurs dont le diabète de type II<sup>15</sup>. Le diabète de type II augmenterait de 3 fois le risque de développer une TB active. Cependant, la compréhension de cette susceptibilité chez ces patients reste encore peu connue. Des études récentes mettent en évidence des défauts dans les réponses immunitaires par le diabète de type II. Par exemple, l'une des caractéristiques du diabète est une dérégulation de l'inflammation, qui pourrait être impliquée dans la susceptibilité à la TB<sup>15</sup>.

*Traitement incluant des inhibiteurs du facteur de nécrose tumorale alpha (TNF- $\alpha$ )* – Le TNF- $\alpha$  est une cytokine inflammatoire importante qui joue un rôle essentiel dans les infections bactériennes dont MTB. Des agents anti-TNF- $\alpha$  sont utilisés dans des maladies inflammatoires ou auto-immunes, dont la polyarthrite rhumatoïde. Ces composés vont ainsi interférer avec les réponses immunitaires innées. Le risque de développer une TB active varie de 1,5 à 17 fois à la suite d'un traitement incluant des anti-TNF- $\alpha$ <sup>16</sup>.

*Malnutrition* – La malnutrition a un profond impact sur le système immunitaire. Par exemple, des carences en vitamines A, D ou en protéines sont associées à un défaut du système immunitaire lié à une plus grande susceptibilité à développer une TB active<sup>17</sup>. Dans un modèle murin, la malnutrition empêche le contrôle de l'infection à MTB à travers une diminution de l'expression de l'IFN- $\gamma$ , l'enzyme NO synthase inductible (iNOS) et du TNF- $\alpha$ . Toutefois, cette progression rapide de l'infection peut être inversée par l'ajout de nourriture<sup>18</sup>.

*La co-infection avec des parasites* – Les helminthes sont des vers parasites qui modulent profondément la réponse immunitaire. Ils induisent généralement une réponse immunitaire de type II dont les acteurs principaux sont les lymphocytes T CD4+ Th2<sup>19</sup>. Cette réponse va permettre de contribuer à tuer les helminthes mais aussi à induire une réparation rapide du tissu endommagé par le parasite. Les infections par les helminthes vont moduler la réponse immunitaire au détriment du contrôle de MTB par différentes voies : une régulation négative de la réponse Th1 associée à une diminution de la production de cytokines importantes dont l'IFN- $\gamma$ , le TNF- $\alpha$  et l'interleukine-12 (IL-12) ; une régulation négative de la réponse Th17<sup>20</sup>.

*Tabac, alcool* – D'autres facteurs sont impliqués dans la TB, tel que le tabac, la consommation d'alcool ou de drogues. Cette causalité pourrait s'expliquer par une réduction de la réponse immunitaire spécifique et éventuellement par une réponse inflammatoire accrue non spécifique. Les macrophages (M $\phi$ s) alvéolaires des fumeurs montrent une altération de la capacité phagocytaire et semble induire une réponse inflammatoire locale<sup>21</sup>. L'alcool est également un facteur de risque important associé à la TB. La consommation d'alcool augmente le risque de développer la maladie par trois (pour une consommation

supérieure à 40g d'éthanol par jour)<sup>22</sup>. La relation entre la consommation d'alcool et la TB peut s'expliquer par un défaut du système immunitaire, une réduction de la réponse des Mφs alvéolaires à des pathogènes et une production de cytokines diminuée<sup>22</sup>.

## 2. PREVENTION

### a. Stratégies de lutte contre la tuberculose

Au début des années 90, l'OMS a déclaré la TB comme une « urgence mondiale ». Différentes stratégies ont été mises en place, comme le plan « DOTS » (*Directly Observed Treatment Short course*) ou encore le « *Global Plan to stop TB* » en 2006. Elles ont permis de réaliser des progrès importants dans le traitement de la maladie permettant ainsi de diminuer le taux de mortalité de 47%. Cependant, la TB reste encore aujourd'hui un problème majeur dans le monde. Une nouvelle stratégie mondiale a été mis en place pour mettre fin à la maladie d'ici 2035 (« *The End TB Strategy* »)<sup>1</sup>. Cette stratégie ambitieuse vise à réduire de 95% d'ici 2035 le nombre de décès par an par rapport à 2015, à réduire de 90% d'ici 2035 le taux d'incidence de la TB par rapport à 2015 et rendre gratuit pour les familles les dépenses liées à la TB.

### b. Diagnostic

Bien que des progrès importants aient été réalisées dans le diagnostic de la TB, il n'existe pas de test simple, fiable et rapide pour diagnostiquer efficacement la maladie. Les médecins recherchent des preuves de la maladie à travers plusieurs diagnostics : des diagnostics bactériologiques et des signes cliniques. L'ensemble de ces observations vont ainsi définir un cas de TB.

Pour détecter une TB dite latente, deux tests peuvent être utilisés : le test de l'intradermoréaction à la tuberculine (IDR) ou le test de détection de l'IFN- $\gamma$  (IGRA). Le test de l'IDR est une méthode basée sur la réponse immunitaire adaptative de l'hôte face aux antigènes mycobactériens<sup>23</sup>. En réaction aux antigènes, un afflux de cellules immunitaires, dont les lymphocytes T, va provoquer une réaction cutanée par l'apparition d'une papule. Ce test consiste à une injection intradermique de 5 unités tuberculines (dérivé protéinique purifié) issue d'une culture de mycobactéries inactivées. La lecture du test s'effectue de 48 à 72 heures après l'injection<sup>24</sup>. Le test est jugé positif lorsque le diamètre d'induration est

supérieur ou égal à 5 mm. Cependant, il est important de faire la distinction entre la positivité du test et l'interprétation, associée au contexte de chaque patient. Des réactions croisées peuvent être observées par la vaccination au bacille de Calmette et Guérin (BCG) ou par une infection à des mycobactéries atypiques.

Les tests IGRA consiste à identifier *in vitro*, par prélèvement sanguin, la présence d'une réponse immunitaire adaptative dirigée contre des antigènes spécifiques de MTB : ESAT-6 (*early secreted antigenic target 6*) et CFP-10 (*culture filtrate protein 10*). L'avantage de ce test comparé à l'IDR est qu'il n'est pas influencé par la vaccination au BCG et ni par les mycobactéries atypiques puisque la réponse mesurée est spécifique des antigènes de MTB. Cependant, ces tests IGRA nécessitent un laboratoire équipé et un personnel formé.

Ces tests utilisés pour identifier une TB latente possèdent des limites. La sensibilité des tests est réduite chez les patients immunodéprimés et aucun des deux tests ne peut faire la distinction entre une TB latente et une TB active<sup>2,24</sup>. En raison de leur spécificité insuffisante, ces tests ne sont pas indiqués pour le diagnostic des TB actives<sup>25</sup>.

En ce qui concerne la détection d'une TB active, plusieurs diagnostics sont utilisés. L'examen microscopique des crachats est l'un des diagnostics le plus largement utilisé dans le monde, notamment dans les pays à faibles revenus<sup>2</sup>. La coloration de Ziehl-Neelsen va permettre de dénombrer les mycobactéries au microscope<sup>26</sup>. Bien que cette technique soit peu coûteuse et facile à mettre en œuvre avec une infrastructure limitée, sa sensibilité est relativement faible (nécessite une charge bacillaire supérieure à 5 000 bacilles/mL de crachat) et cette technique est inefficace pour détecter la résistance aux antibiotiques<sup>27</sup>. De plus, chez les enfants atteints d'une TB active, ce test est positif dans seulement 10-15% des cas en raison d'un faible nombre de bacilles<sup>28</sup>. Dans ce contexte, le test Xpert MTB/RIF a été développé afin de détecter de manière automatisée, à la fois la présence de MTB et sa résistance à la rifampicine, un antibiotique anti-tuberculeux. Par rapport à l'examen microscopique, ce test permet d'être plus sensible (88/100 patients diagnostiqués par Xpert MTB/RIF contre 65/100 par microscopie)<sup>29</sup>. Une méta-analyse a montré également son importance pour détecter la TB active chez les enfants, augmentant ainsi la sensibilité de 36-44% à celle des cultures d'échantillons d'expectoration<sup>29</sup>.

L'un des diagnostics de la TB active repose également sur la mise en culture de MTB à partir d'un échantillon du patient. La positivité des cultures permet l'identification de la mycobactérie responsable de la maladie mais également son niveau de résistance aux antibiotiques. Le diagnostic de la résistance aux anti-tuberculeux peut se faire par des méthodes phénotypes impliquant l'utilisation d'un antibiogramme ou par des méthodes moléculaires par la détection de mutation au niveau des gènes liés à la résistance.

Un autre diagnostic possible pour un dépistage de la TB active est la radiographie. Les signes radiologiques les plus observés chez un patient est une lymphadénopathie, une augmentation des ganglions lymphatiques et la formation de cavernes, lieu ayant une forte concentration de MTB qui apparait chez la moitié des patients environ<sup>30,31</sup>. L'ensemble de ces analyses vont ainsi permettre de diagnostiquer une TB active et d'initier le traitement chez le patient.

### 3. TRAITEMENT

#### a. Les antibiotiques de premières intentions

C'est à partir de 1945 qu'un traitement anti-tuberculeux basé sur l'utilisation d'un antibiotique a été mis en place mais il était associé à une émergence importante de souches résistantes<sup>32</sup>. Au cours des années qui suivirent, les découvertes de nouveaux composés, le développement d'un traitement composé de plusieurs antibiotiques et l'étude des caractéristiques microbiologiques de MTB ont permis de définir dans les années 1980, un schéma thérapeutique efficace et encore utilisé actuellement.

Les personnes atteintes d'une TB active et qui ne présentent pas de résistances aux antibiotiques suivent un traitement anti-tuberculeux de première intention qui repose sur l'administration quotidienne d'antibiotiques pendant 6 mois. La première phase intensive dure 2 mois avec la prise de 4 antibiotiques : l'éthambutol (EMB), la pyrazinamide (PZA), la rifampicine (RIF) et l'isoniazide (INH). La deuxième phase de traitement dure 4 mois constituée d'INH et de RIF. Cette antibiothérapie a été mise en place pour l'action complémentaire des antibiotiques contre MTB et d'empêcher l'émergence de souches résistantes. Les essais menés par le *Singapore Tuberculosis Service* et le *British Medical research Council* ont ainsi montré que ce traitement de 6 mois possédait une efficacité contre MTB, associé à une faible rechute et une incidence des effets secondaires faibles<sup>33</sup>.

*INH* – Cet antibiotique a été utilisé dès 1952 comme agent anti-tuberculeux. Il possède une action bactéricide qui cible exclusivement des bacilles qui se répliquent et qui sont métaboliquement actifs. L'INH est une pro-drogue nécessitant l'action d'une enzyme de MTB, la catalase/peroxidase KatG, pour son activité. Une fois activée, elle va former un complexe avec la protéine InhA, une enoyl-ACP réductase, impliquée dans la biosynthèse des acides mycoliques. Ainsi, l'INH inhibe la synthèse de la paroi mycobactérienne, ce qui va entraîner la mort cellulaire de MTB<sup>34</sup>.

*RIF* – Dérivé de la rifamycine, il a été introduit en 1972 dans le traitement contre la TB. Avec l'INH, ils sont les anti-tuberculeux les plus efficaces. La RIF a une action contre les bactéries

métaboliquement actives mais également contre les bactéries ayant un métabolisme ralenti, ce qui lui confère un rôle important dans le traitement. Son mode d'action contre MTB est sa liaison avec la sous-unité  $\beta$  de l'ARN polymérase, inhibant ainsi l'élongation des ARN messagers<sup>35</sup>.

*EMB* – Utilisé à partir de 1966 dans l'antibiothérapie de la TB, l'EMB est un antibiotique qualifié de bactériostatique. Elle va permettre de diminuer la croissance bactérienne. L'EMB va inhiber une arabinosyl transférase, un enzyme impliqué dans la synthèse d'arabinogalactane qui est l'un des constituants de la paroi des mycobactéries<sup>36</sup>.

*PZA* – Introduit dans le traitement de la TB dans les années 1950, cet antibiotique a la particularité de cibler les bactéries non répliquatives dans les environnements acides retrouvés dans les lésions de la TB. Comme l'INH, la PZA est une pro-drogue nécessitant l'action de l'enzyme pyrazinamidase/nicotinamidase de MTB. Il est majoritairement admis qu'un faible pH est nécessaire pour l'activité de PZA contre MTB. La PZA possède plusieurs cibles, telles que la production d'énergie, la traduction et la pantothénate/coenzyme A, cofacteur indispensable pour de nombreux processus cellulaires<sup>37</sup>.

D'après le dernier rapport de l'OMS, le taux de succès de ce traitement est de 82% en 2017. Malgré ce taux important, des problèmes persistent pour soigner les patients. Cet échec de traitement peut s'expliquer par la non-observance thérapeutique, c'est-à-dire une absence de concordance entre le comportement du patient et les recommandations du médecin, l'absence d'antibiotiques disponibles dans certains pays et par la pharmacogénétique. En effet, certains patients montrent une toxicité plus élevée pour certains antibiotiques dont l'INH à cause de polymorphismes génétiques spécifiques<sup>38</sup>. Associé ou non à un profil génétique, les effets indésirables les plus fréquents sont une augmentation d'enzymes hépatiques, une éruption cutanée, une intolérance gastro-intestinale et des douleurs articulaires. Ils peuvent être traités dans la majorité des cas sans interruption du traitement en cause. Cependant des effets indésirables graves peuvent avoir lieu, comme une hépatite

<b>Groupes</b>	<b>Antibiotiques</b>
<b>A</b>	Bédaquiline
	Lévofoxacine
	Linézolide
	Moxifloxacine
<b>B</b>	Clofazimine
	Cyclosérine / Térizidone
<b>C</b>	Ethambutol
	Delamanide
	Pyrazinamide
	Imipénème ou méropénème
	Amikacine
	Streptomycine
	Ethionamide ou prothionamide
p-acide aminosalicyclique	
<b>Autres antibiotiques</b>	Kanamycine
	Capréomycine
	Amixicilline - acide clavulanique

**Tableau 1. Groupes des antibiotiques recommandés pour le traitement de MDR-TB long (OMS, *guidelines on drug-resistant tuberculosis treatment*, 2019)<sup>39</sup>**

grave ou une névrite optique entraînant un arrêt du traitement. Ces problèmes d'adhérence au traitement compromettent son efficacité et par conséquent entraîne une possible rechute de la maladie ainsi que l'émergence de souches résistantes aux antibiotiques.

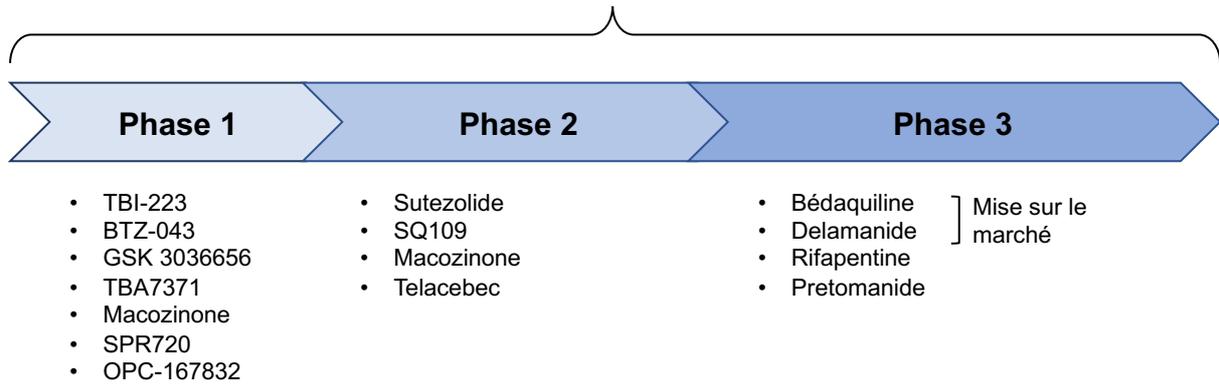
## **b. La tuberculose résistante aux antibiotiques**

Les souches de MTB dites multi-résistantes aux antibiotiques (*Multi drug-resistant TB*, MDR-TB) sont définies comme résistantes à la fois à l'INH et à la RIF. En 2017, 7,2% des nouveaux cas de TB et 21% des cas traités sont des souches résistantes à la RIF<sup>1</sup>. Et ce chiffre augmente puisqu'en 2017, 558 000 nouveaux cas de MDR-TB ont été détectés comparé à 480 000 cas en 2015.

Le traitement d'une souche MDR-TB nécessite une chimiothérapie, ayant davantage d'effets secondaires et dont la durée peut durer entre 9 mois et deux ans. Le traitement de la TB multirésistante n'est pas standardisé, mais l'OMS recommande l'utilisation d'au moins quatre antibiotiques et d'éviter l'association d'antibiotiques ayant une résistance croisée. En 2019, l'OMS a mis à jour de nouvelles lignes directrices concernant les antibiotiques de seconde intention (tableau 1). Quatre groupes ont été créés à l'aide d'un système de GRADE (*Grading of Recommendations, Assessment, Development and Evaluation*). Les antibiotiques sont classés en fonction de leur efficacité d'après les études publiées. Ainsi les fluoroquinolones (la lévofloxacine (LEVO) ou la moxifloxacine (MOX)), la bédaquiline (BDQ) et le linézolide sont fortement recommandés pour les traitements de MDR-TB. Concernant les traitements courts de MDR-TB, la prise quotidienne d'un agent injectable pendant au moins 4 mois reste toujours fortement recommandé.

La conception du traitement approprié contre les souches MDR-TB est complexe car elle dépend des caractéristiques du patient ainsi que le profil de résistance aux médicaments<sup>2</sup>. En 2016, le succès du traitement d'une MDR-TB était seulement de 55%. Ce faible taux de

## Développement clinique



**Figure 2. Développement des nouveaux anti-tuberculeux en phase clinique.** Données issues du « *Working group on new TB drugs* »<sup>40</sup>.

réussite s'explique d'une part par la toxicité des composés utilisés entraînant l'interruption du traitement mais aussi par la durée du traitement considérablement long qui, pour ces deux raisons, nécessitent une surveillance étroite lors du traitement et des examens médicaux réguliers.

Récemment, la situation est devenue encore plus préoccupante avec l'apparition de souches ultrarésistantes (*Extensively drug-resistant TB*, XDR-TB) et totalement résistantes aux antibiotiques. Ces souches XDR-TB sont définies comme étant des souches MDR, résistantes à l'une des fluoroquinolones et au moins à l'un des trois agents injectables (amikacine, capréomycine ou kanamycine). Elles ont été signalées dans plusieurs pays dont l'Inde, la Chine, l'Afrique du Sud ou la Russie<sup>2</sup>. En 2017, 10 800 cas de XDR-TB ont été rapportés, en comparaison à 8 014 cas en 2016<sup>1</sup>. Le traitement des souches XDR nécessite l'utilisation d'antibiotiques de seconde intention utilisés en dernier recours à cause de leur coût mais également à cause de leur effet toxique important chez les patients. Cette augmentation du nombre de cas de XDR fait craindre une épidémie de TB virtuellement inguérissable.

### **c. Les approches contre la résistance aux antibiotiques**

Les efforts actuels dans la lutte contre la résistance aux antibiotiques ont pour but de mettre au point des schémas thérapeutiques plus courts, plus efficaces et mieux tolérés. Ainsi l'utilisation de nouveaux antibiotiques a été effectuée avec l'autorisation du premier nouveau médicament anti-tuberculeux depuis 35 ans<sup>41</sup>. L'apparition de la BDQ puis des nitroimidazoles (delamanide, pretomanid) ont permis de percevoir un schéma thérapeutique oral efficace contre les MDR-TB.

L'organigramme (Figure 2) résume les antibiotiques autorisés récemment comme anti-tuberculeux et leur développement en phase clinique. On peut citer comme médicament en étude la macozinone (PBTZ-169) qui inhibe la protéine DprE1, une enzyme essentielle à la biosynthèse de composants clés de la paroi mycobactérienne<sup>42</sup>, dont l'essai clinique de phase II est en cours. C'est le cas également de la telacebec (Q203), qui inhibe le complexe cytochr-

## Développement clinique

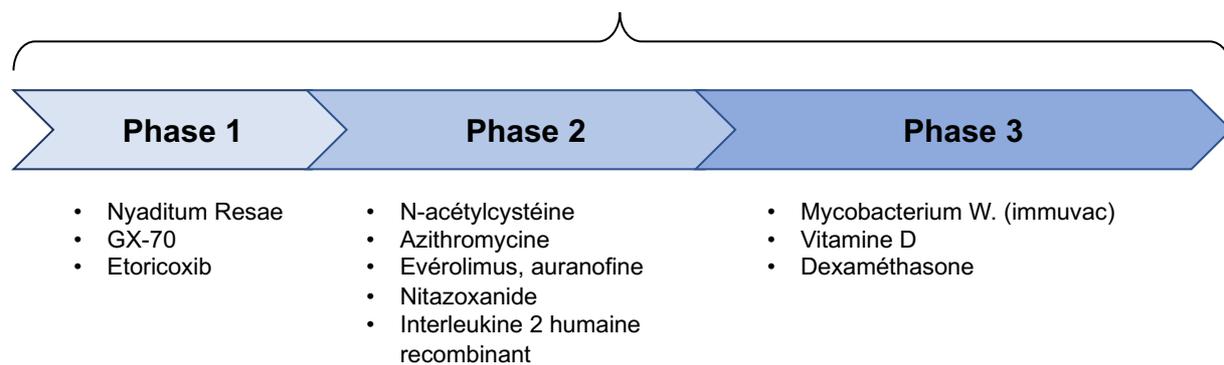


Figure 3. Développement des agents HDT pour la TB en phase clinique<sup>43</sup>.

-ome bc1 menant à une déplétion de la synthèse d'adénosine-triphosphate (ATP) chez MTB<sup>44</sup> dont les essais cliniques de phase II sont en cours également.

Une nouvelle approche, en parallèle au développement des nouveaux antibiotiques anti-tuberculeux, est en plein essor faisant intervenir le système immunitaire de l'hôte. Le principe des thérapies dirigée par l'hôte (*Host-Directed Therapies*, HDT) se base sur la modulation de la réponse de l'hôte par des molécules afin de mieux contrôler la maladie. Concernant la TB, cette stratégie thérapeutique a trois grands buts : de stimuler les défenses immunitaires de l'hôte contre MTB, de réduire l'inflammation et les dommages tissulaires provoqués par MTB et d'éliminer ou de maîtriser la croissance de MTB. De nombreux composés qui peuvent avoir une valeur thérapeutique dans la TB sont en cours d'étude à ce jour (Figure 3) et leurs natures sont variées. L'utilisation de médicaments reconnus ayant des effets thérapeutiques sur des maladies métaboliques sont en étude, notamment la metformine qui augmenterait la fonction immunitaire effectrice et réduirait la charge de MTB dans des études pré-cliniques<sup>45</sup>. Des médicaments couramment utilisés comme les vitamines sont également étudiés. Par exemple, il a été montré que la carence en vitamine D3 est associée à une susceptibilité au développement de la TB<sup>46</sup>, le positionnant comme un agent HDT intéressant. Cependant, bien que certaines études ont montré une amélioration clinique (une activation du système immunitaire de l'hôte<sup>47</sup> et la réduction du temps de conversion des expectorations des patients<sup>48</sup> par l'ajout de vitamine D3), d'autres études montrent aucun effet bénéfique<sup>49</sup>.

Vis-à-vis de leurs caractéristiques, les HDT peuvent ainsi avoir des atouts intéressants lorsqu'ils sont administrés en complément des anti-tuberculeux classiques et notamment dans le contexte de l'émergence de souches MDR-TB. Premièrement, les bactéries seront difficilement résistantes à ces composés puisque l'acquisition de la résistance impliquerait de développer une nouvelle interaction avec les facteurs de l'hôte. Et deuxièmement, l'activité des composés HDT ne varient pas en fonction du profil de résistance des souches. Par conséquent, la combinaison des HDT avec les schémas thérapeutiques actuels pourrait améliorer l'efficacité du traitement chez les patients.

Une autre approche intéressante est l'utilisation des nanoparticules (NPs). Les NPs sont de petites structures (> 1000 nm) qui peuvent être de natures différentes (lipides, polymères ou polysaccharides)<sup>50</sup>. Afin d'augmenter l'efficacité des antibiotiques et réduire leurs effets secondaires, l'encapsulation des antibiotiques dans les NPs pourraient permettre de mieux cibler MTB. Par exemple, l'utilisation de NPs constitués de polymères contenant de la RIF, de l'INH et de la PZA chez les cochons d'inde infectés par MTB a permis de contrôler l'infection<sup>51</sup>. Cinq doses de NPs tous les 10 jours étaient suffisants et tout aussi efficaces pour éliminer MTB que 46 doses conventionnelles de médicaments libres.

En addition de leur rôle de transport dans les poumons, certains NPs peuvent moduler la réponse de l'hôte. Durant cette thèse, j'ai pu participer à l'étude de NPs composé d'un revêtement de chitosan sur la réponse des Mφs humains<sup>52</sup> (Annexe I). Ces NPs liés à des molécules de tri-mannose modulent l'expression des gènes liés au métabolisme cellulaire dans les Mφs infectés par MTB en comparaison aux NPs seuls. La régulation du métabolisme cellulaire en liant des ligands à la surface des NPs pourrait être une stratégie prometteuse pour reprogrammer les cellules immunitaires et améliorer l'efficacité des médicaments encapsulés. De plus, certains NPs sont dotées de propriétés antibactériennes intrinsèques. C'est le cas des NPs constitués de poly-cyclodextrines réticulées (pβCD) qui vont diminuer la charge de MTB chez la souris<sup>53</sup>. Ces NPs envahissent préférentiellement les Mφs alvéolaires, empêche l'entrée de MTB dans les Mφs par l'épuisement du cholestérol et induit l'apoptose des Mφs. Ainsi le rôle des NPs dans la TB semble prometteur, contribuant à mieux cibler les tissus et organes infectés et à réduire les doses des antibiotiques et leurs effets indésirables.

*Élément sous droit, diffusion non autorisée*

**Figure 4. Transmission et pathologie de la tuberculose** (adaptée de M. Gengenbacher & S.H.E Kaufmann, *FEMS Microbiol Rev.* 2012).

## II. *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* ET LE SYSTEME IMMUNITAIRE

Lors d'une infection à MTB, les Mφs vont déclencher une réponse immunitaire inflammatoire au niveau du site d'infection afin de recruter des cellules effectrices. Par la suite, se développe une structure particulière appelée le granulome, qui est constitué d'un amas cellulaire organisé impliquant les cellules de la réponse immunitaire innée et adaptative (figure 4). Le granulome va permettre de contrôler l'infection sans toutefois éliminer MTB. Un état d'équilibre entre le système immunitaire de l'hôte et le bacille va se mettre en place. Cependant toute rupture au profit du pathogène va entraîner sa dissémination et contribuer ainsi à la transmission de MTB chez un autre individu.

### 1. CYCLE D'INFECTION A *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*

#### **a. Infection à *Mycobacterium tuberculosis***

L'infection va être initiée lorsque les bacilles inhalés vont être phagocytés par les Mφs alvéolaires, première rencontre de MTB avec le système immunitaire. Une étude récente, basée sur le modèle murin, a pu révéler que l'infection précoce de MTB se produit principalement au sein des Mφs alvéolaires résidents des voies respiratoires<sup>54</sup>. Les espaces aériens des poumons impliquent des mécanismes qui limitent une réponse inflammatoire exacerbée afin de préserver la fonction alvéolaire. Il a été montré que MTB, présent au sein de ces Mφs alvéolaires, présentait une réponse au stress plus faible et une réplication plus élevée comparé aux Mφs interstitiels résidents<sup>55</sup>. Ces résultats soulignent ainsi le rôle des Mφs alvéolaires dans l'établissement de la maladie aux étapes précoces d'infection. Par la suite, MTB est présent dans l'espace interstitiel pulmonaire où il va pouvoir se répliquer. A l'aide de souris infectées par MTB, S.B. Cohen *et al.* ont pu observer que les Mφs alvéolaires se déplacent vers l'interstitium, par le biais de mécanismes pilotés par la signalisation de l'inflammasome dont le système de sécrétion ESX-1 de MTB est nécessaire<sup>54</sup>.

## **b. Recrutement des cellules de l'immunité innée**

MTB va résider principalement dans les cellules phagocytaires dont les Mφs, les cellules dendritiques et les neutrophiles<sup>56</sup>. MTB peut également pénétrer dans les cellules épithéliales et s'y répliquer, même si ces événements sont rares<sup>57</sup>. Cette restriction peut s'expliquer par la difficulté de MTB à rentrer dans ces cellules. Il a été montré que la protéine ArfGAP1 (*Arf GTPase-activating protein 1*) joue un rôle de barrière pour limiter l'entrée de MTB dans les cellules épithéliales<sup>58</sup>.

A l'aide d'un modèle murin, une identification et une quantification des cellules infectées ont permis de souligner le recrutement actif de différentes populations cellulaires au début de l'infection<sup>59</sup>. Après 14 jours d'infection (stade de l'immunité innée), les bacilles sont présents dans trois populations : les Mφs alvéolaires, les cellules dendritiques et les neutrophiles. Puis, au cours de l'infection (stade de l'immunité adaptative précoce), les Mφs interstitiels deviennent une nouvelle sous-population de cellules infectées, au détriment des Mφs alvéolaires. La population de neutrophiles infectés par MTB va diminuer mais la population de cellules dendritiques infectées reste importante après 21 jours d'infection. Différentes populations dont les lymphocytes T invariants associés aux muqueuses, les lymphocytes NKT ou encore les lymphocytes  $\gamma\delta$ T jouent également un rôle dans la surveillance et le contrôle de l'infection bactérienne précoce<sup>60</sup>. Récemment, A. Ardain *et al.*, ont pu démontrer que des cellules lymphoïdes innées de groupe 3 s'accumulent rapidement au niveau du site d'infection entraînant une accumulation des Mφs alvéolaires<sup>61</sup>.

Il est important de souligner que les neutrophiles tiennent un rôle complexe dans la TB, ayant à la fois une activité anti-mycobactérienne et une activité immunopathologique. Des résultats *in vitro* ont montré que les neutrophiles phagocytent rapidement MTB sans parvenir à les tuer et succombent après une dizaine d'heure d'infection<sup>62</sup>. Cependant, des études antérieures ont observés que les neutrophiles contribuaient à la résistance innée face à MTB par leurs peptiques antimicrobiens<sup>63</sup>. Les neutrophiles apoptotiques et les granules de neutrophiles, contenant tous deux des peptiques antimicrobiens actifs, peuvent être phagocytés par les Mφs et inhiber la croissance intracellulaire de MTB<sup>64</sup>.

### **c. Reconnaissance de *Mycobacterium tuberculosis* par les macrophages**

Les premières étapes de l'activation des réponses immunitaires innées lors d'une infection à MTB débutent par la reconnaissance du pathogène. Les PAMP (Pathogen Associated Molecular Patterns) de MTB sont reconnus par les PRR (Pattern Recognition Receptors) des cellules de l'immunité innée. Cette reconnaissance va permettre d'orchestrer principalement une réponse inflammatoire, à travers la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires. Les récepteurs de type Toll (TLR), principalement les TLR2, TLR4 et TLR9, vont reconnaître des motifs moléculaires de MTB<sup>65</sup>. Par exemple, le TLR2 va reconnaître les lipomannanes, les phosphatidylinositol mannosides (PIM) et le lipoarabinomannane (LAM) présents à la surface du pathogène activant par la suite une cascade de signalisation intracellulaire<sup>66</sup>. Le recrutement de protéines, dont la protéine MYD88 (différenciation myéloïde 88), va permettre d'activer le facteur de transcription NF- $\kappa$ B. Ce facteur de transcription joue un rôle primordial dans le contrôle de MTB par la production de multiples cytokines pro-inflammatoires, dont le TNF- $\alpha$ , l'IL-1 $\beta$  et l'IL-12<sup>65</sup>. Cette réponse va par la suite stimuler la production d'INF- $\gamma$  à partir des lymphocytes T voisins et activer les M $\phi$ s pour promouvoir les mécanismes effecteurs antimycobactériens. De nombreux PRR sont également impliqués dans l'interaction avec MTB : les récepteurs de lectine de type C, en particulier le récepteur du mannose qui est impliqué dans la phagocytose ou DC-SIGN (*Dendritic Cell-specific ICAM3-Grabbing Non-intergrin*)<sup>65</sup>, les récepteurs à la partie constante des immunoglobulines, les récepteurs *scavenger* et les récepteurs NOD-like (par exemple NOD2). L'étude de chacun des PRR est très enrichissante pour la compréhension des interactions entre la cellule hôte et MTB. Cependant, l'ensemble des interactions est plus complexe, puisque des reconnaissances simultanées ont lieu.

### **d. La réponse immunitaire adaptative contre *Mycobacterium tuberculosis***

Une des caractéristiques importantes de la réponse immunitaire adaptative contre MTB est son retard, qui est d'environ 9 à 11 jours après l'infection à MTB, contrairement à d'autres pathogènes dont la réponse des lymphocytes T débutent entre 3 et 5 jours après

infection<sup>67</sup>. Des études réalisées à partir de souris infectées par MTB ont montré une migration retardée des cellules dendritiques pour initier la réponse immunitaire adaptative<sup>68</sup>.

Les cellules dendritiques jouent un rôle central dans la mise en place de la réponse immunitaire adaptative. Ces cellules qui ont incorporé des corps apoptotiques de Mφs infectés<sup>69</sup> ou qui ont phagocyté MTB<sup>70</sup> vont migrer vers les ganglions lymphatiques sous l'action de chimiokines, dont CCL19 et CCL21. Ces cellules vont permettre la présentation des antigènes de MTB, par l'intermédiaire des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de type II, aux lymphocytes naïfs<sup>68</sup>. Les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> vont ainsi reconnaître des ligands de MTB et initier la réponse immunitaire protectrice. Cette activation des lymphocytes T spécifiques, par l'intermédiaire de la sécrétion de l'IL-12p40<sup>71</sup>, va entraîner leur expansion et vont pouvoir rejoindre le site d'infection. Il a été observé que la polarisation des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> vers un phénotype Th1 est essentiel pour la résistance à MTB chez l'hôte<sup>72,73</sup>. Les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> jouent également un rôle important dans la réponse immunitaire de MTB. Comme les lymphocytes T CD4<sup>+</sup>, les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> sont capables de produire de l'IFN-γ, du TNF-α et de l'IL-12. Ils vont également reconnaître les antigènes spécifiques de MTB présentés par les molécules de CMH de classe I des cellules infectées pour les tuer via une fonction de médiation granulaire (perforine, les granzymes et la granulysine) ou par apoptose suite à l'interaction de ligand Fas-Fas<sup>74</sup>.

Les lymphocytes T régulateurs, ayant une propriété d'inhiber la prolifération de lymphocytes T effecteurs sont présents lors d'une infection à MTB. A partir du modèle murin, il a été montré que ces lymphocytes T régulateurs empêchent le contrôle bactérien de MTB<sup>75</sup> et inhibent le recrutement des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> dans les poumons au début de l'infection<sup>76</sup>. Les lymphocytes T régulateurs contribueraient à une réduction du contrôle de MTB ainsi qu'à une réduction de l'inflammation aux niveaux des sites d'infection. Nous pouvons supposer que les lymphocytes T régulateurs contribuent à une réponse optimale face à MTB mais cette population doit être finement contrôlée, à défaut d'une altération de l'immunité contre MTB<sup>77</sup>.

*Élément sous droit, diffusion non autorisée*

**Figure 5. Cycle de vie de *Mycobacterium tuberculosis* au sein de son hôte associé à la formation de granulomes (adaptée de C.J Cambier *et al.*, *Cell*. 2014).**

En ce qui concerne la réponse humorale, les lymphocytes B sont présents au niveau du foyer d'infection. Toutefois leur rôle fonctionnel reste peu compris. La réponse des lymphocytes B est souvent considérée secondaire lors d'une infection par des pathogènes intracellulaires qui sont hors de portée de l'action des anticorps. Des études chez la souris montrent des résultats contradictoires dans le rôle de ces lymphocytes. Les lymphocytes B modèleraient la progression inflammatoire de la TB et la réponse des neutrophiles, participant ainsi aux confinements de MTB<sup>78,79</sup>. Il a été également montré que les lymphocytes B, par la sécrétion d'IFN- $\gamma$ , module la polarisation des M $\phi$ s vers un type M2, un état anti-inflammatoire permettant la régulation de l'inflammation<sup>80</sup>. Cependant, d'autres études ont révélé que la progression de la TB chronique ne nécessite pas l'intervention des lymphocytes B<sup>81</sup> et que leur épuisement chez les patients n'augmentaient pas le risque de réactivation de la TB<sup>82</sup>.

#### **e. Le granulome chez *Mycobacterium tuberculosis***

Le contrôle de MTB a lieu dans les granulomes. Le système immunitaire inné puis adaptative va former ces structures organisées contenant le bacille. Dans un premier temps, il a été supposé que ces granulomes étaient uniquement bénéfiques pour l'hôte afin de contenir et de limiter la croissance bactérienne<sup>83</sup>. Depuis, le rôle du granulome a été nuancé. Tout d'abord, sa mise en place se fait dès les premières étapes de la réponse immunitaire innée (Figure 5). A partir du modèle du poisson zèbre infecté par *M. marinum*, il a été montré que des granulomes se forment quelques jours après l'infection et qu'il est dépendant de facteurs de virulence<sup>84</sup>. Lorsque *M. marinum* est atténuée par l'absence du locus de virulence RD1, un défaut dans le recrutement des M $\phi$ s est observé entraînant un granulome non fonctionnel. La protéine de virulence ESAT-6 de MTB va induire l'action de la protéine MMP-9 sécrétées par les cellules épithéliales afin de recruter de nouveaux M $\phi$ s. La formation de granulomes précoces coïncide donc avec l'expansion bactérienne locale et une dissémination pour établir des granulomes secondaires lors des premières semaines d'infection<sup>85</sup>.

**Figure 6. Notion d'équilibre au sein du granulome pour contrôler la réplication de *Mycobacterium tuberculosis*** (adaptée de AM. Cadena *et al.*, *Nat Rev Immunol.* 2017).

En présence des cellules de l'immunité adaptative, l'organisation du granulome devient complète. Il est composé en périphérie de cellules dendritiques, de lymphocytes NK, de lymphocytes T, de lymphocytes B et de fibroblastes et en son centre de Mφs, de neutrophiles et de cellules géantes. Une zone de nécrose peut être présente, dues à la lyse des Mφs infectés. Cette structure est très dynamique, impliquant une perte continue de cellules due à leur mort et un recrutement permanent de cellules vers ce site nécessitant donc une vascularisation importante. Un équilibre est essentiel au sein du granulome entre le contrôle de MTB et sa réplication (Figure 6). Cependant, la formation du granulome mature ne suffit pas à éliminer le pathogène. Tout déséquilibre peut ainsi faire apparaître des granulomes caséux<sup>86</sup>, corrélés avec une augmentation de la charge bactérienne non contrôlée.

Mécanisme ciblé	Facteurs de virulence	Effets
Phagosomes-lysosomes	LppM <sup>87,88</sup> , LAM <sup>89</sup> , SapM <sup>90</sup> , PIM <sup>91</sup>	Arrêt de la maturation du phagosome
	ESAT-6/CFP-10 <sup>92</sup> , SecA 1/2 <sup>92</sup> , PtkA <sup>93</sup>	Inhibition de l'acidification du phagosome
	ESX-1 <sup>94,95</sup>	Rupture du phagolysosome
Autophagie	Eis <sup>96</sup>	Inhibition l'autophagie Augmentation de l'expression du microARN-27a, inhibition de la formation des autophagosomes
Espèces réactives	LAM <sup>90</sup>	Bloque l'action des ROS
	KatG <sup>97</sup> , SodA/C <sup>98</sup> , Tpx <sup>99</sup> , <i>uvrB</i> <sup>100</sup> , Lsr2 <sup>101</sup>	Résistance aux espèces réactives
Mort cellulaire	PknE <sup>102</sup> , Rv3364c <sup>103</sup> , NuoG <sup>104</sup>	Inhibition de l'apoptose
	ESAT-6 <sup>105</sup>	Induction de l'apoptose
	ESX-1 <sup>106</sup> TNT <sup>107</sup>	Induction de la nécrose Induction de la nécroptose
Inflammasome	ESX-1 <sup>108</sup>	Inhibition de l'inflammasome
Ions cuivre et zinc	CtpV <sup>109</sup> , MctB <sup>110</sup>	Résistance au cuivre
	CtpC <sup>111</sup>	Résistance au zinc

**Tableau 2. Exemples de facteurs de virulence de *Mycobacterium tuberculosis* modulant les activités bactéricides des macrophages.**

## 2. VIRULENCE ET ADAPTATION DE *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*

### a. Les facteurs de virulence de *Mycobacterium tuberculosis*

Afin de pouvoir survivre et se répliquer au sein de son hôte, MTB possède des facteurs de virulence qui sont impliqués dans l'interaction avec l'hôte, directement ou indirectement responsable des dommages pathologiques au cours de l'infection (Tableau 2).

MTB possède une enveloppe cellulaire fortement imperméable, composé d'une capsule, d'une membrane externe, d'une couche de peptidoglycane, d'une couche d'arabinogalactane et d'une membrane plasmique interne. Cette enveloppe est constituée d'un ensemble de lipides et de lipoprotéines qui vont être impliqués comme facteurs de virulence des mycobactéries chez l'hôte.

Pour permettre le transport de protéines à travers la membrane cellulaire et d'interagir avec l'environnement des cellules hôtes, MTB possède différents systèmes de sécrétion tel que la voie Sec, le système Tat (*Twin Arginine Translocation*) et des systèmes de sécrétion spécifiques (ESX) des mycobactéries<sup>112</sup>. Le génome de MTB comporte 5 locus *esx* qui codent pour cinq types de systèmes de sécrétion. Par exemple, le système ESX-1 va permettre la sécrétion d'effecteurs bactériens dont la protéine ESAT-6, protéine connu pour être impliquée dans la virulence de MTB<sup>113</sup>.

A l'aide de son arsenal dirigé contre son hôte, MTB va acquérir la capacité de survivre dans les cellules immunitaires et d'échapper aux mécanismes bactéricides des Mφs. Les effets de différents facteurs de virulence seront énoncés plus tard dans la prochaine partie de cette introduction (partie II. 3.).

### b. Changement métabolique de *Mycobacterium tuberculosis*

Contrairement à de nombreuses bactéries, MTB ne forme pas de spores mais possède la capacité d'être en dormance, un état non-répliatif associé par une faible activité

métabolique et une résistance aux médicaments. Cet état de MTB va lui permettre de survivre dans des conditions défavorables tel que dans les granulomes (environnement faible en oxygène). Cette adaptation dépend du système DosRST (deux protéines senseurs DosT et DosS et une protéine régulatrice DosR), qui est composé d'environ 50 gènes<sup>114</sup>. L'expression de ces gènes est induite dans des conditions d'hypoxie mais également dans des conditions défavorables observées dans les Mφs<sup>115,116</sup>. Les protéines senseurs vont permettre de percevoir la diminution en oxygène dans l'environnement, la concentration en oxyde nitrique (NO) et en monoxyde de carbone et une réduction du flux d'électrons de la chaîne respiratoire<sup>117,118</sup>. A la suite d'une de ces stimulations, DosS/T va phosphoryler la protéine régulatrice DosR afin de l'activer. Le facteur de transcription DosR contrôle le passage métabolique de MTB dans la phase de dormance dont sa délétion diminue sa viabilité à la suite d'une infection chez la souris et le cobaye<sup>119</sup>. DosR va permettre l'expression de la majorité des gènes induits lors du stress hypoxique dont sa propre régulation<sup>120</sup>.

Lorsque le facteur de stress est levé, MTB va pouvoir redevenir métaboliquement actif. Cette réactivation va faire intervenir un groupe de protéines Rpf (*resuscitation-promoting factors*) dont l'expression de ces gènes est régulée à la hausse durant ce processus<sup>121</sup>. Les protéines Rpf possèdent un domaine proche des transglycosylases lytiques, supposant ainsi leur rôle dans l'hydrolyse de la paroi cellulaire qui est une étape essentielle pour le processus de réactivation<sup>122</sup>. En plus de cette famille de protéines, DosR contribue à la reprise de la croissance de MTB lorsque le pathogène quitte cet état induit par le NO ou l'hypoxie<sup>123</sup>. Une étude *in vitro* portant sur l'étude du régulateur des gènes de protéases Clp a pu révéler son importance dans la réactivation de MTB à partir d'une dormance induite par hypoxie<sup>124</sup>. Ces protéases vont intervenir dans le maintien du renouvellement des protéines et dans la dégradation des protéines mal repliées permettant ainsi à la bactérie de reprendre une phase métaboliquement active.

### **c. Tolérance intrinsèque aux antibiotiques**

MTB possède de nombreux mécanismes afin de neutraliser certains produits chimiques toxiques pour sa survie, dont les antibiotiques. Ces mécanismes intrinsèques vont

limiter le nombre d'antibiotiques efficace mais également la mise en place de nouveaux antibiotiques.

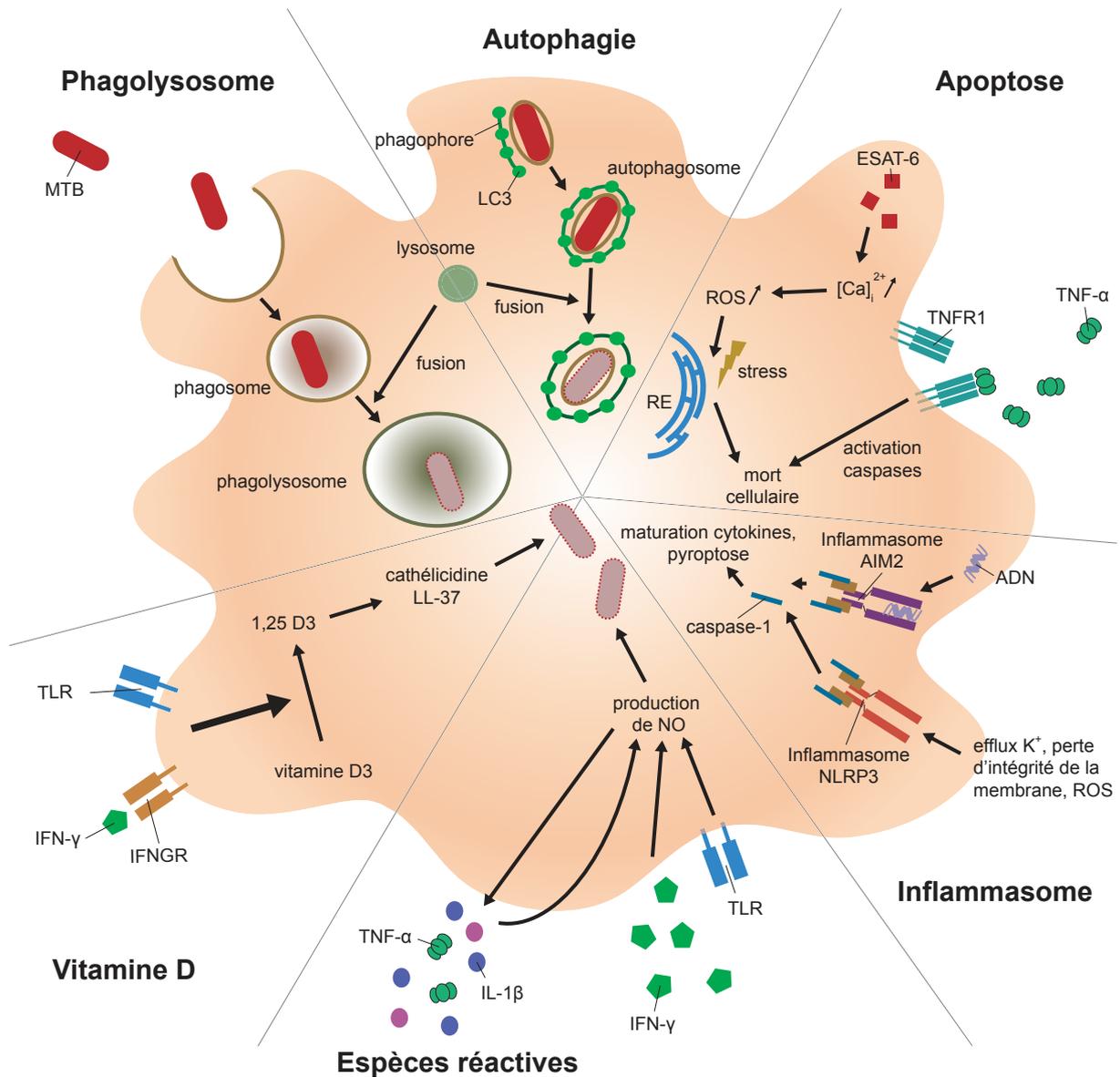
L'un des éléments clés à cette résistance intrinsèque de MTB est sa paroi cellulaire. Elle est peu perméable, constituant ainsi une barrière efficace contre la diffusion des antibiotiques dans la cellule. Dans le cas des  $\beta$ -lactames, qui comprennent les dérivés de la pénicilline, les composés prennent 100 fois plus de temps à diffuser à travers la paroi cellulaire de MTB que celle d'*Escherichia coli*<sup>125</sup>. Les études des mutants de MTB associés aux gènes impliqués dans la synthèse des composés de la paroi, montrent une sensibilité accrue aux anti-tuberculeux. L'inactivation du gènes *KasB* ou de l'opéron *virS-mymA*, impliqué dans la synthèse du mycolate, entraîne une sensibilité à la RIF, à l'INH, à la PZA et à la ciprofloxacine<sup>126,127</sup>. Mais au vu du temps de doublement très long de MTB, les antibiotiques ont le temps de s'accumuler à des niveaux permettant leur action avant la division cellulaire, ce qui rend la paroi cellulaire de MTB importante mais non essentielle à la résistance intrinsèque aux antibiotiques<sup>128,129</sup>.

MTB possède également des mécanismes de résistance afin de rendre non toxiques certains antibiotiques au niveau du cytoplasme en modifiant la structure des cibles des antibiotiques afin de diminuer leur liaison entre elles. C'est le cas des macrolides dont MTB est naturellement résistant<sup>130</sup>. Ces médicaments ont pour cible la sous-unité 50S des ribosomes, qui permet d'inhiber ainsi la synthèse des protéines et donc de diminuer la survie bactérienne. A l'aide du gène *erm37*, codant un ARN ribosomique méthyltransférase, MTB va modifier les structures ribosomales par méthylation de l'ARN ribosomal 23S et ainsi réduire l'activité inhibitrice de ces médicaments.

A l'aide de pompes à efflux, dont leur rôle premier intervient dans le métabolisme de MTB, certains antibiotiques vont être transportés vers le milieu extracellulaire, par un effet de transport non spécifique. A ce jour, 18 transporteurs ont été identifiés conférant une résistance aux antibiotiques<sup>131</sup>. L'opéron *iniBAC*, qui est associé à une activité similaire à une pompe et la pompe *EfpA* confèrent à MTB une résistance faible à l'INH et à l'EMB<sup>101,132</sup>. Il est intéressant de noter que ces gènes associés à ces pompes sont sous le contrôle du régulateur

Lsr2 qui est induit par la présence de l'INH ou de l'EMB, spécialisant ainsi la fonction de ces pompes dans la résistance aux antibiotiques.

Les antibiotiques doivent être transportés du compartiment sanguin jusqu'au lésions pulmonaires, diffuser dans les granulomes puis pénétrer l'enveloppe cellulaire de MTB pour atteindre sa cible à des concentrations efficaces et pendant un temps donné. Lors des phases cliniques, l'étude de la pharmacocinétique et la pharmacodynamie est prise en compte mais ces corrélations basées sur les paramètres de l'antibiotique dans le plasma ne suffisent pas toujours à décrire sa distribution. Par exemple, la concentration en RIF, en INH et en PZA au niveau des granulomes chez le lapin infecté par MTB ne représente seulement qu'une fraction de la concentration plasmatique alors que la MOX atteint des taux plus élevés dans les granulomes que dans le plasma<sup>133</sup>. La complexité et la diversité de la pathologie de la TB, la diversité des types cellulaires et la structure des lésions sont des facteurs importants pour l'action des antibiotiques sur MTB.



**Figure 7. Différents mécanismes de défenses des macrophages contre *Mycobacterium tuberculosis*.** RE : réticulum endoplasmique, LC3 : « *Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3* », TNFR1 : Récepteur 1 du TNF-α, IFNGR : Récepteur de l'IFN-γ, 1,25 D3 : 1,25-di-hydroxyvitamine D

### 3. LES MACROPHAGES FACE À *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*

Les phagocytes sont des cellules pouvant ingérer et tuer les micro-organismes. Cependant, MTB possède de nombreuses stratégies pour contourner les défenses de ces cellules, créant ainsi des conditions propices à sa survie et à sa prolifération.

#### a. Régulation de l'inflammation des macrophages

Les études sur l'interaction MTB-M $\phi$ s ont pu mettre en évidence que la population de M $\phi$ s impliquée dans l'infection est hétérogène. Leurs propriétés fonctionnelles varient en fonction des signaux de l'environnement, par la présence de cytokines et de chimiokines pro- ou anti-inflammatoires. Les M $\phi$ s ont été classés selon leur polarisation : M $\phi$ s activés classiquement (M1), stimulé par les ligands du TLR et de l'IFN- $\gamma$  ou en M $\phi$ s activées de manières alternatives (M2), stimulé par l'IL-4/IL-13 ainsi que l'IL-10. Le phénotype M1 est caractérisé par la production de cytokines pro-inflammatoires, d'espèces réactives à l'oxygène et des radicaux libres qui sont associées à une forte activité microbicide (Figure 7). Le contrôle de MTB est principalement due à cet état d'activation des M $\phi$ s. Le type M2 est caractérisé par l'expression de cytokines anti-inflammatoires (dont l'IL-10), le remodelage tissulaire et des fonctions immuno-régulatrices. Cependant, cette notion de polarisation bipolaire M1/M2 est simplifiée, mais en réalité elle recouvre un continuum d'états fonctionnels.

La polarisation des M $\phi$ s intervient durant tout le cycle d'infection à MTB. Bien que l'IFN- $\gamma$  est primordial pour la protection contre MTB, il est évident que l'interaction de l'hôte avec MTB est beaucoup plus complexe et ne repose pas seulement sur l'induction des réponses immunitaires liées à l'IFN- $\gamma$ . Les états d'activation des M $\phi$ s sont dynamiques en réponse aux médiateurs de leurs environnements. Une étude portée sur les populations de M $\phi$ s présents au sein de granulomes de macaques infectés par MTB a pu souligner que l'état des M $\phi$ s n'est pas binaire mais au contraire très diversifiée et qu'une séparation spatiale entre les M $\phi$ s pro- et anti-inflammatoires pouvait être observée<sup>134</sup>. Les M $\phi$ s de type M1 étaient producteur d'iNOS mais que les M $\phi$ s de type M2 étaient producteur d'arginase. Les auteurs

ont pu démontrer que les Mφs situés au centre produisaient plus d'iNOS et les Mφs en périphérie plus d'arginase. Un équilibre continu et dynamique entre les signaux pro- et anti-inflammatoires semble nécessaire pour contrôler l'inflammation et limiter la croissance bactérienne.

MTB module la polarisation des Mφs à son avantage. Le facteur de virulence ESAT-6 de MTB va inhiber l'activation de NF-κB et de l'IFN en régulant négativement la signalisation de TLR2<sup>135</sup>. MTB aura la capacité de moduler indirectement la polarisation de type M1 par l'inhibition de la transcription des gènes lié à l'IFN-γ par l'effet de l'IL-6<sup>6</sup>. L'une des autres stratégies de MTB pour éviter les activités bactéricides des Mφs est d'induire une polarisation de type M2. L'IL-10 induite par MTB favorise la polarisation M2 entraînant une diminution des mécanismes bactéricides<sup>136</sup>. En plus des mécanismes de polarisation, MTB va moduler les Mφs à partir des monocytes, précurseurs des Mφs. Chez les patients tuberculeux, une augmentation importante de la population de monocytes CD16<sup>+</sup> est observée. Ces monocytes vont se différencier vers un profil de type M2, dont leur proportion est corrélée directement à la gravité de la maladie<sup>137</sup>.

#### **b. Phagocytose et maturation des phagosomes**

Lors de la reconnaissance d'un agent pathogène, des voies de signalisations sont déclenchées entraînant une polymérisation de l'actine et la formation de la cupule phagocytaire. Cet englobement du pathogène est médié par des récepteurs dont les récepteurs Fcγ, qui nécessite le recrutement de protéines GTPases dont Rac<sup>138</sup>. La fermeture de cette cupule phagocytaire marque l'entrée de l'agent pathogène dans les Mφs qui conduit à la formation du phagosome précoce. A l'aide de la fusion avec des vésicules de transport endosomaux, la composition des phagosomes en protéines et en lipides va changer constamment. Les étapes de maturation des phagosomes peuvent ainsi être divisées en trois grands stades : les phagosomes précoces (environ 10 min après la phagocytose), les phagosomes tardifs (10 à 30 min après la phagocytose) puis les phagolysosomes (plus de 30 min après la phagocytose)<sup>139</sup>.

Les phagosomes précoces ressemblent à des endosomes avec une acidification légère (pH 6,1-6,5). Le phosphatidylinositol-3-phosphate (PI3P) et la GTPase Rab5A vont recruter des protéines indispensables pour la maturation tel que l'antigène endosomal 1 précoce<sup>139</sup>. Le phagosome précoce va fusionner avec des endosomes de recyclage afin de renouveler certaines molécules impliquant la protéine COP1 et des GTPases. Le phagosome va poursuivre sa maturation en atteignant le stade de phagosome tardif. Son pH va diminuer à un pH situé entre 5,5-6 par l'acquisition de la pompe à proton, la V-ATPase. Le phagosome va contenir des protéases tels que les protéases à cystéine et à sérine, les cathepsines B, L et D, les peptidases et les glycosidases. La membrane de ces phagosomes va acquérir les protéines membranaires LAMP (*Lysosomal Associated Proteins*) et Rab7 qui va permettre la fusion avec les lysosomes. Cette fusion est caractérisée par un pH de 4-4,5 et des activités hydrolases importantes. Le phagolysosome va posséder des propriétés anti-microbiennes tels que le pH acide, les peptides antimicrobiens, la production d'espèces réactives oxygénées (ROS, *reactive oxygen species*) et azotées (RNS, *reactive nitrogen species*) et l'appauvrissement des nutriments.

Cependant, MTB possède la capacité d'inhiber l'action des phagosomes en stoppant leur maturation. Par exemple, il a été montré que la lipoprotéine LppM de MTB va être impliqué dans l'arrêt de la maturation du phagosome<sup>87,88</sup>. Les LAM, présent au niveau de l'enveloppe cellulaire de MTB, inhibe le recrutement de PI3P en bloquant la régulation du calcium<sup>89</sup>. Un autre exemple est la phosphatase SapM, sécrété par MTB, qui hydrolyse le PI3P inhibant la maturation du phagosome<sup>90</sup>. De nombreux lipides ont été décrits comme facteur de virulence pouvant s'insérer au niveau des membranes des endosomes, dont les PIM qui vont se lier sur les membranes des endosomes et diminuer leur stabilité<sup>91</sup>. Le second mécanisme pour limiter l'action du phagolysosome est l'inhibition de l'acidification. Le complexe ESAT-6/CFP-10, sécrété par le système de sécrétion ESX-1, et la protéine secA 1/2 vont stopper la diminution du pH en empêchant l'accumulation des enzymes ATP et GTP<sup>92</sup>. La protéine tyrosine phosphatase PtkA chez MTB va également stopper l'acidification en inhibant la V-ATPase<sup>93</sup>. Il a été montré que l'infection des Mφs par MTB induit la dégradation de V-ATPase par l'induction de la protéine CISH (*cytokine-inducible SH2-containing protein*)<sup>140</sup>. Un des mécanismes de MTB pour éviter l'action du phagolysosome est de s'en échapper. Plusieurs publications ont souligné la capacité de MTB de provoquer une rupture du phagolysosome<sup>94,95</sup>. Ce phénomène semble entraîner la mort nécrotique du Mφs à la suite de

son échappement et accélérer la croissance de MTB<sup>141</sup>. Face à cet environnement acide, MTB va induire l'expression de gènes impliqués dans la résistance à un environnement acide<sup>142</sup> et possède une enveloppe mycobactérienne efficace les rendant moins sensible au pH extracellulaire<sup>143,144</sup>.

### c. Autophagie

L'autophagie joue un rôle crucial dans divers processus biologiques comme le vieillissement, le développement, le cancer mais aussi dans la résistance aux agents pathogènes<sup>145,146</sup>. C'est une réponse au stress par laquelle les cellules peuvent éliminer les organites endommagés, des agrégats de protéines ou encore les agents pathogènes intracellulaires tel que MTB par un processus de dégradation lysosomale. L'autophagie est initiée par la formation d'une structure à double membrane, séquestrant le pathogène, qui forme une vacuole autophagique appelée autophagosome<sup>147</sup>. Ces membranes proviennent principalement du réticulum endoplasmique mais des compartiments supplémentaires (appareil de golgi, endosomes) peuvent intervenir. Cette formation nécessite des protéines *Atg* (*Autophagy Related Genes*). Le complexe ATG1/ULK et le complexe PI3K de classe III sont des éléments essentiels dans la phase d'initiation à la formation des autophagosomes. La fermeture des autophagosomes est médiée par le complexe ATG5-ATG12-ATG16L1 et ATG8 associé à LC3<sup>147</sup>. Par la suite, l'autophagosome va fusionner avec les lysosomes pour former un compartiment capable de dégrader les agents pathogènes appelé phagolysosome. Ce compartiment présente des propriétés lytiques et antimicrobiennes beaucoup plus robustes que les phagosomes, menant MTB à son élimination<sup>147</sup>.

MTB possèdent plusieurs mécanismes afin d'inhiber ou de moduler cette voie. L'IL-6, produite par les Mφs infectés par MTB va inhiber la réponse à l'INF-γ. Cette inhibition va ainsi limiter les activités bactéricides des Mφs dont la biogénèse d'autophagosomes<sup>148</sup>. D'autre part, une étude a également pu montrer l'importance de la protéine Eis de MTB dans la régulation de l'autophagie<sup>96</sup>. En effet, l'absence de Eis provoque une augmentation des vacuoles autophagiques et la formation des autophagosomes dans les Mφs infectés, par la régulation positive de la voie akt/mTOR<sup>149</sup>.

MTB a également la capacité d'interagir avec les microARN, ARN simple brin non codant, qui jouent un rôle dans la régulation des fonctions des Mφs. Pour citer l'une des régulations des microARN, l'infection à MTB va augmenter l'expression du microARN-27a, dont sa cible est un transporteur de calcium localisé au niveau du réticulum endoplasmique<sup>150</sup>. Bloquant la formation de ce transporteur, la perte de la signalisation du calcium va inhiber la formation des autophagosomes et entraîner la survie intracellulaire de MTB.

#### **d. Espèces réactives**

Les cellules de l'immunité innée, tel que les Mφs, peuvent produire des agents antimicrobiens puissants dont les intermédiaires de RNS. Les Mφs sont les principaux producteurs de NO. Sa production est induite par la dégradation de la L-arginine en NO par l'enzyme iNOS. Le NO est converti en RNS par la formation de  $\text{NO}_3^-$  et de  $\text{NO}_2^-$ . Dans les Mφs murins infectés par MTB, la réponse aux stress oxydatifs et nitriques actifs sont présents chez le pathogène soulignant la présence des composés au sein même de ces compartiments<sup>115</sup>. Toujours dans un modèle murin qui est déficient en iNOS, une augmentation de la dissémination de MTB et de la mortalité est constatée<sup>151</sup>. Mais il est important de souligner que contrairement au modèle murin, le rôle du NO sur MTB chez l'homme est controversé puisque la quantité de NO produite est plus faible<sup>152</sup>. Cependant, il a été montré que dans les lésions tuberculeuses des poumons de patients, une expression élevée de l'oxyde nitrique synthase et des marqueurs associés à NO est observée<sup>153</sup>. De plus, l'expression de iNOS et de la production de NO sont augmentées dans les cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC) de patients tuberculeux par rapport aux témoins sains<sup>154</sup>.

Les mécanismes d'initiations pouvant déclencher l'expression de NO sont l'activation des TLR ou par l'INF- $\gamma$ <sup>155</sup>. En addition de son activité anti-bactérienne, il est important de signaler que le NO régulerait la synthèse et la libération de cytokines pro-inflammatoires, dont l'IL-1 $\beta$ , le TNF- $\alpha$  et l'IL-8, qui exercent une régulation autocrine sur la production de NO<sup>156</sup>.

D'autres agents antimicrobiens produit par les Mφs à l'origine du stress oxydant sont les ROS. L'enzyme NADPH phagocyte oxydase (NOX2) va permettre la synthèse des ROS par

réduction de l'oxygène en  $O_2^-$ <sup>157</sup>. Cependant ces agents ne semblent pas avoir un rôle significatif dans le contrôle de MTB<sup>158</sup>. La déficience en NOX2 n'influence pas la croissance de MTB dans les Mφs. Cela pourrait s'expliquer par des mécanismes efficaces de résistance aux ROS. En effet, la paroi cellulaire de MTB, est particulièrement le LAM, va permettre d'inhiber l'activité des ROS<sup>90</sup>. En plus de sa paroi et du facteur du stress oxydatif SigH nécessaire pour sa survie<sup>159</sup>, le pathogène produit la catalase peroxydase KatG, la superoxyde dismutase SodA et C et la thioredoxine reductase Tpx qui vont lui permettre d'être résistant aux ROS et aux RNS<sup>97-99</sup>. KatG va permettre la décomposition du composé toxique, le peroxyde d'hydrogène  $H_2O_2$ , en  $H_2O$  et  $O_2$  alors que SodA et C vont transformer l'anion superoxyde  $O_2^-$  en peroxyde d'hydrogène  $H_2O_2$ . Le rôle de Tpx consiste à la détoxification de  $H_2O_2$ , du peroxyde et du dinitrobenzène.

L'ADN est également une cible des ROS et des RNS chez MTB. Des mutants de MTB touchant des gènes de réparations de l'ADN sont plus susceptibles à la présence d'espèces oxygénées ou azotées. A partir de ces mutants, les auteurs ont pu identifier le rôle du gène *uvrB*, codant pour une protéine de réparation de l'ADN, qui confère une résistance aux RNS *in vivo* et de la protéine histone-like Lsr2 qui elle lui confère une résistance aux ROS<sup>100,160</sup>. Cette protéine régulatrice Lsr2 va également participer à de multiples processus cellulaires, dont la biosynthèse de la paroi chez MTB et représente un facteur de virulence important chez *M. abscessus*, agent pathogène parmi les mycobactéries atypiques<sup>161</sup>.

#### **e. Mort cellulaire**

Le contrôle de la mort cellulaire est un processus important dans la dissémination bactérienne mais également dans l'immunité<sup>162</sup>. Les Mφs peuvent subir plusieurs types de mort cellulaire dont l'apoptose et la nécrose. Ces deux formes semblent avoir des résultats différents pour l'évolution de l'infection à MTB. L'apoptose est un phénomène définie par la condensation et la fragmentation de l'ADN et la formation de corps apoptotiques, fragments pouvant être rapidement phagocytés par les cellules voisines<sup>163</sup>. C'est un processus qui nécessite de l'énergie et sera initié par l'activation du TNF- $\alpha$ . Par la suite, le recrutement du complexe appelé DISC (Death-Inducing Signaling Complex) s'effectue, qui est composé de

molécules adaptatrices FADD et des pro-caspases initiatrices -8 et -10<sup>164</sup>. La formation de ce complexe va induire l'activation des caspases afin d'entraîner la dégradation ordonnée du contenu cellulaire et la formation des corps apoptotiques. L'apoptose des cellules infectées peut être considérée comme un avantage dans le contrôle de MTB. Il permet l'élimination d'un environnement favorable pour MTB à sa réplication<sup>165,166</sup> et peut également constituer une source de présentation d'antigènes de MTB afin de stimuler les réponses des lymphocytes T<sup>167</sup>. L'explication de ce dernier phénomène fait intervenir l'efférocytose, la phagocytose des corps apoptotiques par les cellules phagocytaires avoisinantes. L'efférocytose par les Mφs permet donc de contrôler la croissance de MTB mais pas uniquement. MTB pourrait induire l'apoptose dans les Mφs provoquant ainsi la libération de vésicules apoptotiques qui transportent des antigènes mycobactériens. Ces vésicules phagocytées par les cellules dendritiques non infectées vont permettre la présentation croisée ultérieure d'antigènes, par le CMH-I et le CD1b aux lymphocytes T<sup>167</sup>.

Plusieurs études ont suggéré que MTB utilise l'inhibition de l'apoptose comme mécanisme de virulence. Plusieurs protéines de MTB sont impliquées tel que PknE<sup>102</sup>, Rv3364c<sup>103</sup> ou encore NuoG<sup>104</sup>. Par exemple la protéine Rv3364c va se lier à la cathepsine G inhibant ainsi son activité enzymatique et son rôle dans l'activation en aval de l'apoptose. Un autre exemple est la sous-unité NuoG qui est impliquée dans la formation de la déshydrogénase de la NADH de type-I chez MTB. Ce complexe va pouvoir neutraliser la production de ROS induite par l'enzyme de l'hôte NOX-2 permettant ainsi d'empêcher l'induction de la sécrétion de TNF-α et l'apoptose cellulaire. Cependant, ce modèle d'inhibition de l'apoptose par MTB semble être contredit. Il a été démontré que les souches virulentes de MTB stimulent la mort des Mφs par apoptose. En effet, l'antigène mycobactérien ESAT-6, va être sécrété et va induire une cascade de signalisation impliquant le stress du réticulum endoplasmique et donc promouvoir une réponse apoptotique<sup>105</sup>. D'après ces observations, l'apoptose induite par MTB pourrait être favorable à sa dissémination.

Contrairement à l'apoptose, le phénomène de nécrose est caractérisé par une augmentation du volume cellulaire, une hydrolyse désorganisée de la chromatine et de l'ADN et la perte de l'intégrité de la membrane plasmique conduisant à un déversement du contenu intracellulaire dans l'espace extracellulaire<sup>163</sup>. La nécrose est induite par la

perturbation des fonctions mitochondriales et l'inhibition des systèmes de réparation de la membrane plasmique<sup>168</sup>. Par conséquent, la nécrose est considérée comme une mort cellulaire pro-inflammatoire et pathologique qui entraîne des lésions tissulaires importantes. Lors d'une infection à MTB, la mort cellulaire de type nécrose est observée permettant la libération de MTB et sa dissémination<sup>169</sup>. Il a été également montré que MTB induisait la nécrose des neutrophiles humains, dépendante de ESX-1 pour favoriser sa croissance<sup>106</sup>. L'induction de la nécrose pourrait être bénéfique pour MTB dans sa dissémination et dans sa réplication.

MTB déclenche d'autres voies de mort cellulaire, dont la nécroptose et la ferroptose. Contrairement à l'apoptose et à la nécrose, le phénomène de nécroptose, indépendant de l'activité des caspases, est régulé par l'interaction de RIPK (*receptor interacting protein kinase 3*) et de MLKL (*mixed lineage kinase domain-like*)<sup>170</sup>. Récemment, une étude a pu mettre en évidence le rôle de la TNT (*tuberculosis necrotizing toxin*), sécrété par MTB, dans l'induction de cette voie par l'activation du complexe RIPK3/MLKL<sup>107</sup>. La ferroptose est une mort cellulaire impliquant une quantité importante de fer libre et/ou de lipides oxydés toxiques<sup>171</sup>. Récemment, Amaral *et al.* ont pu identifier que les Mφs nécrotiques infectés par MTB possédaient un contenu lipidique oxydé important et une quantité de fer libre augmentée, reflétant ainsi la ferroptose<sup>172</sup>.

#### **f. L'inflammasome**

L'inflammasome permet la production de cytokines pro-inflammatoires entraînant une augmentation de l'activité bactéricide des cellules immunitaires ou entrainer la pyroptose, une mort des cellules infectées<sup>173,174</sup>. Lors d'une infection à MTB, des membres de la famille des récepteurs NLR, une molécule adaptatrice ASC et la pro-caspase 1 vont former le complexe de l'inflammasome. Par la suite, l'activation de la caspase-1 va permettre le clivage des précurseurs de l'IL-1 $\beta$  et de l'IL-18. L'IL-18 active va former un complexe avec son récepteur, IL-18R. Son rôle principal est d'induire la production de cytokines, tel que l'INF- $\gamma$ , le TNF- $\alpha$  ou le GM-CSF mais peut aussi induire la prolifération des lymphocytes T<sup>175</sup>. La

seconde cytokine induite par ce complexe d'inflammasome, l'IL-1 $\beta$ , va s'associer avec ses récepteurs spécifiques : l'IL-1R1 ou l'IL-1RII. Elle va également jouer un rôle dans l'initiation de l'immunité antimicrobienne à travers la libération de TNF- $\alpha$ , l'IL-6 et induire la réponse Th1<sup>176</sup>. L'inflammasome tient une place importante dans la réponse immunitaire de l'hôte contre MTB. Des souris déficientes pour les récepteurs associés à l'IL-1 $\beta$  ou à l'IL-18 sont plus susceptibles à MTB, soulignant ainsi leurs rôle dans l'immunité<sup>177,178</sup>. Concernant MTB, deux complexes d'inflammasomes vont intervenir, l'un contenant NLRP3 et le second AIM2<sup>179</sup>.

La réponse de l'inflammasome NLRP3 aura un rôle direct dans l'immunité par la maturation de l'IL-1 $\beta$ , IL-18 et l'activation de la pyroptose. Le mécanisme d'activation fait encore débat mais trois processus d'activation sont proposés : l'efflux d'ions potassium de la cellule<sup>180</sup>, une lésion de la membrane du phagolysosome et la libération de son contenu dans le cytosol<sup>181</sup> et/ou l'induction du complexe par la libération de ROS mitochondriales<sup>182</sup>.

Ce qui diffère l'inflammasome AIM2 de NLRP3 n'est pas sa réponse, puisqu'il a toujours pour but la libération de caspase-1 mature, mais son activation. Le récepteur AIM2 est déclenché en réponse à la présence d'ADN double brin présent dans le cytosol<sup>183</sup>. Cette liaison va entraîner un changement de conformation permettant le recrutement de la protéine ASC et donc de la pro-caspase-1. Une étude a montré que des souris déficientes pour le gène *aim2* sont plus susceptibles à une infection à MTB, soulignant l'importance de ce type d'inflammasome dans la TB<sup>184</sup>.

MTB peut limiter l'activation de l'inflammasome. Il a été montré que MTB, dépendant de ESX-1, inhibe l'activation de l'inflammasome AIM2 induite par *M. smegmatis* ou par de l'ADN double brin transfecté<sup>108</sup>. MTB va permettre d'inhiber la production et la signalisation d'INF- $\beta$  qui est partiellement responsable de l'inhibition de l'activation de AIM2.

### **g. Les ions cuivre et zinc face à *Mycobacterium tuberculosis***

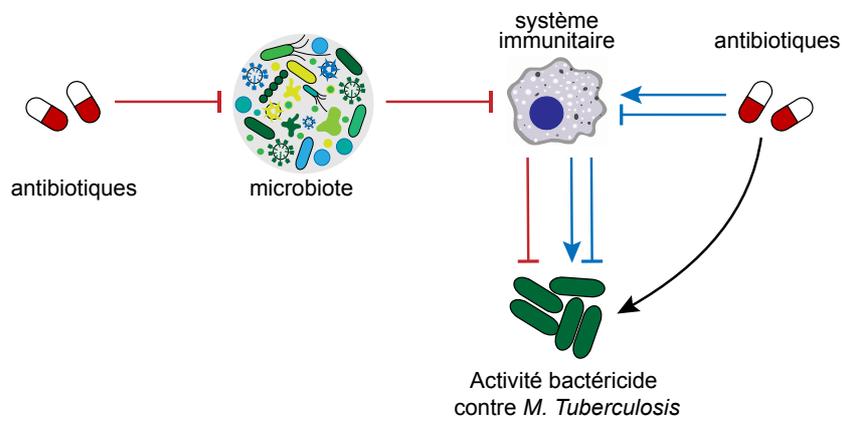
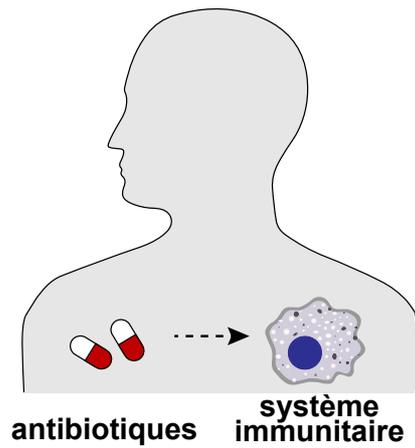
L'hôte va accumuler dans la vacuole mycobactérienne les métaux cuivre et zinc à des concentrations toxiques afin de tuer MTB<sup>185</sup>. Il a été montré chez des cobayes infectés par MTB que le taux de cuivre est plus élevé dans les granulomes en comparaison au taux de cuivre dans le tissu pulmonaire non infecté<sup>110</sup>. Les activités antibactériennes d'une forte concentration de cuivre sont dues à l'inhibition des déshydratases perturbant l'assemblage des cofacteurs fer-soufre chez MTB<sup>186</sup>. Cependant MTB possède la capacité de détourner les effets néfastes du cuivre. Ce pathogène va posséder des pompes d'efflux de métaux, dont le transporteur de cations P-ATPase CtpV qui joue probablement un rôle de pompe d'efflux du cuivre<sup>109</sup>. De plus, MTB va posséder une autre protéine membranaire, MctB, qui est nécessaire pour sa résistance au cuivre<sup>110</sup>.

Le zinc va être également un des métaux qui va s'accumuler au sein du phagosome, dont le phagosome mycobactérien<sup>111</sup>. Pour lutter contre ce mécanisme, MTB possède la P-ATPase CtpC qui va permettre de neutraliser les effets toxiques du zinc des Mφs par un efflux du Zn<sup>2+</sup><sup>111</sup>.

### **h. La vitamine D et la cathélicidine**

Avant l'apparition de l'antibiothérapie, bien qu'il n'y avait pas eu encore de lien établi entre la vitamine D et la TB, les patients atteints de la TB étaient isolés dans des sanatoriums afin de recevoir un traitement à l'air libre et à la lumière du soleil<sup>187</sup>. Ce traitement suggérait une amélioration des signes cliniques de la TB. Plus tard, des études ont pu mettre en évidence le rôle du métabolite bioactif, la 1,25-di-hydroxivitamine D (1,25 D3) et sa liaison à son récepteur de la vitamine D dans la réponse des Mφs contre MTB. L'activation de l'hétérodimère TLR1/2 des Mφs humains augmente l'activité de la 1,25 D3 conduisant à une diminution de la survie intracellulaire de MTB<sup>188</sup>. Il a été démontré que l'IFN-γ induit également l'activation anti-microbienne de la 1,25 D3 dans les Mφs humains<sup>189</sup>. La vitamine D active va avoir un rôle dans divers mécanismes de défense dont l'induction de l'autophagie, dans la production de NO et dans la fusion du phagosome-lysosome dans les Mφs.

La vitamine D va également permettre d'augmenter l'activité anti-microbienne de la cathélicidine LL-37 présente chez l'homme. Ce peptide anti-microbien, détecté chez les patients atteints de TB, va permettre de former des pores et lyser les bactéries diminuant ainsi la survie de MTB<sup>188</sup>. Elle va aussi avoir un rôle important dans l'induction de l'autophagie via l'action de la vitamine D, dans la libération de cytokines pro-inflammatoires et dans la libération de ROS<sup>190</sup>.



**Figure 8. Effets des antibiotiques lors d'un traitement anti-tuberculeux sur l'hôte.** En addition à l'action des anti-tuberculeux sur MTB (flèche noire), les antibiotiques peuvent moduler les réponses immunitaires de l'hôte, indirectement par une dysbiose du microbiote (flèches rouges) ou directement en modulant les fonctions des cellules de l'immunité (flèches bleues). Ces modulations vont ainsi impacter la croissance de MTB.

### III. L'IMPACT DE L'ANTIBIOTHERAPIE SUR LE SYSTEME IMMUNITAIRE

En plus de l'impact de MTB sur le système immunitaire de l'hôte, certains antibiotiques vont également avoir la capacité de moduler les réponses immunitaires. Ils vont interférer avec le système immunitaire de deux façons (Figure 8) : indirectement en provoquant une dysbiose du microbiote chez les patients ou directement en modulant les fonctions des cellules immunitaires innées et/ou adaptatives. Ainsi ces interactions vont avoir un impact sur l'efficacité du traitement mais également sur la vulnérabilité de l'hôte à une infection concomitante.

#### 1. Le microbiote et les anti-tuberculeux

##### a. La relation entre le microbiote et le système immunitaire

Le microbiote humain est composé de bactéries, d'archées, de virus, de champignons et de protozoaires qui réside dans et sur le corps humain. Ainsi, le corps humain contient diverses communautés microbiennes dans des niches comme l'intestin, la cavité buccale, le vagin ainsi que les voies respiratoires inférieures (œsophage, poumons) qui était considéré auparavant comme un milieu stérile. Le microbiote joue un rôle important dans la santé humaine et tient une place fondamentale dans l'induction, la formation et le fonctionnement du système immunitaire de l'hôte. En échange, le système immunitaire va permettre de maintenir la relation symbiotique de l'hôte avec le microbiote permettant ainsi, dans un environnement optimal, d'induire des réponses protectrices contre les agents pathogènes<sup>191</sup>.

Le microbiote intestinal est primordial dans le développement et la fonction du système immunitaire. Sa présence va permettre la maturation des tissus lymphoïdes associés à l'intestin impliqué dans la présentation de l'antigène et dans l'inflammation<sup>192</sup>. Il va également permettre la régulation des lymphocytes T helper 17, associée à régulation de l'inflammation et aux défenses anti-microbiennes<sup>193</sup>. De plus, il est reconnu que le microbiote intestinal participe aux développement des lymphocytes T régulateurs, cellules primordiales

dans le maintien de l'homéostasie de l'immunité<sup>194</sup>. En addition de son rôle dans le développement du système immunitaire, il va permettre l'induction des défenses de l'hôte au cours d'une infection. Le microbiote intestinal va contribuer à la production du mucus et de molécules anti-microbiennes, dont REGIII par les cellules épithéliales pour inhiber l'invasion du pathogène<sup>195,196</sup>. Elle va également renforcer l'immunité innée, à travers une régulation de cytokines contre les agents pathogènes<sup>197,198</sup>.

L'étude récente du microbiote des poumons suggère son rôle dans l'immunité de l'hôte. Une dysbiose de ce microbiote peut contribuer aux maladies pulmonaires chroniques, dont l'asthme. Il a également été montré que la composition du microbiote pulmonaire influence l'activation de la réponse TLR4 des Mφs alvéolaires<sup>199</sup>. Mais le microbiote pulmonaire n'est pas un microbiote isolé. Le microbiote intestinal influe sur l'immunité pulmonaire par le biais de l'axe intestin-poumon. L'axe intestin-poumon va influencer les réponses immunitaires à la fois localement et sur des sites distants. Par exemple, les altérations du microbiote intestinal induit par des antibiotiques augmente le risque de développer une maladie allergique des voies respiratoires<sup>200</sup>.

## **b. Le microbiome et la tuberculose**

Des études ont pu mettre en évidence le rôle du microbiote intestinal dans la TB. Chez des patients tuberculeux, avant le commencement de l'antibiothérapie, la composition du microbiote intestinal change rapidement<sup>201,202</sup>. Une augmentation de la diversité bactérienne intestinale est observée, soulignant l'effet du pathogène dans cette communauté microbienne. La richesse et l'abondance des microorganismes semblent révéler des différences entre les patients atteints d'une TB comparé à des cas contrôles pour le microbiote pulmonaire (sans traitement anti-tuberculeux au préalable)<sup>203</sup>. Cependant, il n'y a pas d'explication à ce jour sur l'impact de la modification de la diversité bactérienne chez les patients mais une dysbiose du microbiote intestinal contribuerait aux processus pathologiques de la TB. A la suite d'une dysbiose intestinale chez la souris, une susceptibilité à l'infection de MTB est observée<sup>204</sup>. Cette susceptibilité est liée à une diminution du nombre

de lymphocytes T invariants associés aux muqueuses qui ont un rôle dans la protection contre les agents pathogènes pulmonaires.

### c. Les anti-tuberculeux sur le microbiote

L'administration d'antibiotiques résulte d'une diminution rapide de la diversité des microorganismes. L'impact des antibiotiques sur le microbiote varie en fonction du spectre d'action de l'antibiotique mais également de ces propriétés pharmacologiques et de la durée du traitement.

L'impact des anti-tuberculeux de première intention a été évalué sur le microbiote intestinal de patients<sup>201,205</sup>. Un changement dans la quantité des taxons bactériens est observé : les taxons *Ruminococcus*, *Coproccus* et *Bifidobacterium*, ont été appauvri respectivement d'environ 665 fois, 200 fois et 20 fois. Ces changements pourraient moduler le système immunitaire puisque ces taxons ont été associés à des phénotypes immunitaires. Les taxons *Ruminococcus* et *Coproccus* vont pouvoir moduler la production de cytokines, dont l'IL-1 et l'IFN- $\gamma$ <sup>206</sup> et le taxon *Bifidobacterium* va induire une réponse immunitaire Th17 agissant comme médiateur dans les défenses immunitaires<sup>207</sup>. Le taxon *Bacterioides*, également appauvri par un traitement anti-tuberculeux, peut moduler les réponses inflammatoires en agissant sur les lymphocytes T régulateurs chez la souris<sup>208</sup>. L'ensemble de ces résultats suggèrent que la perturbation du microbiote intestinal par les anti-tuberculeux module la réponse immunitaire de l'hôte et affecte potentiellement la survie de MTB. Pour tester cette hypothèse de prochaines études seront nécessaires afin de pouvoir associer les changements du microbiome à des marqueurs immunologiques liés à la TB. Il est important de souligner l'effet durable de cette antibiothérapie sur le temps. En analysant le microbiote intestinal de patients guéris, ce changement décrit précédemment peut persister en moyenne après 1,2 ans. Ainsi cette altération persistante peut possiblement contribuer à une infection ultérieure par d'autres agents pathogènes.

<b>Système immunitaire innée</b>		
<b>Antibiotique(s)</b>	<b>Type(s) cellulaire(s)</b>	<b>Effets/ Mécanismes</b>
<b>INH, PZA</b> <sup>209</sup>	Macrophages murins et humains infectés par MTB ; Drosophiles infectés par MTB	Production des ROS cellulaires et mitochondriales ; inhibition dans la production de cytokines pro-inflammatoires. <b>Mécanismes</b> : Dépendant des ROS bactériennes ; Activation de la voie AMPK ; Régulation de la concentration de calcium intracellulaire
<b>INH, RIF, EMB</b> <sup>210</sup>	Lignée de macrophages murins infectée par MTB	Diminution de la production de TNF- $\alpha$ , d'IL-10, de la caspase-1 et de NO ; EMB induit un influx de calcium
<b>LEVO</b> <sup>211</sup>	PBMC humains stimulées par la phytohémagglutinine ou par du LPS	Inhibition de la production de GM-CSF et d'IL-12 dans les cellules stimulées; inhibition de la production d'IL-1 $\beta$ et de TNF- $\alpha$ dans les cellules stimulées par du LPS
<b>LEVO</b> <sup>212</sup>	Sérum de patients atteints d'une pneumonie	Diminution du taux de TNF- $\alpha$ et une augmentation d'IL-10
<b>Linézolide</b> <sup>213</sup>	Lignée de macrophages humains stimulés par du LPS	Régulation positive de l'expression de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 ; Régulation négative de l'expression de TLR1, TLR2, TLR6 ; Inhibition de l'activité phagocytaire
<b>MOX</b> <sup>214</sup>	PBMC humains stimulées par du LPS	Diminution du taux de TNF- $\alpha$ , IL-8, IL-1 et IL-6
<b>MOX</b> <sup>215</sup>	Lignée de macrophages humains et des PBMC stimulées par du LPS	Inhibition de la production des cytokines IL-8, TNF- $\alpha$ ; IL-1 $\beta$ ; Inhibition de NF- $\kappa$ B, ERK et JNK
<b>MOX</b> <sup>216</sup>	Macrophages péritonéaux de souris stimulés par du LPS	Inhibition de la production de TLR4, NF- $\kappa$ B, TNF- $\alpha$ et IL-6 (concentrations faibles de MOX) ; Effets pro-inflammatoires (concentrations fortes de MOX)
<b>PZA</b> <sup>217</sup>	PBMC humains infectées par MTB ; Souris infectés par MTB	Inhibition de la production de cytokines pro-inflammatoires (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, MCP-1). Régulation de l'expression des gènes impliqués dans la réponse inflammatoire et de la voie de signalisation TLR. <b>Mécanismes</b> : Par les voies PPAR et NF- $\kappa$ B (hypothèse)
<b>RIF</b> <sup>218</sup>	Macrophages péritonéaux de souris	Inhibition de la capacité phagocytaire ; Inhibe légèrement la production de TNF- $\alpha$ (fortes concentrations)
<b>RIF</b> <sup>219</sup>	Monocytes humains stimulés par du LPS	Inhibition de la sécrétion d'IL-1 $\beta$ et de TNF- $\alpha$ ; Augmentation de la production d'IL-6 et d'IL-10
<b>RIF</b> <sup>220</sup>	Monocytes humains	Inhibition du métabolisme oxydatif
<b>RIF</b> <sup>221</sup>	Lignée de macrophages de souris stimulée par du LPS	Inhibition de l'expression de TLR2 <b>Mécanisme</b> : Inhibition de l'activité NF- $\kappa$ B
<b>Système immunitaire adaptative</b>		
<b>Antibiotique(s)</b>	<b>Type(s) cellulaire(s)</b>	<b>Effets/ Mécanismes</b>
<b>INH</b> <sup>222</sup>	Souris infectées par MTB résistante à l'INH	Diminution du nombre de lymphocytes T CD4 <sup>+</sup> . <b>Mécanisme</b> : Apoptose
<b>RIF</b> <sup>223</sup>	Lignée de lymphocytes T humaines incubée avec du TNF- $\alpha$	Bloque l'activation de NF- $\kappa$ B
<b>RIF</b> <sup>224</sup>	Lignée de lymphocytes T humaines et une lignée cellulaire humaine du foie stimulées par du PMA	Activation du récepteur des glucocorticoïdes humains

**Tableau 3. Activité des anti-tuberculeux sur le système immunitaire.**

A ce jour, aucune étude a permis d'évaluer l'impact des anti-tuberculeux sur le microbiote pulmonaire. Des recherches devront être réalisées afin de découvrir si l'impact des anti-tuberculeux sur le microbiote pulmonaire joue un rôle dans l'immunité face à MTB.

## **2. Modulation de la réponse des cellules immunitaires par les anti-tuberculeux**

### **a. Impact sur l'immunité innée**

Certains anti-tuberculeux peuvent moduler la réponse des cellules de l'immunité innée, qu'ils soient de première ou de seconde intention, et leurs actions sont diverses (Tableau 3). La MOX, un anti-tuberculeux utilisé pour les cas de MDR-TB, module la réponse des monocytes. Ces cellules traitées et stimulées par l'ajout de lipopolysaccharides (LPS) durant 24 h régulent négativement l'expression des cytokines IL-1 $\beta$  et IL-6 et diminuent également la capacité phagocytaire<sup>225</sup>. Une autre étude corrobore ces résultats observés à partir de M $\phi$ s de souris<sup>216</sup>. Les M $\phi$ s incubés par du LPS et traités par la MOX montrent une diminution dans l'expression de la cytokine IL-6 mais également de TLR4, NF- $\kappa$ B et de TNF- $\alpha$ . L'ensemble de ces études soulignent le rôle de la MOX dans l'inhibition d'une réponse inflammatoire. Cependant, les antibiotiques peuvent aussi avoir des effets permettant de stimuler les défenses des cellules immunitaires innées. C'est le cas de l'INH et de la PZA qui vont pouvoir induire l'autophagie dans les M $\phi$ s murins infectés<sup>209</sup>. Les auteurs ont pu observer une production de ROS cellulaires et mitochondriaux induisant l'autophagie dans les M $\phi$ s infectés par MTB et traités par l'INH ou par la PZA.

Les mécanismes d'action des anti-tuberculeux sur les cellules restent globalement non compris. Pour seulement quelques antibiotiques, une partie du mécanisme d'action a pu être identifié ou suggéré. Dans l'étude précédemment décrite dans l'induction de l'autophagie par l'INH ou la PZA, Kim *et al.* ont pu montrer que cette réponse est dépendante de l'activation de la protéine kinase 5-adenosine monophosphate (AMPK). Cette protéine va être phosphorylée à la suite d'une libération de calcium dans le milieu cytoplasmique. Concernant la PZA, une seconde étude a suggéré d'autres voies d'activation expliquant la réduction dans

la production de cytokines pro-inflammatoires l'IL-1 $\beta$ , l'IL-6, le TNF- $\alpha$  et le MCP-1<sup>217</sup>. Par l'analyse du transcriptome des poumons de souris infectés par MTB puis traités par PZA, les auteurs ont suggéré que la modulation de la réponse est induite par des voies dépendantes de PPAR et de NF- $\kappa$ B.

### **b. Impact sur l'immunité adaptative**

L'immunité adaptative est également modulée par les anti-tuberculeux, cependant le nombre d'études est nettement moindre comparé à leur impact sur l'immunité innée (Tableau 3). Certains antibiotiques vont pouvoir moduler à la fois la réponse innée et la réponse adaptative. Des souris ont été infectées avec une souche de MTB résistante à l'INH puis traitées avec de l'INH<sup>222</sup>. Une diminution significative du nombre de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> activés est observée, dépendant d'un effet apoptotique. Ces résultats indiquent un rôle immunosuppresseur de l'INH.

L'augmentation du nombre cas de souches résistantes aux antibiotiques est un problème majeur de santé public. Au cours d'une antibiothérapie, il est communément admis que ces composés ont pour action de détruire ou de bloquer la croissance des pathogènes. La manière dont les antibiotiques ciblent les bactéries est bien décrite à travers les mécanismes de résistance acquises par ces bactéries. Malgré le rôle majeur du système immunitaire, les études de l'impact des antibiotiques sur l'hôte se concentrent principalement sur leur pharmacocinétique et leur pharmacodynamie en délaissant des études détaillées sur le système immunitaire.

**Afin d'évaluer l'interaction entre les anti-tuberculeux et l'hôte, nous nous sommes intéressés au rôle de la BDQ, un anti-tuberculeux récemment utilisé, sur la réponse immunitaire innée. Cette thèse a eu pour objectif de comprendre l'impact de la BDQ sur la réponse des M $\phi$ s humains infectés ou non par MTB.**

# RESULTATS

---

## I. INTRODUCTION

Avec l'émergence des souches résistantes, la découverte de nouveaux antibiotiques, tel que la BDQ, représente une option thérapeutique supplémentaire pour le traitement de la TB. La BDQ a été autorisée dans le traitement des souches MDR-TB par la « *United States Food and Drug Administration* » depuis Décembre 2012. Son autorisation fut accélérée avant la fin des phases cliniques dans un contexte de maladies graves. Puis en 2014, l'Agence Européenne des Médicaments a également autorisé son utilisation contre les MDR-TB.

Durant les essais cliniques de phase 2, la BDQ fut efficace contre MTB chez les patients infectés par une MDR-TB mais ce traitement était associé à des effets secondaires importants. L'un des essais cliniques de phase 2, réalisé à partir d'un panel de 160 patients atteints d'une MDR-TB<sup>226</sup>, a montré une conversion des cultures d'expectorations plus rapide dans le groupe BDQ que dans le groupe placebo de 42 jours confirmant ainsi son avantage thérapeutique. Au cours de ce traitement, des effets indésirables liés au traitement étaient majoritairement des nausées, des douleurs articulaires, des vomissements et un changement moyen dans l'intervalle QT (la durée entre dépolarisation des ventricules et leur repolarisation). Une augmentation de 15,4 ms dans le groupe BDQ a pu être rapportée, en comparaison à une augmentation de 3,3 ms dans le groupe placebo. Cependant, aucune dysrythmie n'a été signalée durant cet essai et à la fin du traitement, l'intervalle QT a progressivement diminué pour retrouver une valeur similaire au groupe placebo. Il a été rapporté que dix patients sont décédés dans le groupe BDQ comparé à 2 patients dans le groupe placebo. Cette prévalence dans le groupe BDQ n'a pas pu être expliqué, car aucun lien entre le décès et les concentrations plasmatiques de la BDQ ou des modifications de l'électrocardiogramme n'a pu être observé. L'essai suivant a évalué la BDQ sur une cohorte élargie de patients atteints d'une MDR-TB ou d'une XDR-TB et les résultats furent similaires<sup>227</sup>. Aujourd'hui, la BDQ est utilisée dans environ 70 pays<sup>1</sup>. L'ensemble des études publiées sur la BDQ ont pu souligner le taux de réussite important dans le traitement des souches MDR, avec relativement peu d'effets

secondaires sérieux (11,2%) comparé aux autres anti-tuberculeux de seconde intention<sup>228</sup>.

La BDQ appartient à la classe des diarylquinolines qui offre un nouveau mécanisme d'action contre le genre *Mycobacterium*<sup>229</sup>. La BDQ va inhiber spécifiquement l'ATP synthase mycobactérienne. Elle va se lier à la sous-unité c de l'ATP synthase et inhiber le métabolisme énergétique entraînant la mort de MTB. Le mécanisme de résistance à la BDQ a été étudié par la génération de mutant de MTB résistant à la BDQ. La proportion du taux de génération de mutants résistants était similaire à la RIF ( $10^{-7}$  à  $10^{-8}$ ) *in vitro* et leur susceptibilité vis-à-vis des autres anti-tuberculeux n'a pas changé. Lors du séquençage du génome de MTB et de *M. smegmatis*, des mutations ponctuelles ont pu être identifiées par une analyse comparative du génome de souches sensibles et résistantes à la BDQ. Les mutations D32V pour *M. smegmatis* et A63P pour MTB étaient présentes au niveau du gène *atpe*, codant la sous-unité c de l'ATP synthase. Cependant, environ 71% des cas de souches résistantes à la BDQ obtenues ne présentaient pas de mutation dans le gène *atpe* ou dans l'opéron des gènes codant la partie FO et F1 de l'ATP synthase, laissant suggérer d'autres mécanismes de résistance à la BDQ<sup>230</sup>. Une étude a pu identifier MmpS5-MmpL5, une pompe à efflux de MTB qui module la sensibilité à la BDQ<sup>231</sup>. Une régulation à la hausse de l'expression protéique de cette pompe à efflux permet d'augmenter la concentration minimale d'inhibition (CMI) de la BDQ de 2 à 16 fois. Une étude similaire a pu également identifier des mutations dans le gène codant une aminopeptidase spécifique des porine *pepQ* conférant une résistance modérée de plus de 4 fois la CMI de la BDQ<sup>232</sup>.

Chez l'homme, la BDQ est administrée par voie orale avec une concentration plasmatique maximale d'environ 5h après administration<sup>233</sup>. Elle possède également une longue demi-vie, d'environ 24h, et présente une forte liaison aux protéines (environ 99,9% de liaison aux protéines du sang). Malgré cela, la BDQ est largement distribuée dans les tissus, notamment dans les poumons de souris. La BDQ est métabolisée dans le foie par le cytochrome P450 (CYP3A4) en N-monodesméthyle, nommé M2, qui est environ 5 fois moins actif que la BDQ sur MTB mais contribue significativement à l'efficacité totale du traitement<sup>234</sup>.

*Élément sous droit, diffusion non autorisée*

**Figure 9. Imagerie MALDI-MS MS au cours du temps de la BDQ et du métabolite M2 chez les souris BALB/c après une dose orale de 25 mg/kg de BDQ.** Les lésions non nécrotiques sont entourées en blanc. Une section du poumon a été marquée par coloration à l'hématoxyline et à l'éosine (HE) pour comparaison (Résultats obtenus de SM. Irwin *et al.*, *ACS Infect Dis*, 2016).

*Élément sous droit, diffusion non autorisée*

**Figure 10. Imagerie MALDI-MS MS au cours du temps de la BDQ et du métabolite M2 chez les souris C3HeB/FeJ après une dose orale de 25 mg/kg de BDQ.** Les lésions nécrotiques caséux sont entourées en blanc. Une section du poumon a été marquée par coloration à l'hématoxyline et à l'éosine (HE) pour comparaison (Résultats obtenus de SM. Irwin *et al.*, *ACS Infect Dis*, 2016).

Une étude portée sur l'efficacité de la BDQ dans les lésions tuberculeux chez la souris a pu souligner une hétérogénéité dans sa localisation<sup>235</sup>. Il a été observé que la BDQ et son métabolite s'accumulent dans les lésions cellulaires non nécrosantes (Figure 9) et faiblement dans les granulomes nécrotiques caséux (Figure 10). Au cours de cette étude, les auteurs ont également souligné la capacité de la BDQ à s'accumuler dans les Mφs, avec un ratio supérieur à 35 entre le milieu intracellulaire et le milieu extracellulaire. A la suite du traitement incluant la BDQ, la moyenne de sa demi-vie de l'élimination chez les patients traités est approximativement de 164 jours après traitement<sup>236</sup>. Sa présence à long terme après l'arrêt du traitement pourrait augmenter le risque potentiel d'effets secondaires et l'émergence de souches résistantes<sup>237</sup>.

L'ensemble de ces études suggère de possibles interactions de la BDQ avec l'hôte. Le prolongement de l'intervalle QT, sa forte liaison aux protéines, sa longue-demie et son temps important pour son élimination sont des indices laissant supposer un effet de la BDQ sur les cellules de l'hôte. Un autre indice majeur est la cible de la BDQ sur MTB. Au cours de l'évolution, l'ATP synthase est conservée chez les procaryotes et les eucaryotes. On peut naturellement supposer que la BDQ pourrait également interagir avec l'ATP synthase des cellules hôte.

## II. RESUME DES RESULTATS

Afin d'étudier l'impact de la BDQ sur la réponse des Mφs dérivés de monocytes humains, il est important d'exclure un effet bactéricide de l'anti-tuberculeux sur MTB. Pour cela, nous avons utilisé une souche de MTB résistante à la BDQ (BDQr-MTB). Les Mφs infectés ont été traités ou non par la BDQ à 5 µg/mL, concentration détectée dans le plasma de patients traités, durant 18 h. L'étude du profil de l'expression des gènes des Mφs infectés et traités a permis d'identifier l'expression de 1 495 gènes différentiellement exprimés (FDR, « *false discovery rate* » <0,05%), dont 499 gènes étaient sur-exprimés et 996 gènes étaient sous-exprimés. L'analyse par ontologie des gènes sur-exprimés a pu montrer un enrichissement des gènes impliqués dans le métabolisme du glucose et des phospholipides, dans le lysosome et dans l'autophagie. Il est important de souligner que ces effets observés sont similaires dans les Mφs non infectés et traités par la BDQ, montrant que l'effet de la BDQ n'est pas dépendant de l'infection à MTB.

La régulation des voies métaboliques tient une place importante dans les fonctions immunitaires. La régulation de la glycolyse est associée à la polarisation des Mφs<sup>238</sup>. Nous avons pu observer une diminution du niveau basal de la glycolyse et de la capacité glycolytique dans les Mφs traités. De même que la glycolyse, le métabolisme des lipides affecte de nombreuses fonctions des Mφs, dont le trafic des endosomes ou encore la fusion phagosome-lysosome<sup>239,240</sup>. Nous avons observé une augmentation des phosphatidylinositols (PI) dans les Mφs traités par la BDQ.

L'analyse de l'enrichissement des gènes suggère un impact important de la BDQ sur les lysosomes. La sonde fluorescente LysoTracker a été utilisée afin de marquer les compartiments acides de la cellule. On observe une forte augmentation de l'intensité de fluorescence dans les Mφs infectés et traités par la BDQ à 18 h et 48 h post-traitement. Afin de confirmer l'augmentation de l'activité lysosomale, nous avons suivi l'activité protéolytique présente au sein des lysosomes par l'utilisation de la DQ-BSA. L'hydrolyse de la DQ-BSA par les hydrolases des lysosomes va permettre la libération de fragments de protéines contenant des fluorochromes et ainsi produire une fluorescence. Il a été observé, après 18 h et 48 h de

traitement par la BDQ, une augmentation de la fluorescence. Ces résultats témoignent de la formation de lysosomes compétent induit par la BDQ.

Dans le but de savoir si les effets observés étaient spécifiques de la BDQ, les cellules ont été traité par différents antibiotiques (amikacine, kanamycine, INH, RIF, EMB et PZA) durant 48 h puis incubé avec le LysoTracker. Uniquement la BDQ a permis d'augmenter l'intensité de fluorescence. L'activité de la BDQ sur les Mφs pourrait potentialiser l'efficacité d'autres antibiotiques, dont leur activité est liée à un pH acide. Suggérant une synergie entre la BDQ et la PZA dans des études *in vivo*, nous avons pu montrer que les effets induits par la BDQ dans les Mφs a permis de potentialiser l'activité de la PZA en diminuant la survie de BDQr-MTB.

Afin de savoir comment la BDQ induit la formation de lysosomes, nous nous sommes intéressés à la régulation de l'autophagie puisque la biogénèse des lysosomes peut être lié à cette voie<sup>241</sup>. Nous avons pu constater une augmentation de la formation d'autophagosomes à travers une augmentation de la protéine LC3B et une diminution de la protéine p62, signatures d'induction de l'autophagie. L'activation de cette voie par la BDQ a permis de tuer les BDQr-MTB intracellulaires.

L'autophagie participe aux défenses de l'hôte contre les pathogènes intracellulaires, dont MTB. Nous avons donc voulu savoir si la BDQ confère une protection contre les bactéries naturellement résistantes à la BDQ. Pour cela, les Mφs ont été pré-traités avec la BDQ puis infectés soit par une bactérie gram négatif, *Salmonella* serovar Typhimurium, soit par une bactérie gram positif, *Staphylococcus aureus*. Nous avons observé que les Mφs traités par la BDQ diminue la survie bactérienne pour ces deux espèces. Le contrôle de l'infection à *S. aureus* était due à une augmentation de la quantité de NO suggérant que la BDQ confère une résistance innée aux infections bactériennes à travers différents mécanismes.

A la suite de ces résultats, nous avons voulu comprendre le mécanisme permettant l'activation des Mφs par la BDQ. La BDQ étant la cible de l'ATP synthase mycobactérienne, nous nous sommes naturellement intéressés aux fonctions mitochondriales des Mφs traités. Aucun changement du potentiel de membrane des mitochondries, de la fonction respiratoire

des mitochondries ou de la formation de ROS mitochondriaux n'a pu être observé. D'après les premières études portées sur la BDQ, il a été suggéré que la BDQ puisse inhiber le canal hERG, un canal potassique dont son rôle est connu dans la modification de l'électrocardiogramme. Nous n'avons pas détecté l'ARN du gène *herg* au sein des Mφs. Puisque la BDQ induit la formation de lysosomes, nous avons émis l'hypothèse que la BDQ pourrait induire le facteur de transcription EB (TFEB), qui est reconnu comme un régulateur de l'autophagie et de la biogénèse de lysosomes<sup>242</sup>. Lorsque TFEB est sous sa forme inactive, elle est présente dans le cytoplasme. Lors de son activation, par des signaux dont la privation de nutriments, le stress lysosomal ou une infection bactérienne, TFEB va être activé et va se localiser dans le noyau afin d'induire l'expression des gènes. Nous avons pu observer, par immunofluorescence, l'activation de TFEB par sa translocation dans le noyau dans les Mφs traités par la BDQ. L'activation de TFEB est médiée par la calcineurine, une phosphatase sérine/thréonine dont son activité est liée à une libération de calcium intracellulaire<sup>243</sup>. En accord avec la littérature, nous avons observé une augmentation du calcium intracellulaire à la suite du traitement par la BDQ dans les Mφs. Lorsque les Mφs traités par la BDQ sont incubés avec un chélateur de calcium, l'activation de TFEB est inhibée. Ainsi ces résultats confirment que la BDQ entraîne l'activation de TFEB qui ce dernier est dépendant d'une accumulation de calcium intracellulaire dans les Mφs.

L'ensemble de ces résultats montrent que le traitement par la BDQ active les fonctions bactéricides des Mφs dont la production de NO, l'induction de l'autophagie et la biogénèse de lysosomes. Ces effets sont dépendants de l'activation du facteur de transcription TFEB. L'impact de la BDQ sur les Mφs entraîne une mortalité de MTB et confère une résistance innée contre des pathogènes naturellement résistantes à la BDQ.

### III. PUBLICATION

Cette étude fait l'objet d'une soumission d'article.

# 1 The antibiotic bedaquiline activates host macrophage 2 innate immune resistance to bacterial infection

3

4 Alexandre Giraud-Gatineau<sup>1,2</sup>, Juan Manuel Coya<sup>3,8</sup>, Alexandra Maure<sup>1,2,8</sup>, Anne Biton<sup>4,8</sup>,  
5 Michael Thomson<sup>5</sup>, Elliott M. Bernard<sup>6</sup>, Maximiliano G. Gutierrez<sup>6</sup>, Gérald Larrouy-Maumus<sup>5</sup>,  
6 Roland Brosch<sup>1,9</sup>, Brigitte Gicquel<sup>3,7,9</sup>, Ludovic Tailleux<sup>1,3,\*</sup>

7

8 <sup>1</sup>Unit for Integrated Mycobacterial Pathogenomics, Institut Pasteur, Paris, France. <sup>2</sup>Université Paris Diderot,  
9 Sorbonne Paris Cité, Cellule Pasteur, Paris, France. <sup>3</sup>Mycobacterial Genetics Unit, Institut Pasteur, Paris, France.

10 <sup>4</sup>Bioinformatics and Biostatistics, Department of Computational Biology, USR 3756 CNRS, Institut Pasteur, Paris,  
11 France. <sup>5</sup>MRC Centre for Molecular Bacteriology and Infection, Department of Life Sciences, Faculty of Natural  
12 Sciences, Imperial College London, London, SW7 2AZ, United Kingdom. <sup>6</sup>Host-Pathogen Interactions in  
13 Tuberculosis Laboratory, The Francis Crick Institute, 1 Midland Road, NW1 1AT London, United Kingdom.

14 <sup>7</sup>Department of Tuberculosis Control and Prevention, Shenzhen Nanshan Center for Chronic Disease Control,  
15 Shenzhen, China. <sup>8</sup>These authors contributed equally: Juan Manuel Coya, Alexandra Maure, Anne Biton. <sup>9</sup>These  
16 authors jointly supervised this work: Roland Brosch, Brigitte Gicquel. \*Correspondence: [ludovic.tailleux@pasteur.fr](mailto:ludovic.tailleux@pasteur.fr)

17

18

## 19 **Abstract**

20

21 Antibiotics are widely used in the treatment of bacterial infections. Although known for their microbicidal  
22 activity, antibiotics may also interfere with the host's immune system. Here we analyzed the effects of  
23 bedaquiline (BDQ), an inhibitor of the mycobacterial ATP synthase, on human macrophages. Genome-  
24 wide gene expression analysis revealed that BDQ reprogramed macrophages into potent bactericidal  
25 phagocytes. We found that 1,495 genes were differentially expressed in *M. tuberculosis*-infected  
26 macrophages incubated with the drug, with an over-representation of genes involved in metabolism,  
27 lysosome biogenesis and activation. BDQ treatment triggered a variety of antimicrobial defense  
28 mechanisms, including nitric oxide production, phagosome-lysosome fusion, and autophagy. These  
29 effects were associated with activation of transcription factor EB (TFEB), involved in the transcription of  
30 lysosomal genes, resulting in enhanced intracellular killing of different bacterial species that were  
31 naturally insensitive to BDQ. Thus, BDQ could be used as a host-directed therapy against a wide range  
32 of bacterial infections.

33

34

## 35 **Keywords**

36

37 Innate immunity, bacterial infection, bacteria, tuberculosis, antibiotic, bedaquiline, macrophage,  
38 lysosome, TFEB

39

40 **Main**

41

42 Antibiotics are commonly used in the treatment of bacterial infections, and, in effectively combating such  
43 diseases, have substantially increased human life expectancy. As with most drugs, antibiotic treatment  
44 can also alter host metabolism, including mitochondrial function (Kalghatgi et al., 2013), leading to  
45 adverse side-effects, including nausea, hepatotoxicity, skin reactions, and gastrointestinal and  
46 neurological disorders. Such side-effects can become critical when antibiotic treatment is long and  
47 involves several drugs, as in the treatment of tuberculosis (TB), where 2–28% of patients develop mild  
48 liver injury during treatment with first-line drugs (Agal et al., 2005).

49

50 Antibiotics can interfere with the immune system, indirectly through the disturbance of the body's  
51 microbiota (Lazar et al., 2018; Ubeda and Pamer, 2012), or directly by modulating the functions of  
52 immune cells. Such interactions may impact treatment efficacy or the susceptibility of the host to  
53 concomitant infection. For example, after treatment completion, TB patients are more vulnerable to  
54 reactivation and reinfection of the disease, suggesting therapy-related immune impairment (Cox et al.,  
55 2008). Drug-sensitive TB can be cured by combining up to 4 antibiotics in a 6-month treatment;  
56 specifically, isoniazid (INH), rifampicin (RIF), ethambutol and pyrazinamide (PZA) for 2 months, and INH  
57 and RIF for additional 4 months. INH induces apoptosis of activated CD4<sup>+</sup> T cells in *Mycobacterium*  
58 *tuberculosis* (MTB)-infected mice (Tousif et al., 2014) and leads to a decrease in Th1 cytokine  
59 production in household contacts with latent TB under preventive INH therapy (Biraro et al., 2015). RIF  
60 has immunomodulatory properties and acts as a mild immunosuppressive agent in psoriasis (Tsankov  
61 and Grozdev, 2011). RIF reduces inflammation by inhibiting IκBα degradation, mitogen-activated protein  
62 kinase (MAPK) phosphorylation (Bi et al., 2011), and Toll-like receptor 4 signaling (Wang et al., 2013).  
63 PZA treatment of MTB-infected human monocytes and mice significantly reduces the release of pro-  
64 inflammatory cytokines and chemokines (Manca et al., 2013). It is therefore necessary to understand  
65 how antibiotic treatment modulates macrophage (Mφ) functions, and more generally, how it impacts the  
66 host immune response.

67

68 The world-wide rise in antibiotic resistance is a major threat to global health care (de Kraker et al., 2016).  
69 A growing number of bacterial infections, such as pneumonia, salmonellosis, and TB, are becoming  
70 harder to treat as the antibiotics used to treat them become less effective. While new antibiotics are  
71 being developed and brought to the clinic, their effects on the human immune system are not being  
72 studied in-depth. Here, we have investigated the impact of a recently approved anti-TB drug, bedaquiline  
73 (BDQ), on the transcriptional responses of human Mφs infected with MTB. Mφs are the primary cell  
74 target of MTB, which has evolved several strategies to survive and multiply inside the Mφs phagosome,  
75 including prevention of phagosome acidification (Sturgill-Koszycki et al., 1994), inhibition of  
76 phagolysosomal fusion (Armstrong and Hart, 1975) and phagosomal rupture (Simeone et al., 2012; van  
77 der Wel et al., 2007). They play a central role in the host response to TB pathogenesis, by orchestrating  
78 the formation of granulomas, presenting mycobacterial antigens to T cells, and killing the bacillus upon  
79 IFN-γ activation (Cambier et al., 2014). BDQ is a diarylquinoline that specifically inhibits a subunit of the

80 bacterial adenosine triphosphate (ATP) synthase, decreasing intracellular ATP levels (Andries et al.,  
81 2005; Koul et al., 2007). It has 20,000 times less affinity for human ATP synthase (Haagsma et al.,  
82 2009). The most common side effects of BDQ are nausea, joint and chest pain, headache, and  
83 arrhythmias (Diacon et al., 2012; Diacon et al., 2014). However, possible interactions between BDQ and  
84 the host immune response have not been studied in detail. Understanding the impact of BDQ on the  
85 host immune response may help to develop strategies aiming at improving drug efficacy and limiting  
86 side-effects, including cytotoxicity, alteration of cell metabolism, and immunomodulation.

87

88

## 89 **Results**

90

### 91 **BDQ modulates the response of MTB-infected Mφs**

92 In order to exclude potential differences due to the MTB bacillary load between treated and untreated  
93 cells, we generated a virulent BDQ-resistant strain of *M. tuberculosis* (BDQr-MTB). The selected clone,  
94 which carried a Ala63→Pro mutation in subunit c of the ATP synthase (Andries et al., 2005; Huitric et  
95 al., 2010) (Supplementary Fig. 1a), had a similar generation time to wild-type bacteria when cultured in  
96 7H9 liquid medium (Supplementary Fig. 1b). We also observed no difference in intracellular growth of  
97 the mutated and wild-type strains (Supplementary Fig. 1c).

98

99

100 We infected human monocyte-derived Mφs from four healthy donors with BDQr-MTB. After 24 h of  
101 infection, cells were incubated for an additional 18 h with BDQ at 5 µg/mL, which corresponds to the  
102 concentration detected in the plasma of TB patients treated with BDQ (Andries et al., 2005; Perrineau  
103 et al., 2019). This concentration did not affect cell viability over an incubation period of 7 days  
104 (Supplementary Fig. 2). Following treatment, we characterized the genome-wide gene expression  
105 profiles of MTB-infected Mφs by RNAseq, with DMSO-treated infected cells serving as a control. The  
106 expression of 1,495 genes was affected by BDQ (FDR < 0.05, Fig. 1a and Supplementary Tables 1 and  
107 2), with 499 being up-regulated and 996 being down-regulated. We classified all 1,495 genes by  
108 performing gene-set enrichment analysis using ClueGO cluster analysis (Bindea et al., 2009). The gene  
109 set up-regulated by BDQ was significantly enriched for genes associated with glucose/phospholipid  
110 metabolism, the lysosome, and autophagy (Fig. 1b). We observed similar results with uninfected Mφs-  
111 treated with BDQ (Supplementary Fig. 3a-b, Supplementary Tables 3 and 4), indicating that the effect  
112 of BDQ is not dependent on MTB infection.

113

114 As metabolic pathways were over-represented in our RNAseq analysis, we investigated if glycolysis is  
115 affected by BDQ treatment using the Seahorse Extracellular Flux analyzer. This assay measures the  
116 rate of proton accumulation in the extracellular medium during glycolysis (glycoPER) and can  
117 discriminate between basal glycolysis, induced glycolytic capacity (by addition of rotenone/antimycin A  
118 (Rot/AA), an inhibitor of the mitochondrial electron transport chain), and non-glycolytic acidification (by  
119 addition of the glycolytic inhibitor 2-deoxy-D-glucose (2-DG)). After incubation with BDQ, we observed

120 a 30% decrease in basal glycolysis and glycolytic capacity compared to untreated cells (Fig. 1c-d and  
121 Supplementary Fig. 3c-d).

122

123 We assessed phospholipid metabolism, a pathway also identified in our ClueGO cluster analysis (Fig.  
124 1b). Like glycolysis, lipid metabolism affects macrophage phenotype and function (Remmerie and Scott,  
125 2018). We analyzed the lipid profile of BDQ-treated cells using MALDI-TOF mass spectrometry. We  
126 observed an increase of phosphatidylinositols upon incubation with BDQ (Fig. 1e and Supplementary  
127 Fig. 3e). No significant changes were observed in the levels of phosphatidylethanolamines,  
128 phosphatidylglycerols, or cardiolipins. Taken together, these data show that BDQ induced a significant  
129 metabolic reprogramming of both MTB-infected and resting M $\phi$ s.

130

### 131 **BDQ increases M $\phi$ lysosomal activity**

132 M $\phi$ s are involved in innate immunity and tissue homeostasis through their detection and elimination of  
133 microbes, debris, and dead cells, which occurs in lysosomes (Wynn et al., 2013). Lysosomes are acidic  
134 and hydrolytic organelles responsible for the digestion of macromolecules. Recent work has shown that  
135 they are also signaling platforms, which respond to nutrient and cellular stress (Lawrence and Zoncu,  
136 2019). Functional annotations based on the KEGG database of the 1,495 genes differentially expressed  
137 genes suggested a substantial impact of BDQ treatment on lysosome function (Fig. 1b). We identified  
138 54 differentially expressed genes, 78% of which were up-regulated, belonging to the lysosomal KEGG  
139 term (Fig. 2a). These genes are involved in lysosome biogenesis, transport and degradation of small  
140 molecules, and lysosomal acidification. They included genes coding for components of vacuolar ATPase  
141 (V-ATPase), hydrolases, and SLC11A1 (NRAMP1), a divalent transition metal transporter involved in  
142 host resistance to pathogens, including MTB (Meilang et al., 2012).

143

144 To validate our transcriptomic data, we incubated BDQ-treated, BDQr-MTB-infected cells with  
145 LysoTracker Red DND-99, a red fluorescent probe that labels acidic organelles, and analyzed them  
146 using flow cytometry. No differences were observed between control and treatment after 3 h of BDQ  
147 treatment (Fig. 2b). However, at 18 h and 48 h post-treatment, fluorescence intensity was substantially  
148 increased in M $\phi$ s incubated with BDQ compared to DMSO-treated cells (1.7 and 5.4 times more,  
149 respectively). These results were supported by confocal microscopy, which revealed the appearance of  
150 numerous acidic compartments upon treatment (Fig. 2c), up to 5 times more in BDQ-treated M $\phi$ s than  
151 untreated cells at 48 h post-treatment ( $p < 0.001$ , Fig. 2d). We also observed a large number of MTB  
152 phagosomes co-localized with LysoTracker-positive compartments (Fig. 2e).

153

154 As the expression of many genes coding for hydrolases was up-regulated upon BDQ treatment (Fig.  
155 2a), we tested the effect of the drug on late endosomal/lysosomal proteolytic activity. BDQ-treated M $\phi$ s  
156 were incubated with DQ-Green BSA, a self-quenched non-fluorescent probe that produces brightly  
157 fluorescent peptides following hydrolysis by lysosomal proteases. At 18 h and 48 h post-treatment, we  
158 observed a dose-dependent increase in fluorescence intensity upon treatment with BDQ (up to 5.5 times

159 more than untreated cells,  $p < 0.01$ , Fig. 2f). Together, these data demonstrate that BDQ induces  
160 biogenesis of competent lysosomes.

161

162 Several anti-TB drugs, including INH and PZA, are known to interfere with the degradation and recycling  
163 of cellular components (Kim et al., 2012). To test whether other antibiotics might have similar effects to  
164 BDQ, we treated cells with amikacin, ethambutol, kanamycin, isoniazid, pyrazinamide, and rifampicin  
165 for 48 h and then incubated with LysoTracker (Fig. 2g). Only BDQ induced an increase in lysosome  
166 staining.

167

168 The capacity of BDQ to induce acidic compartments may potentiate the efficacy of other drugs, whose  
169 activity is pH dependent. *In vivo* studies have suggested a synergistic interaction between BDQ and  
170 PZA (Ibrahim et al., 2007), and it is commonly assumed that a low pH is required for PZA activity against  
171 MTB (Zhang and Mitchison, 2003). We thus infected M $\phi$ s with BDQr-MTB and treated them with BDQ  
172 and PZA. After 7 days of treatment, cells were lysed and bacteria counted. PZA showed moderate  
173 bactericidal activity, with 50  $\mu$ g/mL PZA resulting in a 36% decrease in bacterial numbers compared to  
174 untreated cells (Fig. 2h). We confirmed that the combination of PZA with BDQ was highly bactericidal  
175 on MTB, leading to a 83% decrease in colony forming units using 50  $\mu$ g/mL PZA. This decrease was  
176 not a result of an additive effect between the two drugs, as BDQ alone had no antibacterial activity,  
177 given that we used a drug-resistant strain of MTB. Thus, the potentiation of PZA activity by BDQ is most  
178 likely due to the effect of BDQ on the host cell, and in particular on the increase of lysosomal acidification.

179

### 180 **BDQ induces autophagy activation in M $\phi$ s**

181 Given BDQ's effect on lysosomal acidification we asked whether it promoted lysosome formation.  
182 Lysosome biogenesis is linked to the endocytic and autophagic pathways. Autophagy delivers  
183 cytoplasmic material and organelles for lysosomal degradation (Yu et al., 2018) and is implicated in the  
184 immune response to microbes (Germic et al., 2019). We therefore tested three inhibitors of the  
185 autophagy pathway on BDQ activity: bafilomycin (BAF), which inhibits the V-ATPase; chloroquine (CQ),  
186 a lysomotropic agent which prevents endosomal acidification and impairs autophagosome fusion with  
187 lysosomes; and 3-methyladenine (3-MA) which blocks autophagosome formation by inhibiting of the  
188 type III phosphatidylinositol 3-kinases (PI-3K). We infected M $\phi$ s with BDQr-MTB and incubated the cells  
189 with BDQ in the presence or absence of the different inhibitors. After 2 days we analyzed LysoTracker  
190 staining as a read-out of lysosome activation using flow cytometry and observed that all three inhibitors  
191 prevented the increase in staining upon BDQ treatment (Fig. 3a).

192

193 Microtubule-associated protein light-chain 3B (LC3B) is involved in the formation of autophagosomes  
194 and autolysosomes. We observed an increase of LC3B puncta per cell at 18 h and 48 h post-BDQ  
195 treatment using confocal microscopy (Fig. 3b-c), which was associated with the detection of lipidated  
196 LC3 (LC3-II), the form of LC3 recruited to autophagosomal membranes, and with a decrease in  
197 sequestosome 1 (SQSTM1) or p62 levels (Fig. 3d-e). p62 is a ubiquitin-binding scaffold protein, which  
198 is degraded upon autophagy induction, and which is used as a marker of autophagic flux (Liu et al.,

199 2016). Given we have previously observed that some mycobacterial phagosomes colocalized with  
200 lysosomes in BDQ-treated cells (Fig. 2e), we tested whether BDQ promotes MTB killing, independently  
201 of its bactericidal activity on MTB by autophagy. BDQ significantly reduced the number of bacteria  
202 (measured by CFU) in cells infected with BDQ-resistant MTB. This effect was completely inhibited by  
203 the autophagy inhibitors 3-MA and BAF (Fig. 3f). Overall, these data show BDQ activates the autophagy  
204 pathway in human Mφs and this is involved in its anti-TB activity.

205

### 206 **BDQ activates Mφ bactericidal functions**

207 Autophagy plays numerous roles in innate immunity and in host defenses against intracellular  
208 pathogens, including MTB (Gutierrez et al., 2004). We thus asked if BDQ conferred protection to  
209 bacterial infections naturally resistant to BDQ. To test this hypothesis, we infected Mφs with two different  
210 bacterial species: a gram-positive bacterium, *Staphylococcus aureus* and a gram-negative bacterium,  
211 *Salmonella* Typhimurium. We confirmed that these two species are resistant to BDQ, even when  
212 exposed to high concentration of the drug (20 µg/mL, Fig. 4a). However, when the cells were incubated  
213 with BDQ and then infected with *S. aureus* and *S. Typhimurium* for 24 h, we observed a substantial  
214 decrease in bacterial survival rates (Fig. 4b).

215

216 To determine if autophagy is involved in this anti-bacterial activity we incubated the infected cells with  
217 the autophagy inhibitor, 3-MA, and were unable to revert the Mφs resistance to *S. aureus* infection upon  
218 BDQ treatment (Fig. 4c). Mφs are professional phagocytes, which have evolved a myriad of defense  
219 strategies to contain and eradicate bacteria, such as radical formation, phagosome maturation, and  
220 metal accumulation (Weiss and Schaible, 2015). Upon incubation with BDQ, we detected an increase  
221 in the amount of NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, a stable derivative of NO, in the culture supernatant of Mφs, (Fig. 4d). When the  
222 cells were treated with N(G)-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), an inhibitor of nitric oxide (NO)  
223 synthesis, *S. aureus*-infected cells were unable to effectively control infection upon incubation with BDQ  
224 (Fig. 4e). Thus, our results suggest that BDQ confers innate resistance to bacterial infection through  
225 different mechanisms.

226

### 227 **Mitochondrial functions are not affected by BDQ**

228 BDQ affects cardiac electrophysiology by prolonging the QT interval (Diacon et al., 2014) and it has  
229 been suggested that BDQ inhibits the cardiac potassium channel protein encoded by the human ether-  
230 a-go-go-related gene (hERG) (Therapeutics, 2012). Therefore, to further understand the molecular  
231 mechanisms underpinning Mφ activation by BDQ we determined if human monocyte-derived Mφs  
232 expressed hERG, but were unable to detect hERG RNA by RT-qPCR (Supplementary Fig. 4).

233

234 We investigated if BDQ might interfere with other activities of mitochondria. Conflicting reports suggest  
235 that BDQ inhibits the mitochondrial ATPase (Fiorillo et al., 2016; Haagsma et al., 2009). We have  
236 already shown that there were no significant differences in the amount of cardiolipin, an constituent of  
237 inner mitochondrial membranes, between BDQ-treated cells and control cells (Fig. 1e). We quantified  
238 changes in mitochondrial membrane potential using flow cytometry in cells incubated with BDQ or with

239 oligomycin, a positive control, which hyperpolarizes the mitochondrial membrane potential, and stained  
240 with TMRM. TMRM is a fluorescent cell-permeant dye that accumulates in active mitochondria with  
241 intact membrane potentials. No changes were observed when M $\phi$ s were incubated with the BDQ for 6  
242 h, 24 h and 48 h (Fig. 5a). We obtained similar results when mitochondria were stained with  
243 MitoTracker® Red FM whose accumulation in mitochondria is dependent upon membrane potential  
244 (Fig. 5b). We also measured the oxygen consumption rate (OCR), and detected no change in basal  
245 respiration, ATP-linked respiration, maximal respiration, and non-mitochondrial respiration in cells  
246 treated with BDQ for 24 h and 48 h as compared to untreated cells (Fig. 5c and Supplementary Fig. 5).

247

248 Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) are involved in the regulation of several physiological and  
249 pathological processes, including autophagy (Sena and Chandel, 2012). We thus stained for  
250 mitochondrial superoxide using the MitoSOX dye in BDQ-stimulated cells. Again, we saw no difference  
251 upon antibiotic treatment (Fig. 5d). Incubation with the antioxidant glutathione (GSH) or with its precursor  
252 N-Acetyl cysteine (NAC), which prevent the formation of mitochondrial ROS and reactive nitrogen  
253 species (RNS), did not prevent lysosome activation and the killing of *S. aureus* by BDQ (Fig. 5e). Based  
254 on these results, it is unlikely that BDQ alters mitochondrial function in human M $\phi$ s.

255

#### 256 **BDQ regulates lysosome activation through TFEB and calcium signaling**

257 Given that BDQ induced a lysosomal gene expression signature in M $\phi$ s, we wondered whether BDQ  
258 could activate the basic helix-loop-helix transcription factor EB (TFEB). TFEB is a master regulator of  
259 autophagy and lysosome biogenesis (Settembre et al., 2011). In resting cells, TFEB is largely cytosolic  
260 and inactive, but upon activation, it translocates into the nucleus and activates the transcription of many  
261 autophagy and lysosomal genes (Settembre et al., 2011). We therefore analyzed the cellular localization  
262 of TFEB, using confocal microscopy. At 18 h post-treatment, TFEB was mainly localized in the nucleus  
263 of BDQ-treated cells (Fig. 6a-b). The activity of TFEB is regulated by phosphorylation on specific amino  
264 acid residues, and its activation is mediated by calcineurin, an endogenous serine/threonine  
265 phosphatase, through Ca<sup>2+</sup> release from the lysosome (Medina et al., 2015). In agreement with these  
266 studies, we observed an increase in intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration in M $\phi$ s treated for 18 h with BDQ  
267 (Fig. 6c), and confirmed that this intracellular calcium accumulation was required for antibiotic-induced  
268 TFEB translocation to the nucleus and lysosomal gene expression. Upon treatment with BAPTA, a Ca<sup>2+</sup>  
269 chelator, TFEB remained localized in the cytoplasm of BDQ-treated cells (Fig. 6d), and we were unable  
270 to detect changes in the expression of a panel of lysosomal genes, previously identified as differentially  
271 expressed in M $\phi$ s incubated with BDQ (Fig. 6e). The increased bactericidal activity against *S. aureus*  
272 was also abrogated in the presence of BAPTA (Fig. 6f). Collectively, our data indicate that BDQ activates  
273 TFEB in M $\phi$ s and in this way modulates innate immune resistance to bacterial infection.

274

275

276

277

278

279 **Discussion**

280

281 The emergence of bacterial strains resistant to antibiotics requires the constant development of new  
282 antibiotics, which, beyond their bactericidal activity, may have a significant impact on cellular functions.  
283 Here, we have analyzed the effects of the new anti-TB drug BDQ on human Mφs. We found that in  
284 addition to its anti-bacterial activity, BDQ induces Mφ cell reprogramming, increasing Mφ bactericidal  
285 activity. Gene expression profiling revealed that 1,495 genes were differentially expressed in MTB-  
286 infected Mφs incubated with BDQ, with over-representation of genes involved in metabolism, lysosome  
287 biogenesis, and acidification. Recent work has highlighted the role of metabolic reprogramming in  
288 controlling immunological effector functions, emphasizing the close connection between cell function  
289 and metabolism (Van den Bossche et al., 2017; Wang et al., 2019). In agreement with these results, we  
290 observed a substantial increase in both the number of acidic compartments and proteolytic activity of  
291 Mφs upon BDQ treatment.

292

293 BDQ is a cationic amphiphilic drug, consisting of a hydrophobic ring structure and a hydrophilic side  
294 chain with a charged cationic amine group (Diacon et al., 2012). Cationic amphiphilic drugs can  
295 accumulate in lysosomes through ion trapping (de Duve et al., 1974). At neutral pH, they passively  
296 diffuse across cell and organelle membranes but when they enter the luminal space of acidic  
297 compartments such as lysosomes, the amine group ionizes and becomes membrane-impermeable  
298 (MacIntyre and Cutler, 1988). Such lysosomotropic compounds usually increase the lysosomal pH and  
299 thus decrease lysosomal enzyme activity (Kazmi et al., 2013). However, our results reveal instead that  
300 BDQ triggers lysosomal activation, up-regulating the expression of genes coding for hydrolases and for  
301 subunits of the lysosomal proton pump v-ATPase. Consistent with these observations, we observed that  
302 BDQ-treated cells significantly increase their ability to degrade DQ BSA.

303

304 Pre-clinical studies have shown that BDQ may induce phospholipidosis, potentially explaining some of  
305 the drug's observed toxicities (Diacon et al., 2012). Phospholipidosis, which is characterized by the  
306 accumulation of phospholipids in lysosomes, resulting in impaired lysosome function, is common upon  
307 treatment with cationic amphiphilic compounds (Shayman and Abe, 2013). Various phospholipid  
308 species have been described including sphingomyelin, phosphatidylcholine, phosphatidylethanolamine,  
309 phosphatidylserine, lysobisphosphatidic acid, and cholesterol (Reasor, 1984; Yamamoto et al., 1971a;  
310 Yamamoto et al., 1971b; Yoshikawa, 1991). In BDQ-treated Mφs, we only observed an increase in the  
311 amount of phosphatidylinositol and phosphatidylinositol-4-phosphate. The quantity of cardiolipin,  
312 phosphatidylethanolamine, and phosphatidylglycerol remained unchanged upon treatment. These  
313 observations do not indicate lysosomal dysfunction, but rather a targeted regulation of certain  
314 phospholipids by BDQ. In accordance with this idea, 28 genes involved in phospholipid metabolism  
315 were differentially expressed in BDQ-treated Mφs. Phosphatidylinositol phosphates regulate many  
316 cellular functions, including endosomal trafficking, endoplasmic reticulum (ER) export, autophagy, and  
317 phagosome-lysosome fusion (De Matteis et al., 2013; Levin et al., 2017). These phospholipids may thus  
318 be involved in the increase of autophagy and mycobacterial phagosome-lysosome fusion upon BDQ

319 treatment. Consistent with this hypothesis, recent work has shown that BDQ accumulates in host cell  
320 lipid droplets and is transferred to MTB as the droplets are consumed by the bacteria, enhancing MTB  
321 killing (Greenwood et al., 2019).

322

323 Lysosomes are both digestive organelles of the endocytic and autophagic pathways and signaling hubs  
324 involved in nutrient sensing, cell growth and differentiation, transcriptional regulation, and metabolic  
325 homeostasis (Lamming and Bar-Peled, 2019; Lawrence and Zoncu, 2019). In response to nutrients and  
326 growth factors, the mechanistic target of the rapamycin complex 1 (mTORC1) is recruited and activated  
327 at the lysosomal surface, where it promotes ribosomal biogenesis, translation, and biosynthesis of lipids  
328 (Lamming and Bar-Peled, 2019; Lawrence and Zoncu, 2019). mTORC1 binds to and phosphorylates  
329 TFEB, resulting in its cytosolic sequestration (Roczniak-Ferguson et al., 2012; Settembre et al., 2012).  
330 Upon starvation or lysosomal stress, mTORC1 is released from the lysosomal membrane and becomes  
331 inactive (Lamming and Bar-Peled, 2019; Lawrence and Zoncu, 2019). The release of lysosomal  $Ca^{2+}$   
332 activates the phosphatase calcineurin, which de-phosphorylates TFEB and promotes its nuclear  
333 translocation (Medina et al., 2015). TFEB then binds to CLEAR (coordinated lysosomal expression and  
334 regulation) elements within the promoters of genes involved in autophagy and lysosomal biogenesis  
335 and activates their expression (Lamming and Bar-Peled, 2019; Lawrence and Zoncu, 2019). We found  
336 that TFEB translocates from the cytoplasm to the nucleus in a calcium-dependent manner in BDQ-  
337 treated cells, with the concomitant up-regulation of 85 genes containing CLEAR elements 18 h after  
338 incubation with the drug.

339

340 A striking feature of BDQ-treated M $\phi$ s is their capacity to control pathogenic bacterial infection. BDQ  
341 enhances M $\phi$  innate defense mechanisms, including induction of anti-microbial effectors such as nitric  
342 oxide, phagosome-lysosome fusion, and autophagy. Other anti-TB drugs have been described to  
343 regulate autophagy. INH and PZA promote autophagy activation and phagosomal maturation in MTB-  
344 infected murine M $\phi$ s (Kim et al., 2012) and this process was suggested to be essential for  
345 antimycobacterial drug action and for dampening proinflammatory cytokines (Kim et al., 2012).  
346 However, a bactericidal effect of INH and PZA could not be excluded as a drug-sensitive MTB strain  
347 was used (Kim et al., 2012). In our system, we did not detect increased autophagy in cells treated with  
348 INH, which may also be due to differences in the autophagy response in murine and human M $\phi$ s.  
349 Altogether, we demonstrate that BDQ is able to boost the innate defenses of human cells.

350

351 A growing number of pathogenic bacteria are becoming resistant to antibiotics, making their use less  
352 effective. In addition to the development of “classical” drugs targeting key factors in bacterial physiology,  
353 host-directed therapy (HDT) has emerged as approach that could be used in adjunct with existing or  
354 future antibiotics (Machelart et al., 2017). Targeting the host to improve treatment has a number  
355 advantages. In particular, HDT is less prone to the development of resistance and it could be used to  
356 reduce disease severity and mortality. For example, metformin, an FDA-approved drug for type II  
357 diabetes, increases the production of mitochondrial reactive oxygen species and stimulates phagosome-  
358 lysosome fusion by activating the 5'-adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK)

359 (Singhal et al., 2014), and recent studies suggest that metformin provides better outcomes in TB  
360 patients, especially those with diabetes mellitus (Yew et al., 2019). Pathogens manipulate host-signaling  
361 pathways to subvert innate and adaptive immunity. It might thus be possible to reprogram the host  
362 immune system to better control or even kill bacteria. For instance, MTB has developed several  
363 strategies to counteract autophagy, including the product of the enhanced intracellular survival (*Eis*)  
364 gene, which limits ROS generation (Shin et al., 2010). Our results clearly show that BDQ can bypass  
365 these escape mechanisms and allow more effective control of bacterial infection. We also showed that  
366 BDQ potentiates the activity of other anti-TB drugs, independently of its bactericidal activity on MTB.  
367 Hence, our work opens new avenues for downstream evaluation of the potential use of BDQ as a potent  
368 drug in HDT.

369

370

## 371 **Methods**

372

### 373 **Ethics Statement**

374 Buffy coats were obtained from healthy donors after informed consent. The blood collection protocols  
375 were approved by both the French Ministry of Research and a French Ethics Committee. The blood  
376 collection was carried out in accordance with these approved protocols by the Etablissement Français  
377 du Sang (EFS).

378

### 379 **M $\phi$ , MTB and infection**

380 Blood mononuclear cells were isolated from buffy coats by Lymphocytes Separation Medium  
381 centrifugation (Eurobio). CD14<sup>+</sup> monocytes were isolated by positive selection using CD14 microbeads  
382 (Miltenyi Biotec) and were allowed to differentiate into M $\phi$ s in the presence of granulocyte macrophage  
383 colony-stimulating factor (GM-CSF, 20 ng/mL; Miltenyi Biotec) over a 6-day period. To exclude potential  
384 differences due to the MTB bacillary load between treated and untreated cells, M $\phi$ s were infected with  
385 BDQ-resistant MTB strain H37Rv (BDQr-MTB) expressing green-fluorescent protein (GFP). Briefly,  
386 exponentially growing MTB carrying the pEGFP plasmid (Tailleux et al., 2003) was plated during 4  
387 weeks on Middlebrook 7H11 agar supplemented with OADC (Becton Dickinson) and containing 0.3  
388  $\mu$ g/mL BDQ. Some clones were then selected. Resistance to BDQ was confirmed (i) by bacterial culture  
389 in Middlebrook 7H9 Broth (Becton Dickinson) supplemented with albumin-dextrose-catalase (ADC,  
390 Becton Dickinson) and 0.3  $\mu$ g/mL BDQ, and (ii) by confirming the mutation in the ATP synthase gene.  
391 The *atpE* gene was PCR-amplified using primers (forward: 5- TCGTGTTTCATCCTGATCTCCA-3;  
392 reverse: 5- GACAATCGCGCTCACTTAC-3) and the PCR products were sent to Eurofins for  
393 sequencing. All the selected mutants carried a mutation in the *atpE* gene as described previously  
394 (Andries et al., 2005; Huitric et al., 2010; Segala et al., 2012). Only mutant with similar growth rate (in  
395 liquid medium and in M $\phi$ s) as the wild type strain has been used for further experiments. Before  
396 infection, bacteria were washed and resuspended in 1 mL PBS. Clumps were disassociated by 50  
397 passages through a needle, and then allowed to sediment for 5 min. The density of bacteria in the  
398 supernatant was verified by measuring the OD600 and aliquot volumes defined to allow 0.5 bacterium-

399 per-cell infections. After 2 h of incubation at 37 °C, infected cells were thoroughly washed in RPMI 1640  
400 to remove extracellular bacteria and were incubated in fresh medium.

401

402

### 403 **RNA isolation, library preparation and sequencing**

404 Total RNA from Mφs was extracted using QIAzol lysis reagent (Qiagen) and purified over RNeasy  
405 columns (Qiagen). The quality of all samples was assessed with an Agilent 2100 bioanalyzer (Agilent  
406 Technologies) to verify RNA integrity. Only samples with good RNA yield and no RNA degradation (ratio  
407 of 28S to 18S, >1.7; RNA integrity number, >9) were used for further experiments. cDNA libraries were  
408 prepared with the Illumina TruSeq RNA Sample Preparation Kit v2 and were sequenced on an Illumina  
409 HiSeq 2500 at the CHU Sainte-Justine Integrated Centre for Pediatric Clinical Genomics (Montreal,  
410 Canada).

411 STAR v2.5.0b (Dobin et al., 2013) was used to map RNA-seq reads to the hg38 reference genome and  
412 quantify gene expression (option-quantMode GeneCounts) by counting the fragments overlapping the  
413 Ensembl genes (GRCh38 v. 83). Differential expression analysis was performed using a generalized  
414 linear model with the R Bioconductor package DESeq2 v1.18.1 (Love et al., 2014) on the 12,584 genes  
415 with at least one count-per-million (CPM) read in at least four samples. The model formula used in  
416 DESeq2 (~ Donor + Infection + Infection:Donor + Infection:Treatment + Donor:Treatment) contained:  
417 the main effects for Donor and Infection, interactions of Donor with Infection and Treatment to adjust for  
418 various responses to infection and treatment between donors, and a nested interaction of Infection with  
419 Treatment because we were interested in the infection-status-specific treatment effects. The latter was  
420 used to extract differentially expressed genes between treated and untreated samples under the  
421 infected and uninfected conditions. P-values were adjusted for multiple comparisons using the  
422 Benjamini-Hochberg method producing an adjusted P-value or false-discovery rate (FDR).

423 Gene ontology (GO) enrichment analyses were performed using the Cytoscape app ClueGO (version  
424 2.5.3) (Bindea et al., 2009). The following parameters were used: only pathways with  $pV \leq 0.01$ ,  
425 Minimum GO level = 3, Maximum GO level = 8, Min GO family > 1, minimum number of genes  
426 associated to GO term = 5, and minimum percentage of genes associated to GO term = 8. Enrichment  
427 p-values were calculated using a hypergeometric test (p-value < 0.05, Bonferroni corrected).

428

### 429 **Measurement of glycolysis**

430 Measurement of glycolysis was done using the Glycolytic rate assay kit (Seahorse, Agilent  
431 Technologies), following the manufacturer's protocol. Briefly, cells were seeded in Xe96 plates treated  
432 with BDQ for 24 h. The cells were then incubated in the assay medium (Seahorse XF Base Medium  
433 without phenol, 2mM glutamine, 10 mM glucose, 1 mM pyruvate and 5.0 mM HEPES) at 37°C, during  
434 1 h. Extracellular acidification rate (ECAR, milli pH/min) and oxygen consumption rate (OCR, pmol/min)  
435 were measured using the Seahorse Bioscience XFe96 Analyzer.

436

437

438

439 **Lipidomic**

440 Cells were treated with BDQ during 18 h and then lysed in water during 10 min at 37°C. Samples were  
441 heated at 90°C during 40 min in order to inactivate MTB, and were then washed three times to remove  
442 salts and contaminants that could preclude the analysis. Prior to mass spectrometry analysis, the 2,5-  
443 dihydroxybenzoic acid (Sigma-Aldrich) matrix was added at a final concentration of 10 mg/mL in a  
444 chloroform/methanol mixture at a 90:10 (v/v) ratio; 0.4 µL of a cell solution at a concentration of  $2 \times 10^5$   
445 to  $2 \times 10^6$  mL<sup>-1</sup>, corresponding to ~100–1000 cells per well of the MALDI target plate (384 Opti-TOF  
446 123 mm × 84 mm, AB Sciex), and 0.6 µL of the matrix solution were deposited on the MALDI target  
447 plate, mixed with a micropipette, and left to dry gently. MALDI-TOF MS analysis was performed on a  
448 4800 Proteomics Analyzer (with TOF-TOF Optics, Applied Biosystems) using the reflectron mode.  
449 Samples were analyzed operating at 20 kV in the negative and positive ion mode. Mass spectrometry  
450 data were analyzed using Data Explorer version 4.9 from Applied Biosystems.

451

452 **Staining and quantification of acidic compartments**

453 Cells were incubated with LysoTracker DND-99 (100 nM; Thermo Fisher) during 1 h at 37°C. Cells were  
454 then fixed with 4% paraformaldehyde at room temperature (RT) for 1 h. Fluorescence was analyzed  
455 using a CytoFLEX Flow Cytometer (Beckman Coulter). More than 10,000 events per sample were  
456 recorded. The analysis was performed using the FlowJo software.

457 LysoTracker staining was also analyzed using a Leica TCS SP5 Confocal System. Briefly, cells were  
458 washed twice with PBS after incubation with LysoTracker DND-99 (1 µM), fixed with 4%  
459 paraformaldehyde for 1 h at RT, stained with DAPI (1 µg/mL, Thermo Fisher) during 10 min mounted  
460 on a glass slide using Fluoromount mounting medium (Thermo Fisher). Quantification of LysoTracker  
461 staining was performed using Icy software.

462

463 **Quantification of lysosomal proteolytic activity**

464 Mφs were activated with heat-killed MTB and treated with BDQ during 18 h or 48 h. Cells were then  
465 incubated with DQ-Green BSA (10 µg/mL; Thermo Fisher) for 1 h at 37°C. The hydrolysis of the DQ-  
466 Green BSA by lysosomal proteases produces brightly fluorescent peptides. Cells were washed and  
467 incubated further in culture medium for 3 h to ensure that DQ BSA had reached the lysosomal  
468 compartment. Cells were detached and were fixed with 4% paraformaldehyde and the fluorescence was  
469 analyzed using a CytoFLEX Flow Cytometer (Beckman Coulter).

470

471 **Determination of bacterial counts**

472 Mφs were lysed in distilled water with 0.1% Triton X-100. MTB was enumerated as previously described  
473 (Tailleux et al., 2003) and plated on 7H11. CFUs were scored after three weeks at 37 °C. *S. aureus* and  
474 *S. Typhimurium* were plated on Luria-Bertani agar and CFUs were counted after 1 day at 37°C.

475

476 **Indirect Immunofluorescence**

477 Mφs ( $4 \times 10^5$  cells/mL) were grown on 12-mm circular coverslips in 24-well tissue culture plates for 24  
478 h in cell culture medium, followed by BDQ treatment. Cells were fixed with 4% paraformaldehyde for 1

479 h at RT, and were then incubated for 30 min in 1% BSA (Sigma-Aldrich) and 0.075% saponin (Sigma-  
480 Aldrich) in PBS, to block nonspecific binding and to permeabilize the cells. Cells were incubated with  
481 anti-LC3 (MBL) during 2 h at RT. Alternatively, cells were fixed with cold methanol for 5 min, and were  
482 then incubated for 10 min in PBS containing 0.5% saponin. Cells were stained with anti-TFEB (Thermo  
483 Fisher) overnight at 4°C. Cells were washed and incubated with Alexa Fluor 555 secondary antibody  
484 (Thermo Fisher) for 2 h. Nuclei were stained with DAPI (1 µg/mL) during 10 min. After labeling,  
485 coverslips were set in Fluoromount G medium containing 1 µg/ml 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)  
486 (SouthernBiotech) on microscope slides. Fluorescence was analyzed using Leica TCS SP5.  
487 Quantification of TFEB staining was performed using Icy software. LC3B puncta were analysed by  
488 confocal microscopy and quantified using ImageJ. Infected cells were manually segmented, thresholded  
489 and puncta counted using Analyze Particles. Dot plots represent the mean values of at least 83 cells  
490 from 2 donors. Error bars depict the SD.

491

#### 492 **Quantitative reverse transcription PCR (RT-qPCR)**

493 Reverse transcription of mRNA to cDNA was done using SuperScript III Reverse Transcriptase (Thermo  
494 Fisher) followed by amplification of cDNA using Power SYBR Green PCR Master Mix (Thermo Fisher).  
495 The following primers were used: *FABP5* (forward: 5-GGAAGGAGAGCACGATAACAAGA-3; reverse:  
496 5'-GGTGGCATTGTTTCATGACACA-3), *hERG* (forward: 5-GGGCTCCATCGAGATCCT-3; reverse: 5-  
497 AGGCCTTGCATACAGGTTCA-3), *RPL24* (forward: 5-CAAAGAAAAGAACCCGCCGA-3; reverse: 5-  
498 TCGAAACTGGGGAACCATGA-3), *SCARB1* (forward: 5-CTTGTTTCTCTCCCATCCTCA-3; reverse: 5-  
499 GAGTGTGCCTCCTGGTTAG-3), and *TRPM2* (forward: 5'-ACGTGCTCATGGTGGACTTC-3'; reverse:  
500 5'-AGGGTCATAGAAGAGCTGCC-3'). Reactions were performed using a StepOnePlus Real-Time  
501 PCR System Thermal Cycling block (Applied Biosystems). The relative gene expression levels were  
502 assessed according to the  $2^{-\Delta C_t}$  method (Pfaffl, 2001).

503

#### 504 **Western blot analysis**

505 Cells were lysed with RIPA buffer (Thermo Fisher) containing protease inhibitor cocktails (Roche) and  
506 stored at -80°C. Protein concentration was determined using the BCA protein assay kit (Thermo Fisher)  
507 according to the manufacturer instructions. 20 µg of total protein were loaded on a NUPAGE 4–12%  
508 Bis-Tris polyacrylamide gel (Thermo Fisher) and transferred to PVDF membranes (iBlot, Thermo  
509 Fisher). The membranes were blocked with TBS-0.1% Tween20, 5% non-fat dry milk for 30 min at RT  
510 and incubated overnight with primary antibodies against  $\alpha$ - $\beta$ -Tubulin, p-62 (Cell Signaling) and LC3  
511 (abcam). Membranes were washed in TBS-Tween and incubated with secondary HRP-conjugated  
512 antibody (GE Healthcare) at RT for 1 h. Membranes were washed and exposed to SuperSignal West  
513 Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo Fisher). Detection and quantification of band intensities  
514 was performed using Azure Imager C400 (Azure Biosystems) and ImageJ software (version 1.51).

515

#### 516 **Infection *S. aureus* & *S. Typhimurium***

517 *S. aureus* and *S. Typhimurium* were grown in Luria-Bertani broth. Bacteria were washed 3 times and  
518 resuspended in PBS. The density of bacteria was estimated by measuring the OD600. Cells were then

519 infected at a multiplicity of infection of 2:1. After 1 h of infection, cells were extensively washed and  
520 incubated for 1 h in culture medium supplemented with gentamicin (100 µg/mL). After washing, cells  
521 were cultured with different concentrations of BDQ and gentamicin (5 µg/mL).

522

### 523 **Measurement of nitric oxide**

524 NO was measured by Griess reaction assay (Promega) according to the manufacturer's instructions.  
525 Briefly cell culture supernatants were incubated with N-1-naphthylethylenediamine dihydrochloride during  
526 10 min followed by additional 10 min with N-1-naphthylethylenediamine dihydrochloride. The absorbance  
527 was measured at 520 nm.

528

### 529 **Mitochondrial membrane potential**

530 Cells were stained with Image-IT TMRM (10 nM, Thermo Fischer) during 30 min at 37°C or with  
531 MitoTracker Deep Red (100nM, Thermo Fisher) during 45 min at 37°C. Cells were washed in PBS and  
532 detached from culture plates with 0.05% Trypsin-EDTA. Fluorescence was analyzed using a CytoFLEX  
533 Flow Cytometer (Beckman Coulter).

534

### 535 **Measurement of oxygen consumption**

536 The oxygen consumption rate was measured using the XF Cell Mito Stress Test Kit (Seahorse  
537 bioscience) according to the manufacturer's protocol. Briefly, cells were seeded in Xe96 plates and  
538 treated with BDQ for 24h. The test was performed by adding oligomycin (1 µM), FCCP (1 µM), rotenone  
539 and antimycin (0.5 µM) at the indicated time points.

540

### 541 **Mitochondrial ROS assay**

542 Cells were incubated with MitoSOX Red (5 µM, Thermo Fisher) during 10 min at 37°C. Cells were  
543 washed in PBS and detached from culture plates with 0.05% Trypsin-EDTA. Fluorescence was  
544 analyzed using a CytoFLEX Flow Cytometer (Beckman Coulter).

545

### 546 **Calcium measurement assay**

547 Cells were treated with BDQ for 1 to 18 h, then labeled with Fluo-8 AM (4 µM, Abcam) during 1 h. Cells  
548 were washed twice with PBS and fluorescence was analyzed using FLUOstar Omega (BMG Labtech).

549

### 550 **Quantification and statistical analysis**

551 Data are expressed as means ± standard deviations (SD). Statistical analyses were performed with  
552 Prism software (GraphPad Software Inc.), using the *t* test and one-way analysis of variance (ANOVA)  
553 as indicated in the figure legends. A *p* value of <0.05 was considered to be significant.

554

### 555 **Data availability**

556 The raw fastq files have been deposited in NCBI's Gene Expression Omnibus (Edgar et al., 2002) and  
557 are accessible through GEO Series accession number GSE133145  
558 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE133145>, token: wnkrmgicqzajxyl).

559 **References**

- 560 Agal, S., Bajjal, R., Pramanik, S., Patel, N., Gupte, P., Kamani, P., and Amarapurkar, D. (2005). Monitoring and  
561 management of antituberculosis drug induced hepatotoxicity. *J Gastroenterol Hepatol.* 20(11), 1745-1752. DOI:  
562 10.1111/j.1440-1746.2005.04048.x.
- 563 Andries, K., Verhasselt, P., Guillemont, J., Gohlmann, H.W., Neefs, J.M., Winkler, H., Van Gestel, J., Timmerman,  
564 P., Zhu, M., Lee, E., et al. (2005). A diarylquinoline drug active on the ATP synthase of *Mycobacterium tuberculosis*.  
565 *Science.* 307(5707), 223-227. DOI: 10.1126/science.1106753.
- 566
- 567 Armstrong, J.A., and Hart, P.D. (1975). Phagosome-lysosome interactions in cultured macrophages infected with  
568 virulent tubercle bacilli. Reversal of the usual nonfusion pattern and observations on bacterial survival. *J Exp Med.*  
569 142(1), 1-16.
- 570
- 571 Bi, W., Zhu, L., Wang, C., Liang, Y., Liu, J., Shi, Q., and Tao, E. (2011). Rifampicin inhibits microglial inflammation  
572 and improves neuron survival against inflammation. *Brain Res.* 1395, 12-20. DOI: 10.1016/j.brainres.2011.04.019.
- 573
- 574 Bindea, G., Mlecnik, B., Hackl, H., Charoentong, P., Tosolini, M., Kirilovsky, A., Fridman, W.H., Pages, F.,  
575 Trajanoski, Z., and Galon, J. (2009). ClueGO: a Cytoscape plug-in to decipher functionally grouped gene ontology  
576 and pathway annotation networks. *Bioinformatics.* 25(8), 1091-1093. DOI: 10.1093/bioinformatics/btp101.
- 577
- 578 Biraro, I.A., Egesa, M., Kimuda, S., Smith, S.G., Toulza, F., Levin, J., Joloba, M., Katamba, A., Cose, S., Dockrell,  
579 H.M., et al. (2015). Effect of isoniazid preventive therapy on immune responses to *mycobacterium tuberculosis*: an  
580 open label randomised, controlled, exploratory study. *BMC Infect Dis.* 15, 438. DOI: 10.1186/s12879-015-1201-8.
- 581
- 582 Cambier, C.J., Falkow, S., and Ramakrishnan, L. (2014). Host evasion and exploitation schemes of *Mycobacterium*  
583 *tuberculosis*. *Cell.* 159(7), 1497-1509. DOI: 10.1016/j.cell.2014.11.024.
- 584
- 585 Chen, S.J., Hoffman, N.E., Shanmughapriya, S., Bao, L., Keefer, K., Conrad, K., Merali, S., Takahashi, Y.,  
586 Abraham, T., Hirschler-Laszkiewicz, I., et al. (2014). A splice variant of the human ion channel TRPM2 modulates  
587 neuroblastoma tumor growth through hypoxia-inducible factor (HIF)-1/2alpha. *J Biol Chem.* 289(52), 36284-36302.  
588 DOI: 10.1074/jbc.M114.620922.
- 589
- 590 Cox, H.S., Morrow, M., and Deutschmann, P.W. (2008). Long term efficacy of DOTS regimens for tuberculosis:  
591 systematic review. *BMJ.* 336(7642), 484-487. DOI: 10.1136/bmj.39463.640787.BE.
- 592
- 593 Coya, J.M., De Matteis, L., Giraud-Gatineau, A., Biton, A., Serrano-Sevilla, I., Danckaert, A., Dillies, M.A., Gicquel,  
594 B., De la Fuente, J.M., and Tailleux, L. (2019). Tri-mannose grafting of chitosan nanocarriers remodels the  
595 macrophage response to bacterial infection. *J Nanobiotechnology.* 17(1), 15. DOI: 10.1186/s12951-018-0439-x.
- 596
- 597 de Duve, C., de Barsey, T., Poole, B., Trouet, A., Tulkens, P., and Van Hoof, F. (1974). Commentary. Lysosomotropic  
598 agents. *Biochem Pharmacol.* 23(18), 2495-2531.
- 599
- 600 de Kraker, M.E., Stewardson, A.J., and Harbarth, S. (2016). Will 10 Million People Die a Year due to Antimicrobial  
601 Resistance by 2050? *PLoS Med.* 13(11), e1002184. DOI: 10.1371/journal.pmed.1002184.
- 602
- 603 De Matteis, M.A., Wilson, C., and D'Angelo, G. (2013). Phosphatidylinositol-4-phosphate: the Golgi and beyond.  
604 *Bioessays.* 35(7), 612-622. DOI: 10.1002/bies.201200180.
- 605
- 606 Diacon, A.H., Donald, P.R., Pym, A., Grobusch, M., Patientia, R.F., Mahanyele, R., Bantubani, N., Narasimooloo,  
607 R., De Marez, T., van Heeswijk, R., et al. (2012). Randomized pilot trial of eight weeks of bedaquiline (TMC207)  
608 treatment for multidrug-resistant tuberculosis: long-term outcome, tolerability, and effect on emergence of drug  
609 resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 56(6), 3271-3276. DOI: 10.1128/AAC.06126-11.
- 610
- 611 Diacon, A.H., Pym, A., Grobusch, M.P., de los Rios, J.M., Gotuzzo, E., Vasilyeva, I., Leimane, V., Andries, K.,  
612 Bakare, N., De Marez, T., et al. (2014). Multidrug-resistant tuberculosis and culture conversion with bedaquiline. *N*  
613 *Engl J Med.* 371(8), 723-732. DOI: 10.1056/NEJMoa1313865.
- 614
- 615 Dobin, A., Davis, C.A., Schlesinger, F., Drenkow, J., Zaleski, C., Jha, S., Batut, P., Chaisson, M., and Gingeras,  
616 T.R. (2013). STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics.* 29(1), 15-21. DOI:  
617 10.1093/bioinformatics/bts635.
- 618
- 619 Edgar, R., Domrachev, M., and Lash, A.E. (2002). Gene Expression Omnibus: NCBI gene expression and  
620 hybridization array data repository. *Nucleic Acids Res.* 30(1), 207-210. DOI: 10.1093/nar/30.1.207.
- 621
- 622 Fiorillo, M., Lamb, R., Tanowitz, H.B., Cappello, A.R., Martinez-Outschoorn, U.E., Sotgia, F., and Lisanti, M.P.  
623 (2016). Bedaquiline, an FDA-approved antibiotic, inhibits mitochondrial function and potently blocks the proliferative  
624 expansion of stem-like cancer cells (CSCs). *Aging (Albany NY).* 8(8), 1593-1607. DOI: 10.18632/aging.100983.

625 Germic, N., Frangez, Z., Yousefi, S., and Simon, H.U. (2019). Regulation of the innate immune system by  
626 autophagy: monocytes, macrophages, dendritic cells and antigen presentation. *Cell Death Differ.* 26(4), 715-727.  
627 DOI: 10.1038/s41418-019-0297-6.  
628

629 Goodarzynejad, H., Boroumand, M., Behmanesh, M., Ziaee, S., and Jalali, A. (2016). The rs5888 single nucleotide  
630 polymorphism in scavenger receptor class B type 1 (SCARB1) gene and the risk of premature coronary artery  
631 disease: a case-control study. *Lipids Health Dis.* 15, 7. DOI: 10.1186/s12944-016-0176-9.  
632

633 Greenwood, D.J., Dos Santos, M.S., Huang, S., Russell, M.R.G., Collinson, L.M., MacRae, J.I., West, A., Jiang, H.,  
634 and Gutierrez, M.G. (2019). Subcellular antibiotic visualization reveals a dynamic drug reservoir in infected  
635 macrophages. *Science.* 364(6447), 1279-1282. DOI: 10.1126/science.aat9689.  
636

637 Gutierrez, M.G., Master, S.S., Singh, S.B., Taylor, G.A., Colombo, M.I., and Deretic, V. (2004). Autophagy is a  
638 defense mechanism inhibiting BCG and *Mycobacterium tuberculosis* survival in infected macrophages. *Cell.* 119(6),  
639 753-766. DOI: 10.1016/j.cell.2004.11.038.  
640

641 Haagsma, A.C., Abdillahi-Ibrahim, R., Wagner, M.J., Krab, K., Vergauwen, K., Guillemont, J., Andries, K., Lill, H.,  
642 Koul, A., and Bald, D. (2009). Selectivity of TMC207 towards mycobacterial ATP synthase compared with that  
643 towards the eukaryotic homologue. *Antimicrob Agents Chemother.* 53(3), 1290-1292. DOI: 10.1128/AAC.01393-  
644 08.  
645

646 Hoekstra, M., Stitzinger, M., van Wanrooij, E.J., Michon, I.N., Kruijt, J.K., Kamphorst, J., Van Eck, M., Vreugdenhil,  
647 E., Van Berkel, T.J., and Kuiper, J. (2006). Microarray analysis indicates an important role for FABP5 and putative  
648 novel FABPs on a Western-type diet. *J Lipid Res.* 47(10), 2198-2207. DOI: 10.1194/jlr.M600095-JLR200.  
649

650 Huitric, E., Verhasselt, P., Koul, A., Andries, K., Hoffner, S., and Andersson, D.I. (2010). Rates and mechanisms of  
651 resistance development in *Mycobacterium tuberculosis* to a novel diarylquinoline ATP synthase inhibitor. *Antimicrob*  
652 *Agents Chemother.* 54(3), 1022-1028. DOI: 10.1128/AAC.01611-09.  
653

654 Ibrahim, M., Andries, K., Lounis, N., Chauffour, A., Truffot-Pernot, C., Jarlier, V., and Veziris, N. (2007). Synergistic  
655 activity of R207910 combined with pyrazinamide against murine tuberculosis. *Antimicrob Agents Chemother.* 51(3),  
656 1011-1015. DOI: 10.1128/AAC.00898-06.  
657

658 Iwai, C., Li, P., Kurata, Y., Hoshikawa, Y., Morikawa, K., Maharani, N., Higaki, K., Sasano, T., Notsu, T., Ishido, Y.,  
659 et al. (2013). Hsp90 prevents interaction between CHIP and HERG proteins to facilitate maturation of wild-type and  
660 mutant HERG proteins. *Cardiovasc Res.* 100(3), 520-528. DOI: 10.1093/cvr/cvt200.  
661

662 Kalghatgi, S., Spina, C.S., Costello, J.C., Liesa, M., Morones-Ramirez, J.R., Slomovic, S., Molina, A., Shirihai, O.S.,  
663 and Collins, J.J. (2013). Bactericidal antibiotics induce mitochondrial dysfunction and oxidative damage in  
664 Mammalian cells. *Sci Transl Med.* 5(192), 192ra185. DOI: 10.1126/scitranslmed.3006055.  
665

666 Kazmi, F., Hensley, T., Pope, C., Funk, R.S., Loewen, G.J., Buckley, D.B., and Parkinson, A. (2013). Lysosomal  
667 sequestration (trapping) of lipophilic amine (cationic amphiphilic) drugs in immortalized human hepatocytes (Fa2N-  
668 4 cells). *Drug Metab Dispos.* 41(4), 897-905. DOI: 10.1124/dmd.112.050054.  
669

670 Kim, J.J., Lee, H.M., Shin, D.M., Kim, W., Yuk, J.M., Jin, H.S., Lee, S.H., Cha, G.H., Kim, J.M., Lee, Z.W., et al.  
671 (2012). Host cell autophagy activated by antibiotics is required for their effective antimycobacterial drug action. *Cell*  
672 *Host Microbe.* 11(5), 457-468. DOI: 10.1016/j.chom.2012.03.008.  
673

674 Koul, A., Dendouga, N., Vergauwen, K., Molenberghs, B., Vranckx, L., Willebrords, R., Ristic, Z., Lill, H., Dorange,  
675 I., Guillemont, J., et al. (2007). Diarylquinolines target subunit c of mycobacterial ATP synthase. *Nat Chem Biol.*  
676 3(6), 323-324. DOI: 10.1038/nchembio884.  
677

678 Lamming, D.W., and Bar-Peled, L. (2019). Lysosome: The metabolic signaling hub. *Traffic.* 20(1), 27-38. DOI:  
679 10.1111/tra.12617.  
680

681 Lawrence, R.E., and Zoncu, R. (2019). The lysosome as a cellular centre for signalling, metabolism and quality  
682 control. *Nat Cell Biol.* 21(2), 133-142. DOI: 10.1038/s41556-018-0244-7.  
683

684 Lazar, V., Ditu, L.M., Pircalabioru, G.G., Gheorghe, I., Curutiu, C., Holban, A.M., Picu, A., Petcu, L., and Chifiriuc,  
685 M.C. (2018). Aspects of Gut Microbiota and Immune System Interactions in Infectious Diseases, Immunopathology,  
686 and Cancer. *Front Immunol.* 9, 1830. DOI: 10.3389/fimmu.2018.01830.  
687

688 Levin, R., Hammond, G.R., Balla, T., De Camilli, P., Fairn, G.D., and Grinstein, S. (2017). Multiphasic dynamics of  
689 phosphatidylinositol 4-phosphate during phagocytosis. *Mol Biol Cell.* 28(1), 128-140. DOI: 10.1091/mbc.E16-06-  
690 0451.

691 Liu, W.J., Ye, L., Huang, W.F., Guo, L.J., Xu, Z.G., Wu, H.L., Yang, C., and Liu, H.F. (2016). p62 links the autophagy  
692 pathway and the ubiquitin-proteasome system upon ubiquitinated protein degradation. *Cell Mol Biol Lett.* 21, 29.  
693 DOI: 10.1186/s11658-016-0031-z.  
694

695 Love, M.I., Huber, W., and Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq  
696 data with DESeq2. *Genome Biol.* 15(12), 550. DOI: 10.1186/s13059-014-0550-8.  
697

698 Machelart, A., Song, O.R., Hoffmann, E., and Brodin, P. (2017). Host-directed therapies offer novel opportunities  
699 for the fight against tuberculosis. *Drug Discov Today.* 22(8), 1250-1257. DOI: 10.1016/j.drudis.2017.05.005.  
700

701 MacIntyre, A.C., and Cutler, D.J. (1988). Role of lysosomes in hepatic accumulation of chloroquine. *J Pharm Sci.*  
702 77(3), 196-199.  
703

704 Manca, C., Koo, M.S., Peixoto, B., Fallows, D., Kaplan, G., and Subbian, S. (2013). Host targeted activity of  
705 pyrazinamide in *Mycobacterium tuberculosis* infection. *PLoS One.* 8(8), e74082. DOI:  
706 10.1371/journal.pone.0074082.  
707

708 Medina, D.L., Di Paola, S., Peluso, I., Armani, A., De Stefani, D., Venditti, R., Montefusco, S., Scotto-Rosato, A.,  
709 Prezioso, C., Forrester, A., et al. (2015). Lysosomal calcium signalling regulates autophagy through calcineurin and  
710 TFEB. *Nat Cell Biol.* 17(3), 288-299. DOI: 10.1038/ncb3114.  
711

712 Meilang, Q., Zhang, Y., Zhang, J., Zhao, Y., Tian, C., Huang, J., and Fan, H. (2012). Polymorphisms in the SLC11A1  
713 gene and tuberculosis risk: a meta-analysis update. *Int J Tuberc Lung Dis.* 16(4), 437-446. DOI:  
714 10.5588/ijtld.10.0743.  
715

716 Perrineau, S., Lachatre, M., Le, M.P., Rioux, C., Loubet, P., Frechet-Jachym, M., Gonzales, M.C., Grall, N., Bouvet,  
717 E., Veziris, N., et al. (2019). Long-term plasma pharmacokinetics of bedaquiline for multidrug- and extensively drug-  
718 resistant tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis.* 23(1), 99-104. DOI: 10.5588/ijtld.18.0042.  
719

720 Pfaffl, M.W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.*  
721 29(9), e45. DOI: 10.1093/nar/29.9.e45.  
722

723 Reasor, M.J. (1984). Phospholipidosis in the alveolar macrophage induced by cationic amphiphilic drugs. *Fed Proc.*  
724 43(11), 2578-2581.  
725

726 Remmerie, A., and Scott, C.L. (2018). Macrophages and lipid metabolism. *Cell Immunol.* 330, 27-42. DOI:  
727 10.1016/j.cellimm.2018.01.020.  
728

729 Roczniak-Ferguson, A., Petit, C.S., Froehlich, F., Qian, S., Ky, J., Angarola, B., Walther, T.C., and Ferguson, S.M.  
730 (2012). The transcription factor TFEB links mTORC1 signaling to transcriptional control of lysosome homeostasis.  
731 *Sci Signal.* 5(228), ra42. DOI: 10.1126/scisignal.2002790.  
732

733 Segala, E., Sougakoff, W., Nevejans-Chauffour, A., Jarlier, V., and Petrella, S. (2012). New mutations in the  
734 mycobacterial ATP synthase: new insights into the binding of the diarylquinoline TMC207 to the ATP synthase C-  
735 ring structure. *Antimicrob Agents Chemother.* 56(5), 2326-2334. DOI: 10.1128/AAC.06154-11.  
736

737 Sena, L.A., and Chandel, N.S. (2012). Physiological roles of mitochondrial reactive oxygen species. *Mol Cell.* 48(2),  
738 158-167. DOI: 10.1016/j.molcel.2012.09.025.  
739

739 Settembre, C., Di Malta, C., Polito, V.A., Garcia Arencibia, M., Vetrini, F., Erdin, S., Erdin, S.U., Huynh, T., Medina,  
740 D., Colella, P., et al. (2011). TFEB links autophagy to lysosomal biogenesis. *Science.* 332(6036), 1429-1433. DOI:  
741 10.1126/science.1204592.  
742

743 Settembre, C., Zoncu, R., Medina, D.L., Vetrini, F., Erdin, S., Erdin, S., Huynh, T., Ferron, M., Karsenty, G., Vellard,  
744 M.C., et al. (2012). A lysosome-to-nucleus signalling mechanism senses and regulates the lysosome via mTOR  
745 and TFEB. *EMBO J.* 31(5), 1095-1108. DOI: 10.1038/emboj.2012.32.  
746

747 Shayman, J.A., and Abe, A. (2013). Drug induced phospholipidosis: an acquired lysosomal storage disorder.  
748 *Biochim Biophys Acta.* 1831(3), 602-611. DOI: 10.1016/j.bbali.2012.08.013.  
749

750 Shin, D.M., Jeon, B.Y., Lee, H.M., Jin, H.S., Yuk, J.M., Song, C.H., Lee, S.H., Lee, Z.W., Cho, S.N., Kim, J.M., et  
751 al. (2010). *Mycobacterium tuberculosis* eis regulates autophagy, inflammation, and cell death through redox-  
752 dependent signaling. *PLoS Pathog.* 6(12), e1001230. DOI: 10.1371/journal.ppat.1001230.  
753

754 Siddle, K.J., Tailleux, L., Deschamps, M., Loh, Y.H., Deluen, C., Gicquel, B., Antoniewski, C., Barreiro, L.B.,  
755 Farinelli, L., and Quintana-Murci, L. (2015). bacterial infection drives the expression dynamics of microRNAs and  
756 their isomiRs. *PLoS Genet.* 11(3), e1005064. DOI: 10.1371/journal.pgen.1005064.  
757

758 Simeone, R., Bobard, A., Lippmann, J., Bitter, W., Majlessi, L., Brosch, R., and Enninga, J. (2012). Phagosomal  
759 rupture by *Mycobacterium tuberculosis* results in toxicity and host cell death. *PLoS Pathog.* 8(2), e1002507. DOI:  
760 10.1371/journal.ppat.1002507.  
761  
762 Singhal, A., Jie, L., Kumar, P., Hong, G.S., Leow, M.K., Paleja, B., Tsenova, L., Kurepina, N., Chen, J., Zolezzi, F.,  
763 et al. (2014). Metformin as adjunct antituberculosis therapy. *Sci Transl Med.* 6(263), 263ra159. DOI:  
764 10.1126/scitranslmed.3009885.  
765  
766 Sturgill-Koszycki, S., Schlesinger, P.H., Chakraborty, P., Haddix, P.L., Collins, H.L., Fok, A.K., Allen, R.D., Gluck,  
767 S.L., Heuser, J., and Russell, D.G. (1994). Lack of acidification in *Mycobacterium* phagosomes produced by  
768 exclusion of the vesicular proton-ATPase. *Science.* 263(5147), 678-681.  
769  
770 Tailleux, L., Neyrolles, O., Honore-Bouakline, S., Perret, E., Sanchez, F., Abastado, J.P., Lagrange, P.H.,  
771 Gluckman, J.C., Rosenzweig, M., and Herrmann, J.L. (2003). Constrained intracellular survival of *Mycobacterium*  
772 *tuberculosis* in human dendritic cells. *J Immunol.* 170(4), 1939-1948. DOI: 10.4049/jimmunol.170.4.1939.  
773  
774 Therapeutics, J. (2012). Sirturo (bedaquiline). US Food and Drug Administration, center for drug evaluation and  
775 research( [https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/nda/2012/204384Orig2s204381s204000PharmR.pdf](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2012/204384Orig2s204381s204000PharmR.pdf))  
776  
777 Tousif, S., Singh, D.K., Ahmad, S., Moodley, P., Bhattacharyya, M., Van Kaer, L., and Das, G. (2014). Isoniazid  
778 induces apoptosis of activated CD4+ T cells: implications for post-therapy tuberculosis reactivation and reinfection.  
779 *J Biol Chem.* 289(44), 30190-30195. DOI: 10.1074/jbc.C114.598946.  
780  
781 Tsankov, N., and Grozdev, I. (2011). Rifampicin--a mild immunosuppressive agent for psoriasis. *J Dermatolog*  
782 *Treat.* 22(2), 62-64. DOI: 10.3109/09546630903496975.  
783  
784 Ubeda, C., and Pamer, E.G. (2012). Antibiotics, microbiota, and immune defense. *Trends Immunol.* 33(9), 459-  
785 466. DOI: 10.1016/j.it.2012.05.003.  
786  
787 Van den Bossche, J., O'Neill, L.A., and Menon, D. (2017). Macrophage Immunometabolism: Where Are We  
788 (Going)? *Trends Immunol.* 38(6), 395-406. DOI: 10.1016/j.it.2017.03.001.  
789  
790 van der Wel, N., Hava, D., Houben, D., Fluitsma, D., van Zon, M., Pierson, J., Brenner, M., and Peters, P.J. (2007).  
791 *M. tuberculosis* and *M. leprae* translocate from the phagolysosome to the cytosol in myeloid cells. *Cell.* 129(7),  
792 1287-1298. DOI: 10.1016/j.cell.2007.05.059.  
793  
794 Wang, A., Luan, H.H., and Medzhitov, R. (2019). An evolutionary perspective on immunometabolism. *Science.*  
795 363(6423). DOI: 10.1126/science.aar3932.  
796  
797 Wang, X., Grace, P.M., Pham, M.N., Cheng, K., Strand, K.A., Smith, C., Li, J., Watkins, L.R., and Yin, H. (2013).  
798 Rifampin inhibits Toll-like receptor 4 signaling by targeting myeloid differentiation protein 2 and attenuates  
799 neuropathic pain. *FASEB J.* 27(7), 2713-2722. DOI: 10.1096/fj.12-222992.  
800  
801 Weiss, G., and Schaible, U.E. (2015). Macrophage defense mechanisms against intracellular bacteria. *Immunol*  
802 *Rev.* 264(1), 182-203. DOI: 10.1111/imr.12266.  
803  
804 Wynn, T.A., Chawla, A., and Pollard, J.W. (2013). Macrophage biology in development, homeostasis and disease.  
805 *Nature.* 496(7446), 445-455. DOI: 10.1038/nature12034.  
806  
807 Yamamoto, A., Adachi, S., Ishikawa, K., Yokomura, T., and Kitani, T. (1971a). Studies on drug-induced lipidosis.  
808 3. Lipid composition of the liver and some other tissues in clinical cases of "Niemann-Pick-like syndrome" induced  
809 by 4,4'-diethylaminoethoxyhexestrol. *J Biochem.* 70(5), 775-784. DOI: 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a129695.  
810  
811 Yamamoto, A., Adachi, S., Kitani, T., Shinji, Y., and Seki, K. (1971b). Drug-induced lipidosis in human cases and  
812 in animal experiments. Accumulation of an acidic glycerophospholipid. *J Biochem.* 69(3), 613-615.  
813  
814 Yew, W.W., Chang, K.C., Chan, D.P., and Zhang, Y. (2019). Metformin as a host-directed therapeutic in  
815 tuberculosis: Is there a promise? *Tuberculosis (Edinb).* 115, 76-80. DOI: 10.1016/j.tube.2019.02.004.  
816  
817 Yoshikawa, H. (1991). Effects of drugs on cholesterol esterification in normal and Niemann-Pick type C fibroblasts:  
818 AY-9944, other cationic amphiphilic drugs and DMSO. *Brain Dev.* 13(2), 115-120.  
819  
820 Yu, L., Chen, Y., and Tooze, S.A. (2018). Autophagy pathway: Cellular and molecular mechanisms. *Autophagy.*  
821 14(2), 207-215. DOI: 10.1080/15548627.2017.1378838.  
822  
823 Zhang, Y., and Mitchison, D. (2003). The curious characteristics of pyrazinamide: a review. *Int J Tuberc Lung Dis.*  
824 7(1), 6-21.

825 **Acknowledgments**

826  
827 We thank Olivier Neyrolles for reading the manuscript and helpful discussion. We gratefully  
828 acknowledge the UTechS Cytometry and Biomarkers and the UTechS Photonic BioImaging (Imagopole)  
829 Citech of Institut Pasteur (Paris, France) as well as the France–BioImaging infrastructure network  
830 supported by the French National Research Agency (ANR-10–INSB–04; Investments for the Future) for  
831 support in conducting this study, in particular P.H. Commere for help with flow cytometry. We also thank  
832 Charles Privé (CHU Sainte-Justine Integrated Centre for Pediatric Clinical Genomics, Montreal,  
833 Canada) for their technical support. This research project was co-financed by Institut Pasteur and the  
834 European Commission, as part of the European Seventh Framework Program Nanotherapeutics against  
835 Resistant Emerging Bacterial Pathogens (NAREB Project 604237). The text represents the authors’  
836 views and does not necessarily represent the position of the Commission who are not liable for the  
837 publication of this information. The funders had no role in the study design, data collection or analysis,  
838 the decision to publish, or the preparation of the manuscript. GLM was supported by an EPSRC-  
839 EMBRACE pump-priming award (EP/M027007/1). This work was supported by the Francis Crick  
840 Institute (to MGG), which receives its core funding from Cancer Research UK (FC001092), the UK  
841 Medical Research Council (FC001092), and the Wellcome Trust (FC001092).

842  
843 **Author contributions**

844  
845 Conceptualization, A.G.G and L.T.; Methodology, A.G.G and L.T.; Formal analysis, A.G.G., A.B. and  
846 E.M.B.; Investigation, A.G.G., J.M.C., A.M., M.T. and G.L.M.; Writing – Original Draft, A.G.G. and L.T.;  
847 Writing – Review & Editing, A.G.G. and L.T.; Visualization, A.G.G. and L.T.; Supervision, M.G.G., R.B.,  
848 B.G. and L.T.; Funding Acquisition, M.G.G., G.L.M., R.B. and B.G.

849  
850 **Competing interests**

851  
852 The authors declare no competing interests.

853  
854 **Correspondence and requests for materials**

855  
856 Further information and requests for resources and reagents should be directed to and will be fulfilled  
857 by the Lead Contact, Dr. Ludovic Tailleux (ludovic.tailleux@pasteur.fr)

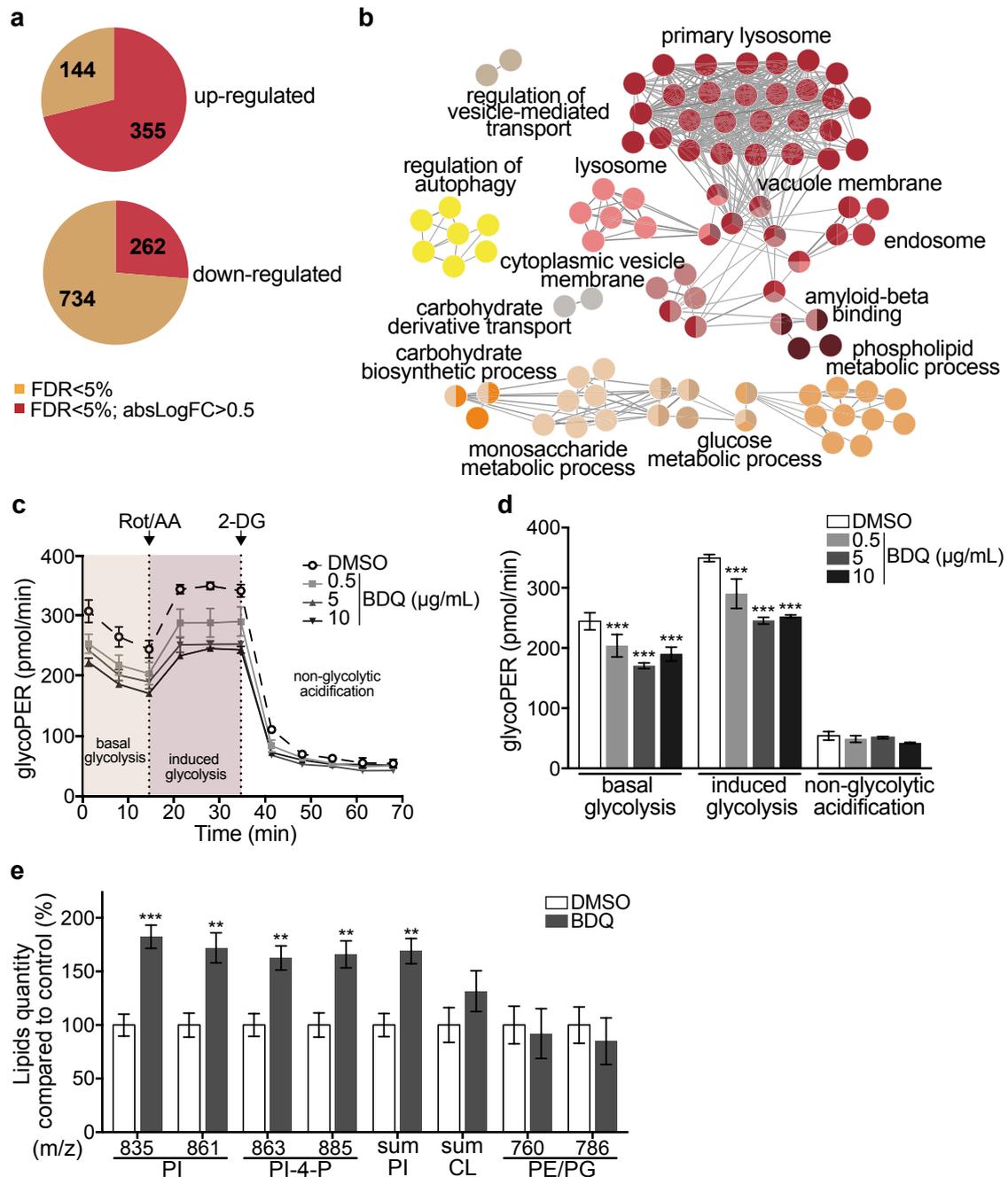
858  
859  
860 **Figures legends**

861  
862 **Figure 1** | BDQ modulates the response of MTB-infected Mφs.  
863 **Figure 2** | BDQ activates the lysosomal pathway in human MTB-infected Mφs  
864 **Figure 3** | BDQ induced autophagy in MTB-infected Mφs.  
865 **Figure 4** | BDQ increases Mφs bactericidal functions.  
866 **Figure 5** | BDQ does not affect mitochondrial functions.  
867 **Figure 6** | Calcium-dependent activation of TFEB by BDQ.

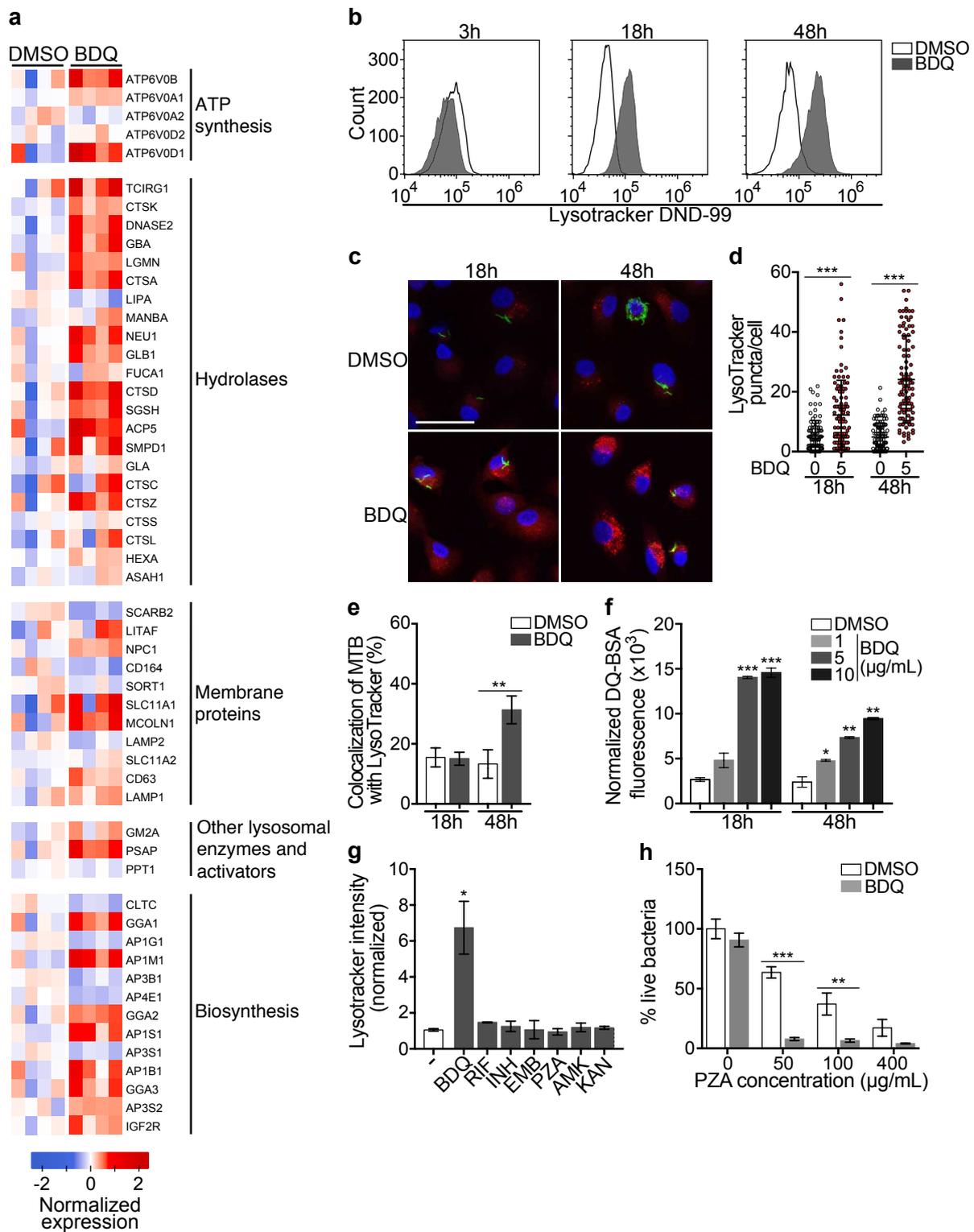
868  
869  
870 **Supplementary information**

871  
872 **Supplementary Figure 1** | Generation of BDQ resistant MTB strain (BDQr-MTB).  
873 **Supplementary Figure 2** | Cell viability assay of Mφs incubated with BDQ. Cells were treated with  
874 various concentrations of BDQ.  
875 **Supplementary Figure 3** | BDQ modulates the response of unactivated Mφs. Related to Figure 1.  
876 **Supplementary Figure 4** | The hERG gene is not expressed in human monocyte-derived Mφs.

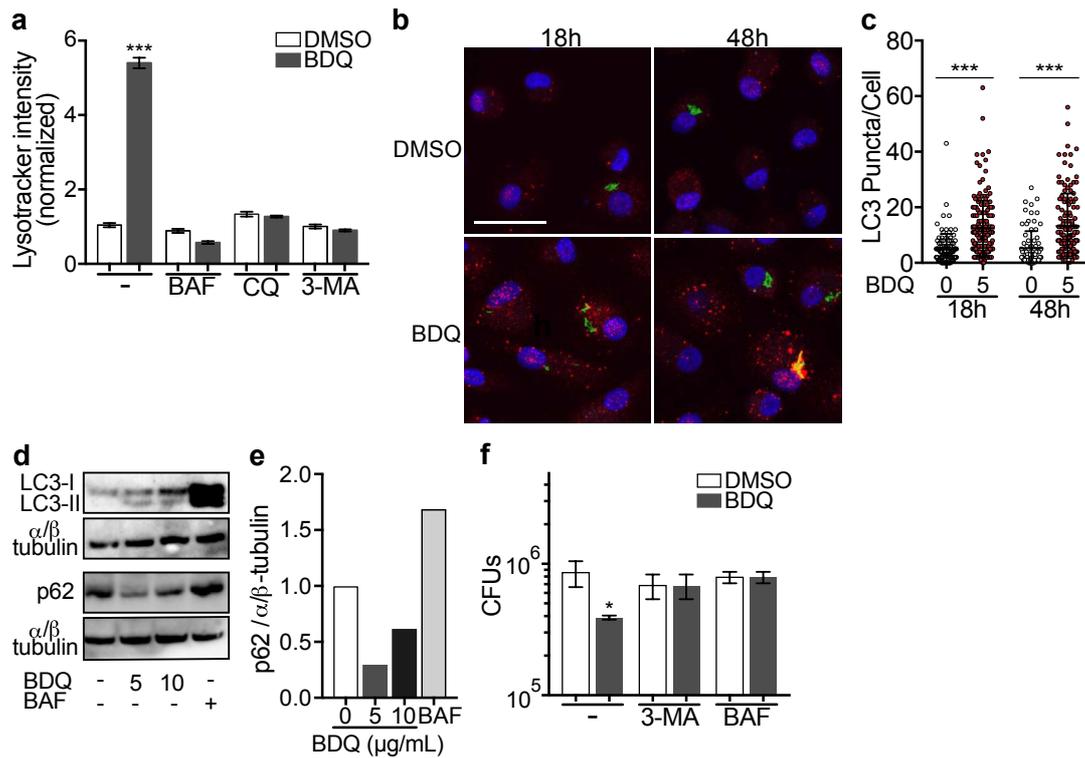
877 **Supplementary Figure 5** | Oxygen consumption rate (OCR) measured by Seahorse extracellular flux  
878 assay of cells incubated with BDQ for 48h. Related to Figure 5.  
879 **Supplementary Table 1** | Up-regulated genes in rBDQ-MTB-infected Mφs upon BDQ treatment.  
880 Related to Fig. 1. FDR<0.05.  
881 **Supplementary Table 2** | Down-regulated genes in rBDQ-MTB-infected Mφs upon BDQ treatment.  
882 Related to Fig. 1. FDR<0.05.  
883 **Supplementary Table 3** | Up-regulated genes in uninfected Mφs upon BDQ treatment. Related to  
884 Supplementary Fig. 3. FDR<0.05.  
885 **Supplementary Table 4** | Down-regulated genes in uninfected Mφs upon BDQ treatment. Related to  
886 Supplementary Fig. 3. FDR<0.05.



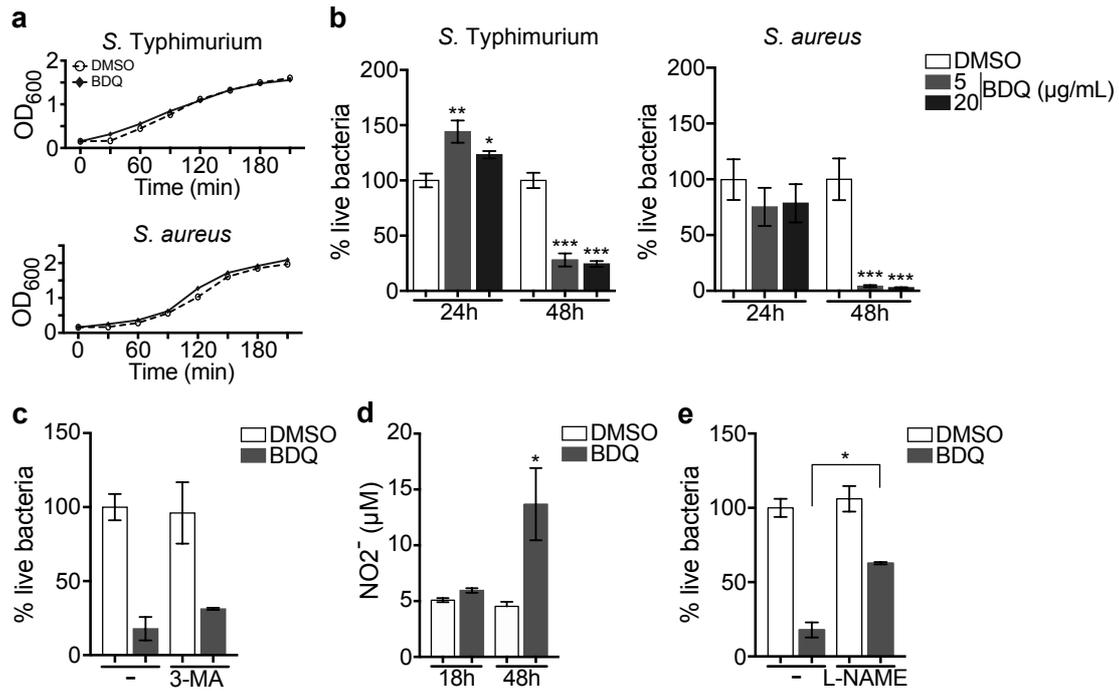
**Figure 1 | BDQ modulates the response of MTB-infected Mφs.** Cells from four donors were infected with BDQ resistant MTB for 24 h and then treated with BDQ (5 μg/mL) for an additional 18 h. Differentially-expressed genes were identified by mRNAseq. See also Supplementary Fig. 3. **a**, Pie chart showing the number of genes regulated by BDQ treatment relative to untreated control. **b**, Gene ontology enrichment analysis of genes whose expression is up-regulated by BDQ treatment, using the Cytoscape app ClueGO (FDR<0.05; LogFC>0.5). **c-d**, The Glycolytic Rate Assay was performed in BDQ-treated Mφs, in the presence of rotenone/antimycin A (Rot/AA) and 2-deoxy-D-glycose (2-DG), inhibitors of the mitochondrial electron transport chain and glycolysis, respectively. (one-way ANOVA test). **e**, Lipid profile of BDQ-treated cells by MALDI-TOF (unpaired two tailed Student's t test). PI: Phosphatidylinositol; CL: Cardiolipids; PE: Phosphatidylethanolamine; PG: Phosphatidylglycerol. Numbers correspond to mass-to-charge ratio (m/z). Error bars represent the mean ± SD and significant differences between treatments are indicated by an asterisk, in which \* p < 0.05, \*\* p < 0.01, \*\*\* p < 0.001.



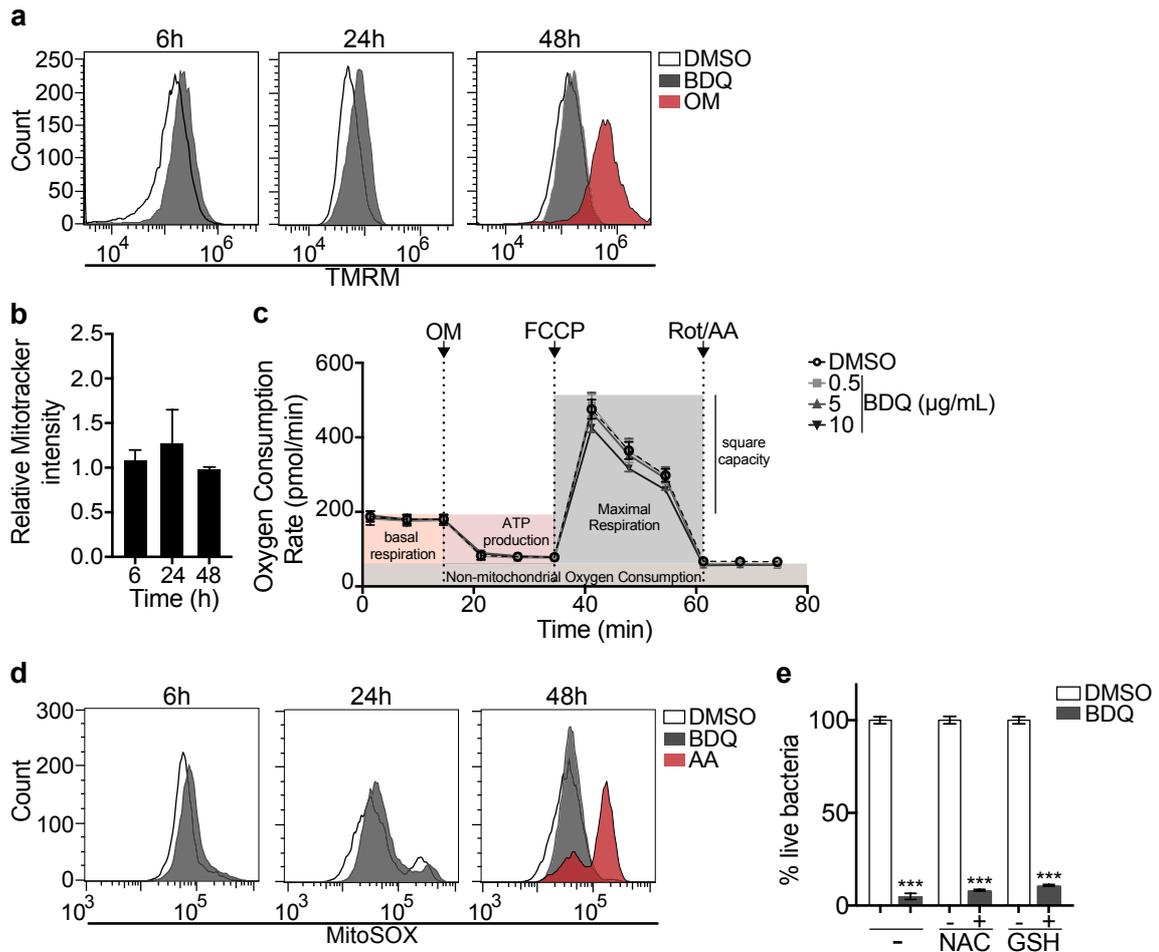
**Figure 2 | BDQ activates the lysosomal pathway in human MTB-infected Mφs.** **a**, Heatmap showing differential expression of genes included in the Lysosome KEGG category (FDR<0.05%). Each column corresponds to one donor. Data were normalized to determine the log ratio with respect to the median expression of each gene. **b**, Mφs were infected with BDQr-MTB expressing the GFP protein and incubated with BDQ (5 μg/mL) for 3 h, 18 h and 48 h. Acid organelles were then labeled with 100 nM LysoTracker DND-99 for 1 hour. The fluorescence intensity was quantified by flow cytometry. **c-e**, Cells were infected with GFP expressing BDQr-MTB (green) and treated with BDQ (5 μg/mL). After 18 h and 48 h of treatment, cells were labelled with LysoTracker (red) and fluorescence was analyzed by confocal microscopy. DAPI (blue) was used to visualize nuclei (scale bar: 10 μm). The quantification of LysoTracker staining and the percentage of LysoTracker-positive MTB phagosomes were performed using Icy software. **f**, Mφs were activated with heat-killed MTB and treated with BDQ for 18 h and 48 h. Cells were then incubated with DQ-Green BSA. Fluorescence was quantified by flow cytometry. Significant differences between BDQ treatment and control (DMSO) are indicated by an asterisk. **g**, Mφs were incubated for 48 h with BDQ, rifampicin (RIF, 20 μg/mL), isoniazid (INH, 10 μg/mL), ethambutol (EMB, 20 μg/mL), pyrazinamide (PZA, 200 μg/mL), amikacin (AMK, 20 μg/mL) and kanamycin (KAN, 20 μg/mL), and then stained with LysoTracker. Fluorescence intensity was analyzed by flow cytometry. **h**, Cells were infected with BDQr-MTB (MOI: 0.5) and treated with BDQ (1 μg/mL) and PZA. After 7 days treatment, cells were lysed and bacteria were enumerated by CFU (counted in triplicate). One representative experiment is shown. Error bars represent the mean ± SD. \* p < 0.05, \*\* p < 0.01, \*\*\* p < 0.001.



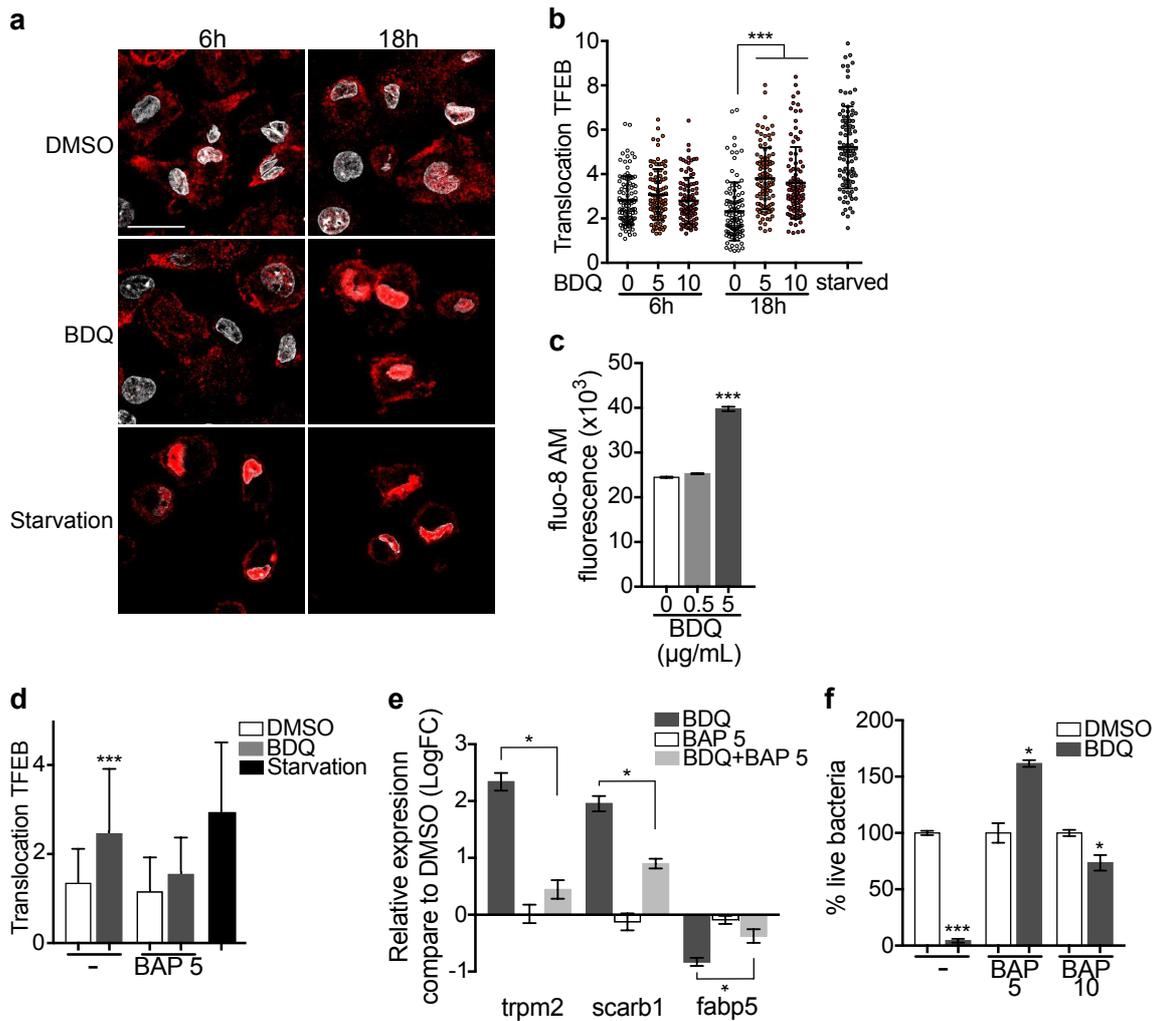
**Figure 3 | BDQ induced autophagy in MTB-infected Mφs.** **a**, BDQr-MTB infected Mφs were incubated with BDQ (5 μg/mL) and different inhibitors of autophagy; bafilomycin (BAF, 100 nM), chloroquine (CQ, 40 μM) and 3-methyladenine (3-MA, 5 mM). After 48 h, acidic compartments were stained with LysoTracker and fluorescence quantified by flow cytometry. **b**, Detection by indirect immunofluorescence of LC3 (red) in BDQr-MTB (green) infected Mφs, treated with BDQ for 18 h and 48 h (scale bar: 10 μm). DAPI (blue) was used to visualize nuclei. **c**, Determination of the number of LC3-positive puncta per cell (one-way ANOVA test). **d**, Western blot analysis of LC3, p62, and α/β-tubulin in MTB-infected cells treated with BDQ and BAF. **e**, Densitometric quantification of p62 staining. One representative experiment (of three) is shown. **f**, BDQr-MTB infected Mφs were left untreated or incubated with BDQ, 3-methyladenine (3-MA) and/or bafilomycin (BAF). After 48h, the number of intracellular bacteria was enumerated. Error bars represent the mean ± SD. \* p < 0.05, \*\* p < 0.01, \*\*\* p < 0.001.



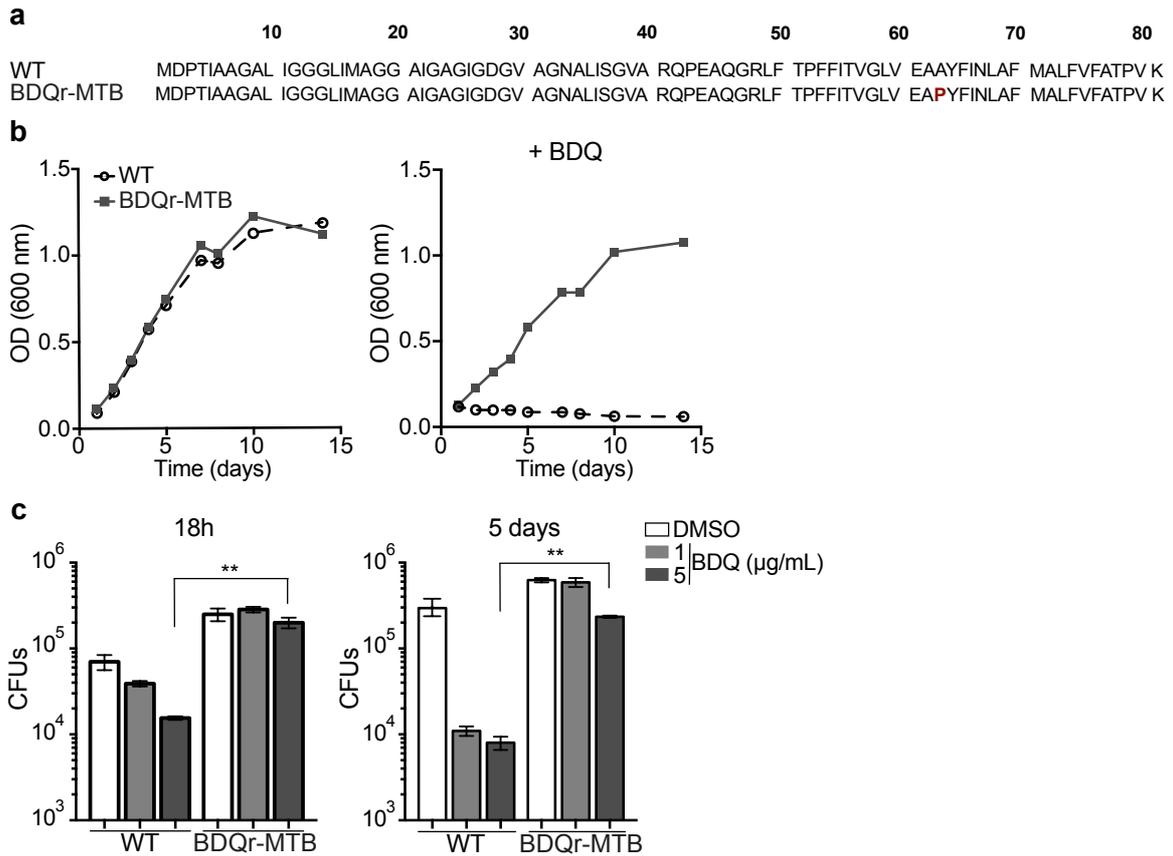
**Figure 4 | BDQ increases Mφs bactericidal functions.** **a**, Growth of *S. Typhimurium* and *S. aureus* in liquid medium in the presence of BDQ (20 μg/mL). **b**, Mφs were incubated with BDQ and then infected with *S. Typhimurium* or *S. aureus*. The number of intracellular bacteria was enumerated at 24 h post-infection. **c**, BDQ-treated Mφs were incubated with 3-MA and then infected with *S. aureus*. The number of bacteria was counted as previously. **d**, Quantification of NO<sub>2</sub><sup>-</sup> in the supernatant of Mφs incubated with BDQ for 18 h and 48 h. **e**, Cells were treated as in (C), 3-MA was replaced by L-NAME (0.1 mM), an inhibitor of nitric oxide (NO) synthesis. One representative experiment (of three) is shown. Error bars represent the mean ± SD. Unpaired two-tailed Student's t test was used. \* p < 0.05, \*\* p < 0.01, \*\*\* p < 0.001.



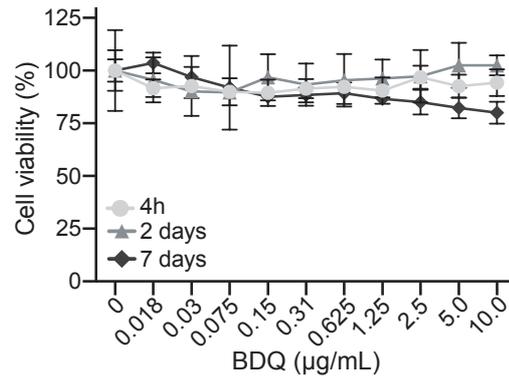
**Figure 5 | BDQ does not affect mitochondrial functions.** **a**, Mφs were treated with BDQ for 6 h, 24 h and 48 h. Cells were then washed and incubated with TMRM. Fluorescence was quantified by flow cytometry. Oligomycin is a positive control, which hyperpolarizes the mitochondrial membrane potential. **b**, Cells were treated as in (A), and mitochondria were stained with MitoTracker® Red FM, a red-fluorescent dye whose accumulation is dependent upon mitochondrial membrane potential. The graph represents the ratio between the mean fluorescence intensity of BDQ treated cells and DMSO treated cells. **c**, Oxygen consumption rate (OCR) measured by Seahorse extra-cellular flux assay of cells incubated with BDQ for 24h. Basal respiration, ATP production, maximal respiration, respiratory reserve, and nonmitochondrial respiration were followed by sequential additions of oligomycin (OM, an inhibitor of the ATPase), the mitochondrial oxidative phosphorylation uncoupler FCCP, and the inhibitors of electron transport rotenone/antimycin A (Rot/AA). Error bars represent the mean  $\pm$  SD of 3 technical replicates. One representative experiment (of two) is shown. See also Supplementary Fig. 5. **d**, At each indicated time points, mitochondrial superoxide (mROS) were stained using the MitoSOX dye in BDQ-treated cells. The mitochondrial electron transport inhibitor antimycin A (AA) is used as a positive control. **e**, Cells were incubated with BDQ in the presence or not of two antioxidants, glutathione (GSH) and its precursor N-Acetyl-L-cysteine (NAC). After 24 h, the cells were infected with *S. aureus* for an additional 24 h. Mφs were lysed and the number of intracellular bacteria enumerated.



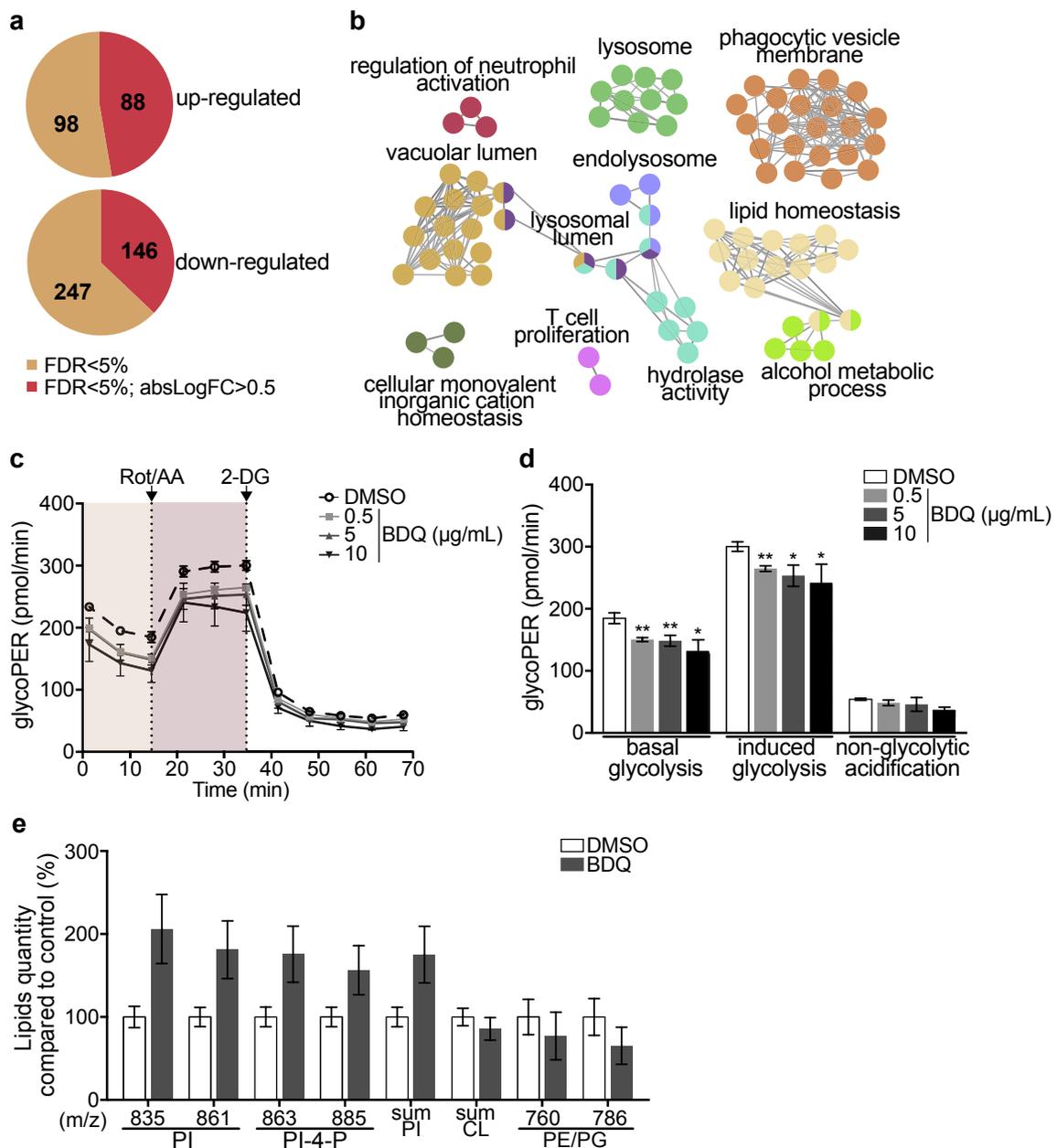
**Figure 6 | Calcium-dependent activation of TFEB by BDQ.** **a**, Representative fluorescence microscopy images of Mφs treated with BDQ for 6 h and 18 h, or incubated in HBSS medium for 1 h (starvation). Cells were stained with antibody against TFEB (red). DAPI (white) was used to visualize nuclei. Scale bar: 10  $\mu\text{m}$ . **b**, Ratio between nuclear and cytosolic TFEB fluorescence intensity ( $n > 100$  cells per condition, two-way ANOVA test). **c**, Mφs were treated with BDQ for 18 h and then loaded with the fluorescent calcium binding dye Fluo-8 AM. After 1 h of incubation,  $\text{Ca}^{2+}$  concentration was monitored by FLUOstar Omega. **d**, Ratio between nuclear and cytosolic TFEB fluorescence intensity in starved cells and in cells treated with BDQ and/or with the intracellular calcium chelator BAPTA (BAP). ( $n > 100$  cells per condition, two-way ANOVA test). **e**, Relative gene expression measured by RT-qPCR for a panel of differentially expressed lysosomal genes. BDQ treated-Mφs were either left untreated or incubated with BAPTA. Relative expression levels were normalized to the *rpl24* gene. **f**, Mφs were treated with BDQ with or without BAPTA, and then infected with *S. aureus*. After 1 day, the cells were lysed and the number of intracellular bacterial colonies was counted (unpaired two tailed Student's t test). Error bars represent the mean  $\pm$  SD. was used. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .



**Supplementary Fig. 1 | Generation of BDQ resistant MTB strain (BDQr-MTB).** **a**, Amino acid sequence alignment of the ATP synthase c-subunit gene in wild-type (WT) and BDQ-resistant H37Rv strain. The mutation was indicated in red, at position 63. **b**, Optical density (OD) measurements of bacterial growth of WT and BDQr-MTB. Bacteria were cultured in 7H9 medium supplemented with 10% OADC enrichment with/without BDQ. **c**, Intracellular growth of wild-type (WT) and BDQ-resistant H37Rv strain. Mφs were infected with the 2 strains and incubated with BDQ. After 18 h and 5 days, the cells were lysed and the number of bacterial colonies was counted. Results are means  $\pm$  SD. \*\*  $p < 0.01$ , unpaired two tailed Student's t test.

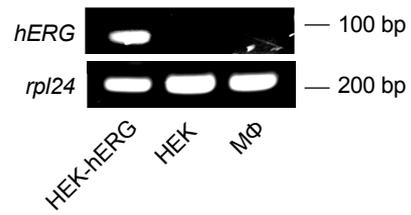


**Supplementary Fig. 2 | Cell viability assay of Mφs incubated with BDQ.** Cells were treated with various concentrations of BDQ. After 4 h, 2 and 7 days, cell viability was evaluated with the MTT assay (Trevigen) according to the manufacturer's instructions. Results represent the mean  $\pm$  SD of 3 replicates. One representative experiment (out of three) is shown.

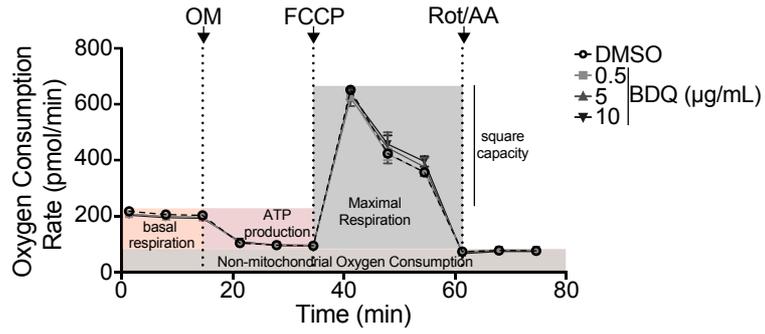


**Supplementary Fig. 3 | BDQ modulates the response of unactivated Mφs. Related to Fig 1.**

Cells from four individual donors were treated with BDQ (5 μg/mL) for 18 h. The differentially-expressed genes were then identified by mRNAseq. **a**, Venn diagram showing the number of genes regulated by BDQ treatment relative to untreated controls. **b**, Gene ontology enrichment analysis of genes whose expression is upregulated by BDQ treatment, using the Cytoscape app ClueGO (FDR<0.05; LogFC>0.5). **c-d**, The Glycolytic Rate Assay was performed in Mφs, in the presence of rotenone/antimycin A (Rot/AA) and 2-deoxy-D-glucose (2-DG), respectively inhibitors of mitochondrial electron transport chain and of glycolysis. (one-way ANOVA test). **e**, Lipid profile of cells by MAL-DI-TOF (unpaired two tailed Student's t test). PI: Phosphatidylinositol; CL: Cardiolipids; PE: Phosphatidylethanolamine; PG: Phosphatidylglycerol. Numbers correspond to mass-to-charge ratio (m/z). Error bars represent the mean ± SD and significant differences between treatments are indicated by an asterisk, in which \* p < 0.05, \*\* p < 0.01, \*\*\* p < 0.001.



**Supplementary Fig. 4 | The *hERG* gene is not expressed in human monocyte-derived Mφs.** RT-qPCR was performed in order to detect *hERG* mRNA expression in Mφs, in *hERG*-transfected and non-transfected HEK293 cells (kind gift from Craig T. January, University of Wisconsin–Madison). *rpl24* was used as control gene.



**Supplementary Fig. 5 | Oxygen consumption rate (OCR) measured by Seahorse extracellular flux assay of cells incubated with BDQ for 48h. Related to Fig. 5.** Basal respiration, ATP production, maximal respiration, respiratory reserve and nonmitochondrial respiration were followed by sequential additions of oligomycin (OM, an inhibitor of the ATPase), the mitochondrial oxidative phosphorylation uncoupler FCCP, and the inhibitors of electron transport antimycin A/rotenone (Rot/AA). Error bars represent the mean  $\pm$  SD of 3 technical replicates. One representative experiment (out of two) is shown.

# DISCUSSION

---

## I. L'IMPACT DE LA BEDAQUILINE SUR LA REPONSE IMMUNITAIRE INNEE

L'émergence de souches résistantes aux antibiotiques est un problème de santé important dans le monde. L'activité des antibiotiques lorsqu'ils sont administrés chez les patients est complexe et reste encore peu comprise. En plus d'avoir un rôle sur l'inhibition de la croissance bactérienne, les antibiotiques peuvent moduler les fonctions du système immunitaire de l'hôte. Durant cette étude, nous avons élucidé l'impact de la BDQ sur la réponse des Mφs humains. Le traitement par la BDQ induit un remodelage important du métabolisme cellulaire et permet de moduler les réponses immunitaires des Mφs pour lutter face aux pathogènes. Ainsi la BDQ, par l'augmentation des activités bactéricides, confère une résistance innée à une infection bactérienne.

La BDQ est qualifiée de composé amphiphile cationique (AC)<sup>236</sup>. Ces composés sont retrouvés dans de nombreuses catégories de médicaments couramment utilisés (anti-dépresseurs, neuroleptiques, anti-arythmiques)<sup>244</sup>. Ils possèdent tous des structures hydrophobes et des chaînes hydrophiles associées à des éléments amines. Les composés AC sont connus pour leurs accumulations intracellulaires dans des compartiments spécifiques de la cellule, tel que la mitochondrie ou le noyau cellulaire pour certains anti-dépresseurs ou dans des vésicules cytoplasmiques, ce qui est le cas de la chloroquine, un anti-paludique<sup>244</sup>. De plus, les lysosomes sont capables de séquestrer ces médicaments par un processus, non enzymatique et sans l'implication de transporteur, connu sous le nom de « *ion trapping* »<sup>245</sup>. A un pH neutre, ils vont se diffuser passivement dans la cellule et dans les membranes des organelles. Lorsqu'ils se diffusent dans des compartiments acides, dont les lysosomes, le groupement amine s'ionise et ces composés chargés positivement ne peuvent plus traverser la membrane. Cette accumulation va avoir différentes conséquences : altération du métabolisme des phospholipides, apparition de corps multi-lamellaires intracellulaire entraînant la formation de cellules spumeuses et augmentation du pH lysosomal diminuant l'activité enzymatique du lysosome. Cependant, nos résultats obtenus coïncident avec une

augmentation de l'activité lysosomale, à travers la régulation positive des gènes associés à l'acidification et aux hydrolases des lysosomes. En accord avec ces observations, la BDQ induit une biogénèse de lysosomes fonctionnels.

De nombreux composés AC vont induire une phospholipidose qui est caractérisée par une accumulation excessive de phospholipides, principalement liés aux lysosomes. Cette accumulation va induire des dysfonctionnements dans les fonctions lysosomales. Les études pré-cliniques ont montré que la BDQ peut induire une phospholipidose dans la lignée cellulaire de monocyte humain THP-1 et chez les animaux<sup>236</sup>. Le processus de phospholipidose implique différentes familles de phospholipides dont les sphingomyélines, les phosphatidylcholines, les phosphatidyléthanolamines, les phosphatidylsérines, les acides lysobisphosphatidiques et le cholestérol. Nos résultats montrent une augmentation de la quantité des PI et des PI-4-phosphate dans les Mφs traités par la BDQ. La quantité des cardiolipides, des phosphatidyléthanolamines, des phosphatidylglycérols restent inchangés à la suite d'un traitement par la BDQ. Ces résultats n'indiquent pas un dysfonctionnement des phospholipides des lysosomes mais une régulation ciblée de certains phospholipides. En accord avec cette idée, les PI sont impliqués dans la régulation de nombreuses fonctions cellulaires dont le trafic des endosomes, l'exportation de vésicules du réticulum endoplasmique, dans l'autophagie et dans la fusion du phagosome-lysosome<sup>239,240</sup>. L'augmentation de ces PI par la BDQ pourrait donc contribuer à la diminution de la survie de MTB. Cette hypothèse corrobore avec les résultats récents de l'article de D.J Greenwood *et al.* qui montre que la BDQ s'accumule dans des gouttelettes lipidiques dans les macrophages infectés par MTB permettant d'augmenter l'efficacité de l'anti-tuberculeux<sup>246</sup>. Les gouttelettes lipidiques présentes dans les Mφs constituent une source de carbone pour MTB. Il a été montré que ces gouttelettes lipidiques sont étroitement liées aux vacuoles contenant MTB qui pourrait être utilisé pour sa survie intracellulaire<sup>246,247</sup>. Ainsi cette relation entre la vacuole contenant MTB et les gouttelettes lipidiques souligne le rôle de ces derniers comme réservoir accessible permettant de tuer MTB.

Impliqué dans la voie endosomale et autophagique, le lysosome tient une place importante comme « plateforme de recyclage » de la cellule par son rôle dans la dégradation de macromolécules et dans le maintien de l'homéostasie cellulaire<sup>248</sup>. Le lysosome sert

également de plate-forme pour la signalisation métabolique à travers la localisation à sa surface du régulateur de croissance cellulaire, mTORC1 (*mechanistic target of rapamycin*), mettant en avant le fonctionnement du lysosome au centre de nombreuses voies de signalisation. Le recrutement de mTORC1 au niveau du lysosome est une condition préalable afin de permettre son activation<sup>249</sup>. L'activation de mTORC1 va permettre l'augmentation de la production de protéines, de lipides et de nucléotides tout en supprimant les voies cataboliques telles que l'autophagie<sup>249</sup>. Ainsi mTORC1 va jouer un rôle central dans l'équilibre des voies anaboliques et cataboliques en réponse aux conditions environnementales. Lorsque les conditions en nutrition cellulaire sont favorables, mTORC1 va se fixer et phosphoryler TFEB entraînant sa séquestration dans le cytoplasme. Mais lors d'une privation de nutriments, mTORC1 va se dissocier de la membrane du lysosome et devenir inactif entraînant l'activation de TFEB. Différentes conditions, telles que le stress lysosomal ou une infection bactérienne, favorisent la localisation nucléaire de TFEB pour permettre l'expression des gènes liés à la biogénèse des lysosomes et à l'autophagie. Cependant, pour que TFEB soit actif, une étape de déphosphorylation de certains résidus est nécessaire. Il a été montré que la calcineurine, composée d'une sous-unité catalytique, joue un rôle dans la déphosphorylation de TFEB. Les canaux calciques lysosomaux MCOLN1 (*muco1ipin 1* connu également sous le nom de TRPML1) vont permettre la libération du calcium lysosomal induisant l'activation de la calcineurine<sup>243</sup>. Le lysosome va ainsi jouer un rôle central dans la signalisation calcique régulant la voie TRPML1-Calcineurine-TFEB. La relocalisation de TFEB du cytoplasme vers le noyau va induire l'expression du réseau transcriptionnel de gènes CLEAR (*coordinated lysosomal expression and regulation*). En accord avec la littérature, nous avons observé que le traitement par la BDQ induit la translocation de TFEB dans le noyau de façon dépendante du calcium permettant d'augmenter l'expression de 85 gènes contenant le motif CLEAR après 18 h de traitement.

L'impact majeur de la BDQ sur les Mφs est la capacité d'activer les mécanismes de défenses dont l'induction d'effecteurs anti-microbiens tels que le NO, la fusion des phagosomes et des lysosomes et l'autophagie. Décrit durant l'introduction de cette thèse, d'autres anti-tuberculeux ont la capacité de réguler l'autophagie. C'est le cas de l'INH et de PZA qui va induire l'activation de l'autophagie *in vitro* dans des Mφs de souris ou *in vivo* chez la drosophile, contribuant à l'activité anti-microbienne contre les MTB intracellulaires. Les

auteurs ont montré que la formation de ROS bactériennes induit par les antibiotiques entraîne l'activation de l'autophagie en générant des ROS cellulaires et mitochondriales dans les Mφs infectés et traités. Ils ont pu montrer que l'induction de l'autophagie est également dépendante de l'activation de l'AMPK. Dans cette étude, la souche de MTB utilisée est sensible à l'INH et à la PZA, permettant ainsi la formation de ROS bactériennes et d'induire l'autophagie uniquement dans les Mφs non infectés. La réponse aux stress de MTB et la diminution de la charge bactérienne contribuent alors à une régulation positive de l'autophagie. Contrairement à cette étude, l'impact observé de la BDQ sur les Mφs est indépendante de l'infection. De plus, dans notre modèle, l'INH n'induit pas l'autophagie dans les Mφs infectés par des MTB après 24 h de traitement (Annexe 2). A ce jour, la BDQ est le seul anti-tuberculeux à induire l'autophagie en modulant directement les fonctions cellulaires.

Des études contradictoires suggèrent une interaction de la BDQ avec l'ATP synthase mitochondriale. Bien que l'ATP synthase est fortement conservée au cours de l'évolution chez les procaryotes et les eucaryotes, une première étude sur l'ATP synthase mitochondriale humaine montrait une affinité 20 000 fois plus faible (concentration inhibitrice à 50% (IC<sub>50</sub>) > 111 µg/mL) par rapport à l'ATP synthase mycobactérienne (IC<sub>50</sub> > 5,5 ng/mL)<sup>250</sup>. Dans une seconde étude, les résultats suggèrent une interaction avec la BDQ et l'ATP synthase mitochondriale dans une lignée cellulaire cancéreuse. La BDQ inhibe la consommation d'oxygène mitochondriale et induit un stress oxydatif à une concentration de 5,5 µg/mL<sup>251</sup>. Il a été également montré que la BDQ inhibe la respiration mitochondriale issue des cellules du foie de rat à une concentration élevée de 27 µg/mL<sup>252</sup>. A l'aide du profil lipidique de Mφs traités par la BDQ, nous avons observé aucune modification dans la quantité des cardiolipines, constituant des membranes internes des mitochondries. Nous avons analysé différentes fonctions mitochondriales afin de savoir si la BDQ pouvait les moduler. La consommation d'oxygène, le potentiel de membrane mitochondrial ainsi que la production des ROS mitochondriaux n'étaient pas modifiés dans les Mφs traités par la BDQ. En accord avec ces observations, l'étude de DJ. Greenwood *et al.* portée sur la localisation de la BDQ intracellulaire, montre une quantité importante de la BDQ distribué dans la vacuole contenant MTB et dans les gouttelettes lipidiques<sup>246</sup>. Mais seulement un faible signal de la BDQ a été détecté dans d'autres organites dont les mitochondries, limitant les effets possibles de cet anti-tuberculeux sur les mitochondries des Mφs.

L'augmentation du nombre de cas de MDR-TB et de XDR-TB rend les anti-tuberculeux moins efficaces. L'amélioration du traitement est donc nécessaire et reste un objectif majeur contre MTB. En plus du développement de nouveaux composés anti-tuberculeux, la HDT est une approche intéressante face à MTB. Elle pourrait avoir la capacité de réduire la durée du traitement chez les patients par son utilisation comme adjuvant avec les anti-tuberculeux. L'une des stratégies des HDT est d'induire les mécanismes anti-microbiens des cellules afin de réduire la survie de MTB. Par exemple la metformine, composé HDT en cours d'étude, va induire la production de ROS mitochondriaux et induit la fusion phagosome-lysosome en activant l'AMPK. Cette approche semble avantageuse puisque MTB développe des stratégies pour inhiber ces mécanismes, tels que l'autophagie, la fusion des phagosomes-lysosomes ou l'acidification des phagolysosomes rendant les cellules plus susceptibles contre le pathogène. Nos résultats montrent que la BDQ peut passer outre des mécanismes d'échappements du pathogène afin de contrôler l'infection. Nous montrons également que la BDQ potentialise l'activité de la PZA, indépendamment de l'activité bactéricide de MTB, soulignant l'avantage possible de la combinaison PZA-BDQ lors d'un traitement contre les MDR-TB. Ainsi, notre étude ouvre de nouvelles perspectives pour le traitement de la TB par l'utilisation potentielle de la BDQ comme composé HDT.

Les réponses immunitaires lors d'une infection peuvent être modulées par les pathogènes, mais également par certains antibiotiques, dont la BDQ. À la vue de l'efficacité des antibiotiques à détruire le pathogène, leur impact sur le système immunitaire n'est pas étudié en détail. Cependant, le rôle des antibiotiques sur la réponse immunitaire pourrait avoir des conséquences importantes, particulièrement dans les cas de traitements longs, de co-infection ou dans l'apparition de souches MDR voir XDR chez les patients. De futures études seraient primordiales afin de mieux comprendre les conséquences des traitements antibiotiques sur le système immunitaire de l'hôte au cours d'une infection.

## BIBLIOGRAPHIE

---

1. WHO Global tuberculosis report, 2017. World Health Organization, Geneva; 2018.
2. Pai, M. *et al.* Tuberculosis. *Nature Reviews Disease Primers* **2**, 16076 (2016).
3. Ong, C. W. M., Elkington, P. T. & Friedland, J. S. Tuberculosis, Pulmonary Cavitation, and Matrix Metalloproteinases. *Am J Respir Crit Care Med* **190**, 9–18 (2014).
4. Behr, M. A., Edelstein, P. H. & Ramakrishnan, L. Revisiting the timetable of tuberculosis. *BMJ* **362**, k2738 (2018).
5. Chang, C. C. *et al.* HIV and co-infections. *Immunol Rev* **254**, 114–142 (2013).
6. Lugo-Villarino, G., Verollet, C., Maridonneau-Parini, I. & Neyrolles, O. Macrophage Polarization: Convergence Point Targeted by Mycobacterium Tuberculosis and HIV. *Front. Immunol.* **2**, (2011).
7. Abel Laurent, El-Baghdadi Jamila, Bousfiha Ahmed Aziz, Casanova Jean-Laurent & Schurr Erwin. Human genetics of tuberculosis: a long and winding road. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **369**, 20130428 (2014).
8. Casanova, J.-L. & Abel, L. Genetic Dissection of Immunity to Mycobacteria: The Human Model. *Annual Review of Immunology* **20**, 581–620 (2002).
9. Harishankar, M., Selvaraj, P. & Bethunaickan, R. Influence of Genetic Polymorphism Towards Pulmonary Tuberculosis Susceptibility. *Front Med (Lausanne)* **5**, (2018).
10. Li, H. T., Zhang, T. T., Zhou, Y. Q., Huang, Q. H. & Huang, J. SLC11A1 (formerly NRAMP1) gene polymorphisms and tuberculosis susceptibility: a meta-analysis. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* **10**, 3–12 (2006).
11. Neyrolles, O. & Quintana-Murci, L. Sexual Inequality in Tuberculosis. *PLoS Med* **6**, (2009).
12. Bini, E. I. *et al.* The Influence of Sex Steroid Hormones in the Immunopathology of Experimental Pulmonary Tuberculosis. *PLoS One* **9**, (2014).
13. Gagneux, S. Ecology and evolution of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nature Reviews Microbiology* **16**, 202–213 (2018).
14. Coscolla, M. & Gagneux, S. Consequences of genomic diversity in *Mycobacterium tuberculosis*. *Semin Immunol* **26**, 431–444 (2014).
15. Ronacher, K. *et al.* Acquired immunodeficiencies and tuberculosis: focus on HIV/AIDS and diabetes mellitus. *Immunological Reviews* **264**, 121–137 (2015).
16. Brassard, P., Kezouh, A. & Suissa, S. Antirheumatic drugs and the risk of tuberculosis. *Clin. Infect. Dis.* **43**, 717–722 (2006).
17. Cegielski, J. P. & McMurray, D. N. The relationship between malnutrition and tuberculosis: evidence from studies in humans and experimental animals. (2004). Available at: <https://www.ingentaconnect.com/content/iuatld/ijtlld/2004/00000008/00000003/art00004>. (Accessed: 2nd May 2019)
18. Chan, J. *et al.* Effects of protein calorie malnutrition on tuberculosis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 14857–14861 (1996).
19. Allen, J. E. & Maizels, R. M. Diversity and dialogue in immunity to helminths. *Nature Reviews Immunology* **11**, 375–388 (2011).
20. Anuradha, R. *et al.* Modulation of *Mycobacterium tuberculosis*-specific humoral immune responses is associated with *Strongyloides stercoralis* co-infection. *PLoS Negl Trop Dis* **11**, (2017).

21. Bothamley, G. H. Smoking and tuberculosis: a chance or causal association? *Thorax* **60**, 527–528 (2005).
22. Imtiaz, S. *et al.* Alcohol consumption as a risk factor for tuberculosis: meta-analyses and burden of disease. *European Respiratory Journal* **50**, 1700216 (2017).
23. L'intradermoréaction à la tuberculine (IDR) ou test à la tuberculine. *Médecine et Maladies Infectieuses* **34**, 358–363 (2004).
24. Bergeron, A. & Herrmann, J.-L. Screening for tuberculosis before TNF $\alpha$  antagonist initiation: Are current methods good enough? *Joint Bone Spine* **75**, 112–115 (2008).
25. Bergot, E. *et al.* Recommandations pratiques pour l'utilisation et l'interprétation des tests de détection de l'interféron gamma dans le diagnostic de l'infection tuberculeuse latente et de la tuberculose maladie. *Revue des Maladies Respiratoires* **35**, 852–858 (2018).
26. Bonnet, M. Les nouveaux tests diagnostiques de la tuberculose maladie : de la théorie à la pratique dans les pays du Sud. *Revue des Maladies Respiratoires* **28**, 1310–1321 (2011).
27. Siddiqi, K., Lambert, M.-L. & Walley, J. Clinical diagnosis of smear-negative pulmonary tuberculosis in low-income countries: the current evidence. *The Lancet Infectious Diseases* **3**, 288–296 (2003).
28. Starke, J. R. Pediatric tuberculosis: time for a new approach. *Tuberculosis* **83**, 208–212 (2003).
29. Steingart, K. R. *et al.* Xpert<sup>®</sup> MTB/RIF assay for pulmonary tuberculosis and rifampicin resistance in adults. *Cochrane Database Syst Rev* CD009593 (2014). doi:10.1002/14651858.CD009593.pub3
30. Burrill, J. *et al.* Tuberculosis: A Radiologic Review. *RadioGraphics* **27**, 1255–1273 (2007).
31. Masson, E. Manifestations radiologiques de la tuberculose pulmonaire. *EM-Consulte* Available at: <https://www.em-consulte.com/article/29816/manifestations-radiologiques-de-la-tuberculose-pul>. (Accessed: 29th June 2019)
32. Murray, J. F., Schraufnagel, D. E. & Hopewell, P. C. Treatment of Tuberculosis. A Historical Perspective. *Annals ATS* **12**, 1749–1759 (2015).
33. Clinical Trial of Six-Month and Four-Month Regimens of Chemotherapy in the Treatment of Pulmonary Tuberculosis. *Am Rev Respir Dis* **119**, 579–585 (1979).
34. Timmins, G. S. & Deretic, V. Mechanisms of action of isoniazid. *Molecular Microbiology* **62**, 1220–1227 (2006).
35. Somoskovi, A., Parsons, L. M. & Salfinger, M. The molecular basis of resistance to isoniazid, rifampin, and pyrazinamide in Mycobacterium tuberculosis. *Respiratory Research* **2**, 164 (2001).
36. Mikusová, K., Slayden, R. A., Besra, G. S. & Brennan, P. J. Biogenesis of the mycobacterial cell wall and the site of action of ethambutol. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **39**, 2484–2489 (1995).
37. Zhang, Y., Shi, W., Zhang, W. & Mitchison, D. Mechanisms of Pyrazinamide Action and Resistance. *Microbiol Spectr* **2**, 1–12 (2013).
38. Matsumoto, T., Ohno, M. & Azuma, J. Future of pharmacogenetics-based therapy for tuberculosis. *Pharmacogenomics* **15**, 601–607 (2014).
39. WHO consolidated guidelines on drug-resistant tuberculosis treatment, 2019.
40. Working Group on new TB Drugs. Clinical pipeline for new anti-tuberculosis drugs.
41. Sulis, G. *et al.* Recent developments in the diagnosis and management of tuberculosis. *npj Primary Care Respiratory Medicine* **26**, 16078 (2016).
42. Brecik, M. *et al.* DprE1 Is a Vulnerable Tuberculosis Drug Target Due to Its Cell Wall

- Localization. *ACS Chem. Biol.* **10**, 1631–1636 (2015).
43. Tiberi, S. *et al.* Tuberculosis: progress and advances in development of new drugs, treatment regimens, and host-directed therapies. *The Lancet Infectious Diseases* **18**, e183–e198 (2018).
44. Pethe, K. *et al.* Discovery of Q203, a potent clinical candidate for the treatment of tuberculosis. *Nature Medicine* **19**, 1157–1160 (2013).
45. Singhal, A. *et al.* Metformin as adjunct antituberculosis therapy. *Science Translational Medicine* **6**, 263ra159-263ra159 (2014).
46. Huang, S.-J. *et al.* Vitamin D deficiency and the risk of tuberculosis: a meta-analysis. *Drug Design, Development and Therapy* (2016). doi:10.2147/DDDT.S79870
47. Salahuddin, N. *et al.* Vitamin D accelerates clinical recovery from tuberculosis: results of the SUCCINCT Study [Supplementary Cholecalciferol in recovery from tuberculosis]. A randomized, placebo-controlled, clinical trial of vitamin D supplementation in patients with pulmonary tuberculosis'. *BMC Infectious Diseases* **13**, 22 (2013).
48. High-dose vitamin D3 during intensive-phase antimicrobial treatment of pulmonary tuberculosis: a double-blind randomised controlled trial - The Lancet. Available at: [https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736\(10\)61889-2/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736(10)61889-2/fulltext). (Accessed: 1st May 2019)
49. Wallis, R. S. & Zumla, A. Vitamin D as Adjunctive Host-Directed Therapy in Tuberculosis: A Systematic Review. *Open Forum Infect Dis* **3**, (2016).
50. Costa-Gouveia, J., Aínsa, J. A., Brodin, P. & Lucía, A. How can nanoparticles contribute to antituberculosis therapy? *Drug Discovery Today* **22**, 600–607 (2017).
51. Johnson, C. M. *et al.* Oral Therapy Using Nanoparticle-Encapsulated Antituberculosis Drugs in Guinea Pigs Infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* **49**, 4335–4338 (2005).
52. Coya, J. M. *et al.* Tri-mannose grafting of chitosan nanocarriers remodels the macrophage response to bacterial infection. *J Nanobiotechnology* **17**, (2019).
53. Machelart, A. *et al.* Intrinsic Antibacterial Activity of Nanoparticles Made of  $\beta$ -Cyclodextrins Potentiates Their Effect as Drug Nanocarriers against Tuberculosis. *ACS Nano* **13**, 3992–4007 (2019).
54. Cohen, S. B. *et al.* Alveolar Macrophages Provide an Early *Mycobacterium tuberculosis* Niche and Initiate Dissemination. *Cell Host & Microbe* **24**, 439-446.e4 (2018).
55. Huang, L., Nazarova, E. V., Tan, S., Liu, Y. & Russell, D. G. Growth of *Mycobacterium tuberculosis* in vivo segregates with host macrophage metabolism and ontogeny. *Journal of Experimental Medicine* **215**, 1135–1152 (2018).
56. Liu, C. H., Liu, H. & Ge, B. Innate immunity in tuberculosis: host defense vs pathogen evasion. *Cellular & Molecular Immunology* **14**, 963–975 (2017).
57. Scordo, J. M., Knoell, D. L. & Torrelles, J. B. Alveolar epithelial cells in *Mycobacterium tuberculosis* infection: Active Players or Innocent Bystanders. *J Innate Immun* **8**, 3–14 (2016).
58. Song, O.-R. *et al.* ArfGAP1 restricts *Mycobacterium tuberculosis* entry by controlling the actin cytoskeleton. *EMBO Rep.* **19**, 29–42 (2018).
59. Srivastava, S., Ernst, J. D. & Desvignes, L. Beyond macrophages: the diversity of mononuclear cells in tuberculosis. *Immunological reviews* **262**, 179 (2014).
60. Orme, I. M., Robinson, R. T. & Cooper, A. M. The balance between protective and pathogenic immune responses in the TB-infected lung. *Nature Immunology* **16**, 57–63 (2015).
61. Ardain, A. *et al.* Group 3 innate lymphoid cells mediate early protective immunity against tuberculosis. *Nature* **570**, 528 (2019).

62. Corleis, B. *et al.* Escape of Mycobacterium tuberculosis from oxidative killing by neutrophils. *Cellular Microbiology* **14**, 1109–1121 (2012).
63. Martineau, A. R. *et al.* Neutrophil-mediated innate immune resistance to mycobacteria. *J Clin Invest* **117**, 1988–1994 (2007).
64. Tan, B. H. *et al.* Macrophages Acquire Neutrophil Granules for Antimicrobial Activity against Intracellular Pathogens. *The Journal of Immunology* **177**, 1864–1871 (2006).
65. Stamm, C. E., Collins, A. C. & Shiloh, M. U. Sensing of Mycobacterium tuberculosis and consequences to both host and bacillus. *Immunological Reviews* **264**, 204–219 (2015).
66. Quesniaux, V. *et al.* Toll-like receptor pathways in the immune responses to mycobacteria. *Microbes and Infection* **6**, 946–959 (2004).
67. Urdahl, K., Shafiani, S. & Ernst, J. Initiation and regulation of T-cell responses in tuberculosis. *Mucosal Immunol* **4**, 288–293 (2011).
68. Wolf, A. J. *et al.* Initiation of the adaptive immune response to Mycobacterium tuberculosis depends on antigen production in the local lymph node, not the lungs. *Journal of Experimental Medicine* **205**, 105–115 (2008).
69. Blomgran, R., Desvignes, L., Briken, V. & Ernst, J. D. Mycobacterium tuberculosis Inhibits Neutrophil Apoptosis, Leading to Delayed Activation of Naive CD4 T cells. *Cell Host & Microbe* **11**, 81–90 (2012).
70. Tailleux, L. *et al.* DC-SIGN Is the Major Mycobacterium tuberculosis Receptor on Human Dendritic Cells. *Journal of Experimental Medicine* **197**, 121–127 (2003).
71. Khader, S. A. *et al.* Interleukin 12p40 is required for dendritic cell migration and T cell priming after Mycobacterium tuberculosis infection. *J Exp Med* **203**, 1805–1815 (2006).
72. Sullivan, B. M. *et al.* Increased Susceptibility of Mice Lacking T-bet to Infection with Mycobacterium tuberculosis Correlates with Increased IL-10 and Decreased IFN- $\gamma$  Production. *The Journal of Immunology* **175**, 4593–4602 (2005).
73. Cooper, A. M., Magram, J., Ferrante, J. & Orme, I. M. Interleukin 12 (IL-12) Is Crucial to the Development of Protective Immunity in Mice Intravenously Infected with Mycobacterium tuberculosis. *Journal of Experimental Medicine* **186**, 39–45 (1997).
74. Lin, P. L. & Flynn, J. L. CD8 T cells and Mycobacterium tuberculosis infection. *Semin Immunopathol* **37**, 239–249 (2015).
75. Kursar, M. *et al.* Cutting Edge: Regulatory T Cells Prevent Efficient Clearance of Mycobacterium tuberculosis. *The Journal of Immunology* **178**, 2661–2665 (2007).
76. Shafiani, S., Tucker-Heard, G., Kariyone, A., Takatsu, K. & Urdahl, K. B. Pathogen-specific regulatory T cells delay the arrival of effector T cells in the lung during early tuberculosis. *Journal of Experimental Medicine* **207**, 1409–1420 (2010).
77. Jasenosky, L. D., Scriba, T. J., Hanekom, W. A. & Goldfeld, A. E. T cells and adaptive immunity to Mycobacterium tuberculosis in humans. *Immunological Reviews* **264**, 74–87 (2015).
78. Kozakiewicz, L. *et al.* B Cells Regulate Neutrophilia during Mycobacterium tuberculosis Infection and BCG Vaccination by Modulating the Interleukin-17 Response. *PLOS Pathogens* **9**, e1003472 (2013).
79. Maglione, P. J., Xu, J. & Chan, J. B Cells Moderate Inflammatory Progression and Enhance Bacterial Containment upon Pulmonary Challenge with Mycobacterium tuberculosis. *The Journal of Immunology* **178**, 7222–7234 (2007).
80. Bénard, A. *et al.* B Cells Producing Type I IFN Modulate Macrophage Polarization in Tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* **197**, 801–813 (2018).
81. Turner, J., Frank, A. A., Brooks, J. V., Gonzalez-Juarrero, M. & Orme, I. M. The

progression of chronic tuberculosis in the mouse does not require the participation of B lymphocytes or interleukin-4. *Experimental Gerontology* **36**, 537–545 (2001).

82. Atzeni, F. *et al.* Infections and Biological Therapy in Patients with Rheumatic Diseases. **18**, 4 (2016).

83. Ulrichs, T. & Kaufmann, S. H. New insights into the function of granulomas in human tuberculosis. *The Journal of Pathology* **208**, 261–269 (2006).

84. Davis, J. M. *et al.* Real-Time Visualization of Mycobacterium-Macrophage Interactions Leading to Initiation of Granuloma Formation in Zebrafish Embryos. *Immunity* **17**, 693–702 (2002).

85. Davis, J. M. & Ramakrishnan, L. The Role of the Granuloma in Expansion and Dissemination of Early Tuberculous Infection. *Cell* **136**, 37–49 (2009).

86. Swaim, L. E. *et al.* Mycobacterium marinum infection of adult zebrafish causes caseating granulomatous tuberculosis and is moderated by adaptive immunity. *Infect. Immun.* **74**, 6108–6117 (2006).

87. Brodin, P. *et al.* High Content Phenotypic Cell-Based Visual Screen Identifies Mycobacterium tuberculosis Acyltrehalose-Containing Glycolipids Involved in Phagosome Remodeling. *PLOS Pathogens* **6**, e1001100 (2010).

88. Deboosère, N. *et al.* LppM impact on the colonization of macrophages by Mycobacterium tuberculosis. *Cell Microbiol* **19**, (2017).

89. Vergne, I., Chua, J. & Deretic, V. Tuberculosis toxin blocking phagosome maturation inhibits a novel Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-PI3K hVPS34 cascade. *J. Exp. Med.* **198**, 653–659 (2003).

90. Vergne, I. *et al.* Mechanism of phagolysosome biogenesis block by viable Mycobacterium tuberculosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 4033–4038 (2005).

91. Beatty, W. L. *et al.* Trafficking and Release of Mycobacterial Lipids from Infected Macrophages. *Traffic* **1**, 235–247 (2000).

92. Rohde, K., Yates, R. M., Purdy, G. E. & Russell, D. G. Mycobacterium tuberculosis and the environment within the phagosome. *Immunological Reviews* **219**, 37–54 (2007).

93. Wong, D., Bach, H., Sun, J., Hmama, Z. & Av-Gay, Y. Mycobacterium tuberculosis protein tyrosine phosphatase (PtpA) excludes host vacuolar-H<sup>+</sup>-ATPase to inhibit phagosome acidification. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 19371–19376 (2011).

94. Simeone, R. *et al.* Phagosomal Rupture by Mycobacterium tuberculosis Results in Toxicity and Host Cell Death. *PLoS Pathog* **8**, (2012).

95. van der Wel, N. *et al.* M. tuberculosis and M. leprae Translocate from the Phagolysosome to the Cytosol in Myeloid Cells. *Cell* **129**, 1287–1298 (2007).

96. Shin, D.-M. *et al.* Mycobacterium tuberculosis Eis Regulates Autophagy, Inflammation, and Cell Death through Redox-dependent Signaling. *PLoS Pathog* **6**, (2010).

97. Manca, C., Paul, S., Barry, C. E., Freedman, V. H. & Kaplan, G. Mycobacterium tuberculosis Catalase and Peroxidase Activities and Resistance to Oxidative Killing in Human Monocytes In Vitro. *Infect Immun* **67**, 74–79 (1999).

98. Jackett, P. S., Aber, V. R. & Lowrie, D. B. Virulence and resistance to superoxide, low pH and hydrogen peroxide among strains of Mycobacterium tuberculosis. *J. Gen. Microbiol.* **104**, 37–45 (1978).

99. Bryk, R., Lima, C. D., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. & Nathan, C. Metabolic Enzymes of Mycobacteria Linked to Antioxidant Defense by a Thioredoxin-Like Protein. *Science* **295**, 1073–1077 (2002).

100. Darwin, K. H. & Nathan, C. F. Role for Nucleotide Excision Repair in Virulence of Mycobacterium tuberculosis. *Infect Immun* **73**, 4581–4587 (2005).

101. Colangeli, R. *et al.* Transcriptional Regulation of Multi-Drug Tolerance and Antibiotic-Induced Responses by the Histone-Like Protein Lsr2 in *M. tuberculosis*. *PLoS Pathogens* **3**, e87 (2007).
102. Jayakumar, D., Jacobs, W. R. & Narayanan, S. Protein kinase E of *Mycobacterium tuberculosis* has a role in the nitric oxide stress response and apoptosis in a human macrophage model of infection. *Cell. Microbiol.* **10**, 365–374 (2008).
103. Danelishvili, L., Everman, J. L., McNamara, M. J. & Bermudez, L. E. Inhibition of the Plasma-Membrane-Associated Serine Protease Cathepsin G by *Mycobacterium tuberculosis* Rv3364c Suppresses Caspase-1 and Pyroptosis in Macrophages. *Front Microbiol* **2**, (2012).
104. Miller, J. L., Velmurugan, K., Cowan, M. J. & Briken, V. The Type I NADH Dehydrogenase of *Mycobacterium tuberculosis* Counters Phagosomal NOX2 Activity to Inhibit TNF- $\alpha$ -Mediated Host Cell Apoptosis. *PLoS Pathog* **6**, (2010).
105. Choi, H.-H. *et al.* Endoplasmic reticulum stress response is involved in *Mycobacterium tuberculosis* protein ESAT-6-mediated apoptosis. *FEBS Letters* **584**, 2445–2454 (2010).
106. Dallenga, T. *et al.* *M. tuberculosis*-Induced Necrosis of Infected Neutrophils Promotes Bacterial Growth Following Phagocytosis by Macrophages. *Cell Host Microbe* **22**, 519-530.e3 (2017).
107. Pajuelo, D. *et al.* NAD<sup>+</sup> Depletion Triggers Macrophage Necroptosis, a Cell Death Pathway Exploited by *Mycobacterium tuberculosis*. *Cell Reports* **24**, 429–440 (2018).
108. Shah, S. *et al.* Cutting edge: *Mycobacterium tuberculosis* but not nonvirulent mycobacteria inhibits IFN- $\beta$  and AIM2 inflammasome-dependent IL-1 $\beta$  production via its ESX-1 secretion system. *J. Immunol.* **191**, 3514–3518 (2013).
109. Novoa-Aponte, L. *et al.* In silico identification and characterization of the ion transport specificity for P-type ATPases in the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *BMC Struct. Biol.* **12**, 25 (2012).
110. Wolschendorf, F. *et al.* Copper resistance is essential for virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **108**, 1621–1626 (2011).
111. Botella, H. *et al.* Mycobacterial P1-Type ATPases Mediate Resistance to Zinc Poisoning in Human Macrophages. *Cell Host & Microbe* **10**, 248–259 (2011).
112. Gröschel, M. I., Sayes, F., Simeone, R., Majlessi, L. & Brosch, R. ESX secretion systems: mycobacterial evolution to counter host immunity. *Nature Reviews Microbiology* **14**, 677–691 (2016).
113. Ganguly, N. *et al.* *Mycobacterium tuberculosis* secretory proteins CFP-10, ESAT-6 and the CFP10:ESAT6 complex inhibit lipopolysaccharide-induced NF- $\kappa$ B transactivation by downregulation of reactive oxidative species (ROS) production. *Immunology & Cell Biology* **86**, 98–106 (2008).
114. Park, H.-D. *et al.* Rv3133c/dosR is a transcription factor that mediates the hypoxic response of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol* **48**, 833–843 (2003).
115. Schnappinger, D. *et al.* Transcriptional Adaptation of *Mycobacterium tuberculosis* within Macrophages: Insights into the Phagosomal Environment. *Journal of Experimental Medicine* **198**, 693–704 (2003).
116. Galagan, J. E. *et al.* The *Mycobacterium tuberculosis* regulatory network and hypoxia. *Nature* **499**, 178–183 (2013).
117. Honaker, R. W., Dhiman, R. K., Narayanasamy, P., Crick, D. C. & Voskuil, M. I. DosS responds to a reduced electron transport system to induce the *Mycobacterium tuberculosis* DosR regulon. *J. Bacteriol.* **192**, 6447–6455 (2010).
118. Kumar, A., Toledo, J. C., Patel, R. P., Lancaster, J. R. & Steyn, A. J. C. *Mycobacterium*

tuberculosis DosS is a redox sensor and DosT is a hypoxia sensor. *PNAS* **104**, 11568–11573 (2007).

119. Converse, P. J. *et al.* Role of the dosR-dosS Two-Component Regulatory System in Mycobacterium tuberculosis Virulence in Three Animal Models. *Infection and Immunity* **77**, 1230–1237 (2009).

120. Hypoxia: a window into Mycobacterium tuberculosis latency - Rustad - 2009 - Cellular Microbiology - Wiley Online Library. Available at: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1462-5822.2009.01325.x>. (Accessed: 9th July 2019)

121. Gengenbacher, M. & Kaufmann, S. H. E. Mycobacterium tuberculosis: Success through dormancy. *FEMS Microbiol Rev* **36**, 514–532 (2012).

122. Hett, E. C., Chao, M. C. & Rubin, E. J. Interaction and modulation of two antagonistic cell wall enzymes of mycobacteria. *PLoS Pathog.* **6**, e1001020 (2010).

123. Leistikow, R. L. *et al.* The Mycobacterium tuberculosis DosR regulon assists in metabolic homeostasis and enables rapid recovery from nonrespiring dormancy. *J. Bacteriol.* **192**, 1662–1670 (2010).

124. McGillivray, A., Golden, N. A. & Kaushal, D. The Mycobacterium tuberculosis Clp gene regulator is required for in vitro reactivation from hypoxia-induced dormancy. *J. Biol. Chem.* **290**, 2351–2367 (2015).

125. Kasik, J. E. & Peacham, L. Properties of  $\beta$ -lactamases produced by three species of mycobacteria. *Biochem J* **107**, 675–682 (1968).

126. Gao, L.-Y. *et al.* Requirement for kasB in Mycobacterium mycolic acid biosynthesis, cell wall impermeability and intracellular survival: implications for therapy. *Molecular Microbiology* **49**, 1547–1563 (2003).

127. Singh, A., Jain, S., Gupta, S., Das, T. & Tyagi, A. K. mymA operon of Mycobacterium tuberculosis: its regulation and importance in the cell envelope. *FEMS Microbiology Letters* **227**, 53–63 (2003).

128. Quinting, B. *et al.* Contribution of beta-lactamase production to the resistance of mycobacteria to beta-lactam antibiotics. *FEBS Lett.* **406**, 275–278 (1997).

129. Brennan, P. J. & Nikaido, H. The envelope of mycobacteria. *Annu. Rev. Biochem.* **64**, 29–63 (1995).

130. Buriánková, K. *et al.* Molecular basis of intrinsic macrolide resistance in the Mycobacterium tuberculosis complex. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**, 143–150 (2004).

131. Viveiros, M. *et al.* Inhibitors of mycobacterial efflux pumps as potential boosters for anti-tubercular drugs. *Expert Rev Anti Infect Ther* **10**, 983–998 (2012).

132. Colangeli, R. *et al.* The Mycobacterium tuberculosis iniA gene is essential for activity of an efflux pump that confers drug tolerance to both isoniazid and ethambutol. *Molecular Microbiology* **55**, 1829–1840 (2005).

133. Kjellsson, M. C. *et al.* Pharmacokinetic evaluation of the penetration of antituberculosis agents in rabbit pulmonary lesions. *Antimicrob. Agents Chemother.* **56**, 446–457 (2012).

134. Mattila, J. T. *et al.* Microenvironments in Tuberculous Granulomas Are Delineated by Distinct Populations of Macrophage Subsets and Expression of Nitric Oxide Synthase and Arginase Isoforms. *The Journal of Immunology* **191**, 773–784 (2013).

135. Pathak, S. K. *et al.* Direct extracellular interaction between the early secreted antigen ESAT-6 of Mycobacterium tuberculosis and TLR2 inhibits TLR signaling in macrophages. *Nature Immunology* **8**, 610–618 (2007).

136. Schreiber, T. *et al.* Autocrine IL-10 induces hallmarks of alternative activation in

macrophages and suppresses anti-tuberculosis effector mechanisms without compromising T cell immunity. *J Immunol* **183**, 1301–1312 (2009).

137. Lastrucci, C. *et al.* Tuberculosis is associated with expansion of a motile, permissive and immunomodulatory CD16<sup>+</sup> monocyte population via the IL-10/STAT3 axis. *Cell Research* **25**, 1333–1351 (2015).

138. Cougoule, C., Hoshino, S., Dart, A., Lim, J. & Caron, E. Dissociation of Recruitment and Activation of the Small G-protein Rac during Fcγ Receptor-mediated Phagocytosis. *J. Biol. Chem.* **281**, 8756–8764 (2006).

139. Flannagan, R. S., Cosío, G. & Grinstein, S. Antimicrobial mechanisms of phagocytes and bacterial evasion strategies. *Nature Reviews Microbiology* **7**, 355–366 (2009).

140. Queval, C. J. *et al.* Mycobacterium tuberculosis Controls Phagosomal Acidification by Targeting CISH-Mediated Signaling. *Cell Reports* **20**, 3188–3198 (2017).

141. Intracellular growth of Mycobacterium tuberculosis after macrophage cell death leads to serial killing of host cells. - PubMed - NCBI. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28130921/>. (Accessed: 11th July 2019)

142. Rohde, K. H., Abramovitch, R. B. & Russell, D. G. Mycobacterium tuberculosis Invasion of Macrophages: Linking Bacterial Gene Expression to Environmental Cues. *Cell Host & Microbe* **2**, 352–364 (2007).

143. Vandal, O. H. *et al.* Acid-Susceptible Mutants of Mycobacterium tuberculosis Share Hypersusceptibility to Cell Wall and Oxidative Stress and to the Host Environment. *Journal of Bacteriology* **191**, 625–631 (2009).

144. Tran, S. L. *et al.* Mutants of Mycobacterium smegmatis unable to grow at acidic pH in the presence of the protonophore carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone. *Microbiology* **151**, 665–672 (2005).

145. Jiang, P. & Mizushima, N. Autophagy and human diseases. *Cell Research* **24**, 69–79 (2014).

146. Huang, J. & Brumell, J. H. Bacteria-autophagy interplay: a battle for survival. *Nat. Rev. Microbiol.* **12**, 101–114 (2014).

147. Shibutani, S. T. & Yoshimori, T. A current perspective of autophagosome biogenesis. *Cell Res.* **24**, 58–68 (2014).

148. Nagabhushanam, V. *et al.* Innate Inhibition of Adaptive Immunity: Mycobacterium tuberculosis-Induced IL-6 Inhibits Macrophage Responses to IFN-γ. *The Journal of Immunology* **171**, 4750–4757 (2003).

149. Duan, L., Yi, M., Chen, J., Li, S. & Chen, W. Mycobacterium tuberculosis EIS gene inhibits macrophage autophagy through up-regulation of IL-10 by increasing the acetylation of histone H3. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **473**, 1229–1234 (2016).

150. Liu, F. *et al.* MicroRNA-27a controls the intracellular survival of Mycobacterium tuberculosis by regulating calcium-associated autophagy. *Nature Communications* **9**, 4295 (2018).

151. MacMicking, J. D. *et al.* Identification of nitric oxide synthase as a protective locus against tuberculosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 5243–5248 (1997).

152. Cunningham-Bussel, A., Bange, F. C. & Nathan, C. F. Nitrite impacts the survival of Mycobacterium tuberculosis in response to isoniazid and hydrogen peroxide. *Microbiologyopen* **2**, 901–911 (2013).

153. Choi, H.-S., Rai, P. R., Chu, H. W., Cool, C. & Chan, E. D. Analysis of nitric oxide synthase and nitrotyrosine expression in human pulmonary tuberculosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **166**, 178–186 (2002).

154. Yang, C.-S., Yuk, J.-M. & Jo, E.-K. The Role of Nitric Oxide in Mycobacterial Infections. *Immune Netw* **9**, 46–52 (2009).
155. Flesch, I. E. & Kaufmann, S. H. Mechanisms involved in mycobacterial growth inhibition by gamma interferon-activated bone marrow macrophages: role of reactive nitrogen intermediates. *Infect Immun* **59**, 3213–3218 (1991).
156. Kuo, H.-P. *et al.* Nitric Oxide Modulates Interleukin-1  $\beta$  and Tumor Necrosis Factor-  $\alpha$  Synthesis by Alveolar Macrophages in Pulmonary Tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* **161**, 192–199 (2000).
157. Nunes, P., Demarex, N. & Dinauer, M. C. Regulation of the NADPH oxidase and associated ion fluxes during phagocytosis. *Traffic* **14**, 1118–1131 (2013).
158. Killing of virulent Mycobacterium tuberculosis by reactive nitrogen intermediates produced by activated murine macrophages. *J Exp Med* **175**, 1111–1122 (1992).
159. Dutta, N. K. *et al.* The Stress-Response Factor SigH Modulates the Interaction between Mycobacterium tuberculosis and Host Phagocytes. *PLoS One* **7**, (2012).
160. Colangeli, R. *et al.* The multifunctional histone-like protein Lsr2 protects mycobacteria against reactive oxygen intermediates. *PNAS* **106**, 4414–4418 (2009).
161. Le Moigne, V. *et al.* Lsr2 Is an Important Determinant of Intracellular Growth and Virulence in Mycobacterium abscessus. *Front. Microbiol.* **10**, (2019).
162. Lee, J., Hartman, M. & Kornfeld, H. Macrophage Apoptosis in Tuberculosis. *Yonsei Med J* **50**, 1–11 (2009).
163. Lamkanfi, M. & Dixit, V. M. Manipulation of host cell death pathways during microbial infections. *Cell Host Microbe* **8**, 44–54 (2010).
164. Taylor, R. C., Cullen, S. P. & Martin, S. J. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **9**, 231–241 (2008).
165. López, M. *et al.* The 19-kDa Mycobacterium tuberculosis protein induces macrophage apoptosis through Toll-like receptor-2. *J. Immunol.* **170**, 2409–2416 (2003).
166. Thoma-Uszynski, S. *et al.* Induction of direct antimicrobial activity through mammalian toll-like receptors. *Science* **291**, 1544–1547 (2001).
167. Schaible, U. E. *et al.* Apoptosis facilitates antigen presentation to T lymphocytes through MHC-I and CD1 in tuberculosis. *Nature Medicine* **9**, 1039 (2003).
168. Divangahi, M. *et al.* Mycobacterium tuberculosis evades macrophage defenses by inhibiting plasma membrane repair. *Nat Immunol* **10**, 899–906 (2009).
169. Lerner, T. R. *et al.* Mycobacterium tuberculosis replicates within necrotic human macrophages. *J. Cell Biol.* **216**, 583–594 (2017).
170. Berghe, T. V., Linkermann, A., Jouan-Lanhouet, S., Walczak, H. & Vandenabeele, P. Regulated necrosis: the expanding network of non-apoptotic cell death pathways. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **15**, 135–147 (2014).
171. Meunier, E. & Neyrolles, O. Die another way: Ferroptosis drives tuberculosis pathology. *Journal of Experimental Medicine* **216**, 471–473 (2019).
172. Amaral, E. P. *et al.* A major role for ferroptosis in Mycobacterium tuberculosis-induced cell death and tissue necrosis. *Journal of Experimental Medicine* **216**, 556–570 (2019).
173. Liu, X. & Lieberman, J. Chapter Three - A Mechanistic Understanding of Pyroptosis: The Fiery Death Triggered by Invasive Infection. in *Advances in Immunology* (ed. Alt, F. W.) **135**, 81–117 (Academic Press, 2017).
174. McIlwain, D. R., Berger, T. & Mak, T. W. Caspase Functions in Cell Death and Disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **5**, a008656 (2013).
175. Dinarello, C., Novick, D., Kim, S. & Kaplanski, G. Interleukin-18 and IL-18 Binding

Protein. *Front. Immunol.* **4**, (2013).

176. Veerdonk, F. L. van de, Netea, M. G., Dinarello, C. A. & Joosten, L. A. B. Inflammasome activation and IL-1 $\beta$  and IL-18 processing during infection. *Trends in Immunology* **32**, 110–116 (2011).
177. Mayer-Barber, K. D. *et al.* Cutting Edge: Caspase-1 Independent IL-1 $\beta$  Production Is Critical for Host Resistance to Mycobacterium tuberculosis and Does Not Require TLR Signaling In Vivo. *J Immunol* **184**, 3326–3330 (2010).
178. Sugawara, I. *et al.* Role of Interleukin-18 (IL-18) in Mycobacterial Infection in IL-18-Gene-Disrupted Mice. *Infect Immun* **67**, 2585–2589 (1999).
179. Eklund, D. *et al.* Human Gene Variants Linked to Enhanced NLRP3 Activity Limit Intramacrophage Growth of Mycobacterium tuberculosis. *J Infect Dis* **209**, 749–753 (2014).
180. Pétrilli, V. *et al.* Activation of the NALP3 inflammasome is triggered by low intracellular potassium concentration. *Cell Death and Differentiation* **14**, 1583–1589 (2007).
181. Hornung, V. *et al.* Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization. *Nature Immunology* **9**, 847–856 (2008).
182. Heid, M. E. *et al.* Mitochondrial Reactive Oxygen Species Induces NLRP3-Dependent Lysosomal Damage and Inflammasome Activation. *The Journal of Immunology* **191**, 5230–5238 (2013).
183. Hornung, V. *et al.* AIM2 recognizes cytosolic dsDNA and forms a caspase-1-activating inflammasome with ASC. *Nature* **458**, 514–518 (2009).
184. Saiga, H. *et al.* Critical role of AIM2 in Mycobacterium tuberculosis infection. *Int Immunol* **24**, 637–644 (2012).
185. Niederweis, M., Wolschendorf, F., Mitra, A. & Neyrolles, O. Mycobacteria, Metals, and the Macrophage. *Immunol Rev* **264**, 249–263 (2015).
186. Ward, S. K., Hoyer, E. A. & Talaat, A. M. The global responses of Mycobacterium tuberculosis to physiological levels of copper. *J. Bacteriol.* **190**, 2939–2946 (2008).
187. Brighenti, S., Bergman, P. & Martineau, A. R. Vitamin D and tuberculosis: where next? *Journal of Internal Medicine* **284**, 145–162 (2018).
188. Liu, P. T. *et al.* Toll-Like Receptor Triggering of a Vitamin D-Mediated Human Antimicrobial Response. *Science* **311**, 1770–1773 (2006).
189. Fabri, M. *et al.* Vitamin D Is Required for IFN- $\gamma$ -Mediated Antimicrobial Activity of Human Macrophages. *Sci Transl Med* **3**, 104ra102 (2011).
190. Shin, D.-M. & Jo, E.-K. Antimicrobial Peptides in Innate Immunity against Mycobacteria. *Immune Netw* **11**, 245–252 (2011).
191. Belkaid, Y. & Hand, T. W. Role of the Microbiota in Immunity and Inflammation. *Cell* **157**, 121–141 (2014).
192. Kamada, N., Seo, S.-U., Chen, G. Y. & Núñez, G. Role of the gut microbiota in immunity and inflammatory disease. *Nature Reviews Immunology* **13**, 321–335 (2013).
193. Ivanov, I. I. *et al.* Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria. *Cell* **139**, 485–498 (2009).
194. Atarashi, K. *et al.* Induction of Colonic Regulatory T Cells by Indigenous Clostridium Species. *Science* **331**, 337–341 (2011).
195. Petersson, J. *et al.* Importance and regulation of the colonic mucus barrier in a mouse model of colitis. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **300**, G327–333 (2011).
196. Vaishnava, S. *et al.* The Antibacterial Lectin RegIII $\gamma$  Promotes the Spatial Segregation of Microbiota and Host in the Intestine. *Science* **334**, 255–258 (2011).
197. Satoh-Takayama, N. *et al.* Microbial flora drives interleukin 22 production in intestinal

- NKp46+ cells that provide innate mucosal immune defense. *Immunity* **29**, 958–970 (2008).
198. Franchi, L. *et al.* NLRC4-driven production of IL-1 $\beta$  discriminates between pathogenic and commensal bacteria and promotes host intestinal defense. *Nature Immunology* **13**, 449–456 (2012).
199. Segal, L. N. *et al.* Enrichment of the lung microbiome with oral taxa is associated with lung inflammation of a Th17 phenotype. *Nat Microbiol* **1**, 16031 (2016).
200. Budden, K. F. *et al.* Emerging pathogenic links between microbiota and the gut–lung axis. *Nature Reviews Microbiology* **15**, 55–63 (2017).
201. Maji, A. *et al.* Gut microbiome contributes to impairment of immunity in pulmonary tuberculosis patients by alteration of butyrate and propionate producers. *Environmental Microbiology* **20**, 402–419 (2018).
202. Luo, M. *et al.* Alteration of Gut Microbiota in Patients with Pulmonary Tuberculosis. *Front. Physiol.* **8**, (2017).
203. Wu, J. *et al.* Sputum Microbiota Associated with New, Recurrent and Treatment Failure Tuberculosis. *PLOS ONE* **8**, e83445 (2013).
204. Dumas, A. *et al.* The Host Microbiota Contributes to Early Protection Against Lung Colonization by Mycobacterium tuberculosis. *Front. Immunol.* **9**, (2018).
205. Wiperman, M. F. *et al.* Antibiotic treatment for Tuberculosis induces a profound dysbiosis of the microbiome that persists long after therapy is completed. *Scientific Reports* **7**, 10767 (2017).
206. Namasivayam, S. *et al.* Longitudinal profiling reveals a persistent intestinal dysbiosis triggered by conventional anti-tuberculosis therapy. *Microbiome* **5**, 71 (2017).
207. Tan, T. G. *et al.* Identifying species of symbiont bacteria from the human gut that, alone, can induce intestinal Th17 cells in mice. *PNAS* **113**, E8141–E8150 (2016).
208. Shen, Y. *et al.* Outer Membrane Vesicles of a Human Commensal Mediate Immune Regulation and Disease Protection. *Cell Host & Microbe* **12**, 509–520 (2012).
209. Kim, J.-J. *et al.* Host Cell Autophagy Activated by Antibiotics Is Required for Their Effective Antimycobacterial Drug Action. *Cell Host & Microbe* **11**, 457–468 (2012).
210. Gil, D., Garcia, L. F. & Rojas, M. Modulation of macrophage apoptosis by antimycobacterial therapy: physiological role of apoptosis in the control of Mycobacterium tuberculosis. *Toxicology and Applied Pharmacology* **190**, 111–119 (2003).
211. Yoshimura, T. *et al.* Immunomodulatory Action of Levofloxacin on Cytokine Production by Human Peripheral Blood Mononuclear Cells. *CHE* **42**, 459–464 (1996).
212. Badari, M. S., Elgandy, S. G., Mohamed, A. S. & Hassan, A. T. Immunomodulatory Effects of Levofloxacin on Patients with Pneumonia in Assiut University Hospitals. *Egypt J Immunol* **22**, 79–85 (2015).
213. Bode, C. *et al.* Linezolid, vancomycin and daptomycin modulate cytokine production, Toll-like receptors and phagocytosis in a human in vitro model of sepsis. *J. Antibiot.* **68**, 485–490 (2015).
214. Dalhoff, A. Immunomodulatory activities of fluoroquinolones. *Infection* **33 Suppl 2**, 55–70 (2005).
215. Weiss, T. *et al.* Anti-Inflammatory Effects of Moxifloxacin on Activated Human Monocytic Cells: Inhibition of NF- $\kappa$ B and Mitogen-Activated Protein Kinase Activation and of Synthesis of Proinflammatory Cytokines. *Antimicrob Agents Chemother* **48**, 1974–1982 (2004).
216. Qiu, Z. *et al.* Bidirectional effects of moxifloxacin on the pro-inflammatory response in lipopolysaccharide-stimulated mouse peritoneal macrophages. *Mol Med Rep* **18**, 5399–5408 (2018).

217. Manca, C. *et al.* Host Targeted Activity of Pyrazinamide in Mycobacterium tuberculosis Infection. *PLoS One* **8**, (2013).
218. Mlambo, G. & Sigola, L. B. Rifampicin and dexamethasone have similar effects on macrophage phagocytosis of zymosan, but differ in their effects on nitrite and TNF- $\alpha$  production. *International Immunopharmacology* **3**, 513–522 (2003).
219. Ziglam, H. M., Daniels, I. & Finch, R. G. Immunomodulating activity of rifampicin. *J Chemother* **16**, 357–361 (2004).
220. Nielsen, H. Antibiotics and human monocyte function. I. Chemotaxis. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand B* **95**, 293–296 (1987).
221. Kim, S. K. *et al.* Rifampicin Inhibits the LPS-induced Expression of Toll-like Receptor 2 via the Suppression of NF- $\kappa$ B DNA-binding Activity in RAW 264.7 Cells. *Korean J Physiol Pharmacol* **13**, 475–482 (2009).
222. Tousif, S. *et al.* Isoniazid Induces Apoptosis Of Activated CD4+ T Cells IMPLICATIONS FOR POST-THERAPY TUBERCULOSIS REACTIVATION AND REINFECTION. *J. Biol. Chem.* **289**, 30190–30195 (2014).
223. Pahlevan, A. A., Wright, D. J. M., Bradley, L., Smith, C. & Foxwell, B. M. J. Potential of rifamides to inhibit TNF-induced NF-kappaB activation. *J. Antimicrob. Chemother.* **49**, 531–534 (2002).
224. Pascussj, J. M., ANt, J. C. M. & Maurel, P. The antibiotic rifampicin is a nonsteroidal ligand and activator of the human glucocorticoid receptor. *NATURE MEDICINE* **4**, 5 (1998).
225. Bode, C. *et al.* Antibiotics regulate the immune response in both presence and absence of lipopolysaccharide through modulation of Toll-like receptors, cytokine production and phagocytosis in vitro. *International Immunopharmacology* **18**, 27–34 (2014).
226. Diacon, A. H. *et al.* Multidrug-Resistant Tuberculosis and Culture Conversion with Bedaquiline. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa1313865> (2014). doi:10.1056/NEJMoa1313865
227. Pym, A. S. *et al.* Bedaquiline in the treatment of multidrug- and extensively drug-resistant tuberculosis. *European Respiratory Journal* **47**, 564–574 (2016).
228. Al, L. M. *et.* Outcomes of Bedaquiline Treatment in Patients with Multidrug-Resistant Tuberculosis - Volume 25, Number 5—May 2019 - Emerging Infectious Diseases journal - CDC. doi:10.3201/eid2505.181823
229. Koul, A. *et al.* Diarylquinolines target subunit c of mycobacterial ATP synthase. *Nature Chemical Biology* **3**, 323–324 (2007).
230. Huitric, E. *et al.* Rates and Mechanisms of Resistance Development in Mycobacterium tuberculosis to a Novel Diarylquinoline ATP Synthase Inhibitor. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **54**, 1022–1028 (2010).
231. Andries, K. *et al.* Acquired Resistance of Mycobacterium tuberculosis to Bedaquiline. *PLOS ONE* **9**, e102135 (2014).
232. Almeida, D. *et al.* Mutations in pepQ Confer Low-Level Resistance to Bedaquiline and Clofazimine in Mycobacterium tuberculosis. *Antimicrob Agents Chemother* **60**, 4590–4599 (2016).
233. van Heeswijk, R. P. G., Dannemann, B. & Hoetelmans, R. M. W. Bedaquiline: a review of human pharmacokinetics and drug–drug interactions. *J Antimicrob Chemother* **69**, 2310–2318 (2014).
234. Rouan, M.-C. *et al.* Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of TMC207 and Its N-Desmethyl Metabolite in a Murine Model of Tuberculosis. *Antimicrob Agents Chemother* **56**, 1444–1451 (2012).

235. Irwin, S. M. *et al.* Bedaquiline and Pyrazinamide Treatment Responses Are Affected by Pulmonary Lesion Heterogeneity in Mycobacterium tuberculosis Infected C3HeB/FeJ Mice. *ACS Infect Dis* **2**, 251–267 (2016).
236. Diacon, A. H. *et al.* Randomized pilot trial of eight weeks of bedaquiline (TMC207) treatment for multidrug-resistant tuberculosis: long-term outcome, tolerability, and effect on emergence of drug resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **56**, 3271–3276 (2012).
237. Perrineau, S. *et al.* Long-term plasma pharmacokinetics of bedaquiline for multidrug- and extensively drug-resistant tuberculosis. (2019). doi:info:doi/10.5588/ijtld.18.0042
238. Diskin, C. & Pålsson-McDermott, E. M. Metabolic Modulation in Macrophage Effector Function. *Front Immunol* **9**, (2018).
239. Levin, R. *et al.* Multiphasic dynamics of phosphatidylinositol 4-phosphate during phagocytosis. *Mol. Biol. Cell* **28**, 128–140 (2017).
240. De Matteis, M. A., Wilson, C. & D'Angelo, G. Phosphatidylinositol-4-phosphate: the Golgi and beyond. *Bioessays* **35**, 612–622 (2013).
241. Yu, L., Chen, Y. & Tooze, S. A. Autophagy pathway: Cellular and molecular mechanisms. *Autophagy* **14**, 207–215 (2018).
242. Settembre, C. *et al.* TFEB Links Autophagy to Lysosomal Biogenesis. *Science* **332**, 1429–1433 (2011).
243. Medina, D. L. *et al.* Lysosomal calcium signalling regulates autophagy through calcineurin and TFEB. *Nature Cell Biology* **17**, 288–299 (2015).
244. Vater, M. *et al.* New insights into the intracellular distribution pattern of cationic amphiphilic drugs. *Scientific Reports* **7**, 44277 (2017).
245. Kazmi, F. *et al.* Lysosomal Sequestration (Trapping) of Lipophilic Amine (Cationic Amphiphilic) Drugs in Immortalized Human Hepatocytes (Fa2N-4 Cells). *Drug Metab Dispos* **41**, 897–905 (2013).
246. Greenwood, D. J. *et al.* Subcellular antibiotic visualization reveals a dynamic drug reservoir in infected macrophages. *Science* **364**, 1279–1282 (2019).
247. Peyron, P. *et al.* Foamy macrophages from tuberculous patients' granulomas constitute a nutrient-rich reservoir for M. tuberculosis persistence. *PLoS Pathog.* **4**, e1000204 (2008).
248. Lamming, D. W. & Bar-Peled, L. Lysosome: The metabolic signaling hub. *Traffic* **20**, 27–38 (2019).
249. Saxton, R. A. & Sabatini, D. M. mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. *Cell* **168**, 960–976 (2017).
250. Haagsma, A. C. *et al.* Selectivity of TMC207 towards Mycobacterial ATP Synthase Compared with That towards the Eukaryotic Homologue. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **53**, 1290–1292 (2009).
251. Fiorillo, M. *et al.* Bedaquiline, an FDA-approved antibiotic, inhibits mitochondrial function and potently blocks the proliferative expansion of stem-like cancer cells (CSCs). *Aging (Albany NY)* **8**, 1593–1606 (2016).
252. Belosludtsev, K. N. *et al.* Effect of bedaquiline on the functions of rat liver mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1861**, 288–297 (2019).

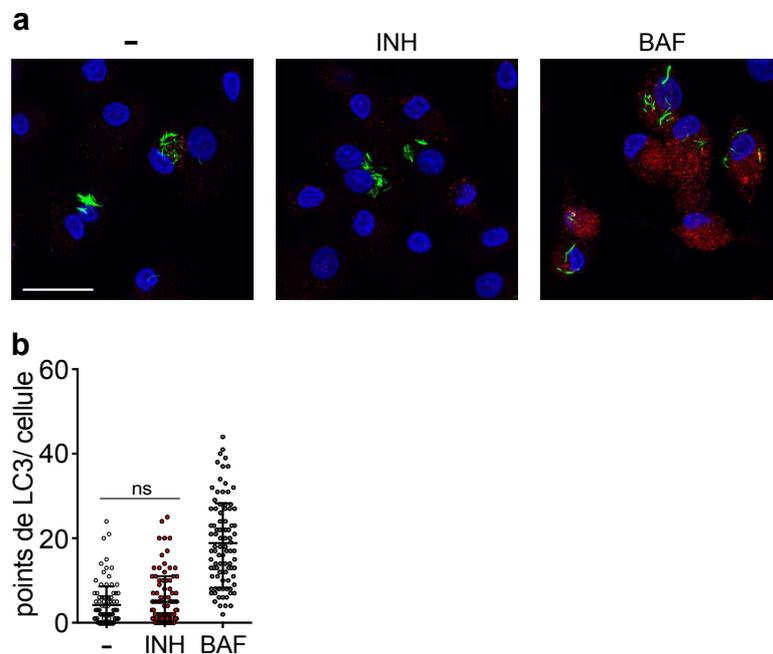
## ANNEXES

---

I. ARTICLE EN COLLABORATION – COYA *ET AL.* (2019). *JOURNAL OF NANOBIO TECHNOLOGY.*

*Élément sous droit, diffusion non autorisée*

## II. L'ISONIAZIDE N'INDUIT PAS L'AUTOPHAGIE DANS LES MACROPHAGES HUMAINS INFECTES PAR *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*



**Annexe 2. L'INH n'induit pas l'autophagie dans les macrophages humains infectés par MTB.** Les macrophages humains ont été infectés avec MTB et traités avec de l'INH (10 µg/mL) ou de la bafilomycine (BAF ; 100 nM) durant 24h. **a.** Détection par immunofluorescence indirecte de la protéine LC3 (rouge) dans les macrophages humains infectés par MTB (vert) et traités par l'INH (échelle : 30 µm). **b.** Détermination du nombre de point LC3 par cellule (one-way ANOVA test). Les barres d'erreurs représentent la moyenne de la déviation standard. ns : non significatif.

## **IMPACT DES ANTIBIOTIQUES SUR LA REPOSE DES MACROPHAGES HUMAINS : L'EXEMPLE DE LA BEDAQUILINE**

Les antibiotiques sont largement utilisés dans le traitement des infections bactériennes. Connus pour leur activité sur les bactéries, les antibiotiques peuvent également interférer avec le système immunitaire de l'hôte. L'objectif de cette thèse a été d'étudier l'impact de la bédaquiline (BDQ), un récent anti-tuberculeux, sur la réponse des macrophages humains. L'analyse de l'expression des gènes a pu révéler que la BDQ reprogramme les macrophages en augmentant l'expression des gènes liée aux fonctions bactéricides. Nous avons découvert que l'expression de 1 495 gènes étaient différentiellement exprimées dans les macrophages infectés par *Mycobacterium tuberculosis* et traités par la BDQ, avec une régulation positive des gènes impliqués dans le métabolisme et l'activation des lysosomes et leur biogénèse. Le traitement par la BDQ a permis d'activer divers mécanismes de défense antimicrobiens, notamment la production d'oxyde nitrique, la fusion phagosome-lysosome et l'autophagie. Ces effets sont associés à l'activation du facteur de transcription EB, impliqué dans l'expression des gènes lysosomaux, entraînant une diminution de la survie intracellulaire de différentes espèces bactériennes naturellement résistante à la BDQ. Ainsi, la BDQ pourrait être utilisée comme composé HDT (*host-directed therapy*) contre les infections bactériennes.

**Mots clefs:** Immunité innée, infection bactérienne, tuberculose, antibiotique, bédaquiline, macrophage, lysosome, TFEB

## **ANTIBIOTICS IMPACT ON HUMAN MACROPHAGES RESPONSE: BEDAQUILINE CASE**

Antibiotics are widely used in the treatment of bacterial infections. Although known for their microbicidal activity, antibiotics may also interfere with the host's immune system. The aim of this thesis is to investigate the impact of a new anti-TB drug, bedaquiline, on the innate immune response of human macrophages. Genome-wide gene expression analysis revealed that BDQ reprogrammed macrophages into potent bactericidal phagocytes. We found that 1,495 genes were differentially expressed in *M. tuberculosis*-infected macrophages incubated with the drug, with an over-representation of genes involved in metabolism, lysosome biogenesis and activation. BDQ treatment triggered a variety of antimicrobial defense mechanisms, including nitric oxide production, phagosome-lysosome fusion, and autophagy. These effects were associated with activation of transcription factor EB (TFEB), involved in the transcription of lysosomal genes, resulting in enhanced intracellular killing of different bacterial species that were naturally insensitive to BDQ. Thus, BDQ could be used as a host-directed therapy against a wide range of bacterial infections.

**Keywords:** Innate immunity, bacterial infection, bacteria, tuberculosis, antibiotic, bedaquiline, macrophage, lysosome, TFEB

Liste de tous les éléments retirés de la version complète faute d'en détenir les droits :

**Page 8** : Figure 1. Estimation de l'incidence de la TB dans le monde en 2017 (OMS, rapport 2018).

**Page 26** : Figure 4. Transmission et pathologie de la tuberculose (adaptée de M. Gengenbacher & S.H.E Kaufmann, FEMS Microbiol Rev. 2012).

**Page 31** : Figure 5. Cycle de vie de *Mycobacterium tuberculosis* au sein de son hôte associé à la formation de granulomes (adaptée de C.J Cambier et al., Cell. 2014).

**Page 33** : Figure 6. Notion d'équilibre au sein du granulome pour contrôler la réplication de *Mycobacterium tuberculosis* (adaptée de AM. Cadena et al., Nat Rev Immunol. 2017).

**Page 61** : Figure 9. Imagerie MALDI-MS MS au cours du temps de la BDQ et du métabolite M2 chez les souris BALB/c après une dose orale de 25 mg/kg de BDQ. Les lésions non nécrotiques sont entourées en blanc. Une section du poumon a été marquée par coloration à l'hématoxyline et à l'éosine (HE) pour comparaison (Résultats obtenus de SM. Irwin et al., ACS Infect Dis, 2016).

**Page 61** : Figure 10. Imagerie MALDI-MS MS au cours du temps de la BDQ et du métabolite M2 chez les souris C3HeB/FeJ après une dose orale de 25 mg/kg de BDQ. Les lésions nécrotiques caséux sont entourées en blanc. Une section du poumon a été marquée par coloration à l'hématoxyline et à l'éosine (HE) pour comparaison (Résultats obtenus de SM. Irwin et al., ACS Infect Dis, 2016).

**Page 116-130** : Article scientifique

Coya, J.M., De Matteis, L., Giraud-Gatineau, A., Biton, A., Serrano-Sevilla, I., Danckaert, A., Dillies, M.A., Gicquel, B., De la Fuente, J.M., and Tailleux, L. (2019). Tri-mannose grafting of chitosan nanocarriers remodels the macrophage response to bacterial infection. J Nanobiotechnology. 17(1), 15. DOI: 10.1186/s12951-018-0439-x.