

LE BACILLE DE LA TUBERCULOSE : ÉVOLUTION, MÉTABOLISME ET VIRULENCE

Par Olivier NEYROLLES¹

Loin d'être une maladie du passé, comme on le pense trop souvent, la tuberculose continue de poser, malgré les progrès de la science et de la médecine, des défis considérables en matière de santé publique, surtout dans les pays en développement. En 2022, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a rapporté que 10,6 millions de personnes ont contracté la maladie et 1,1 million en sont décédées². La tuberculose est une maladie infectieuse chronique causée par le bacille (bactérie) *Mycobacterium tuberculosis*. En prenant l'exemple du rôle qu'ont pu jouer les transferts horizontaux anciens de gènes dans l'émergence du bacille tuberculeux comme pathogène majeur de l'homme, nous montrerons ici comment une meilleure compréhension de *M. tuberculosis*, de son métabolisme, de sa virulence et de son évolution depuis une espèce le plus probablement environnementale et inoffensive vers un pathogène redoutable pour l'homme, peut aider au développement de nouvelles stratégies préventives et thérapeutiques pour lutter contre la tuberculose.

Impact de la tuberculose sur la santé publique

La tuberculose continue d'être une menace majeure pour la santé publique mondiale, en particulier dans les pays à faible et moyen revenu. La tuberculose est souvent associée à la pauvreté, la malnutrition et les conditions de vie précaires, ce qui complique les efforts de contrôle et de traitement. L'incidence de la maladie est directement corrélée au PIB par habitant, et varie considérablement entre les pays, de moins de 5/100 000 au Danemark à plus de 600/100 000 aux Philippines. Elle est d'environ 7/100 000 en France en 2022. Seize pays concentrent 93% des cas, dont deux tiers se groupent dans huit pays : l'Inde, l'Indonésie, la Chine, les Philippines, le Pakistan, le Niger, le Bangladesh et la République Démocratique du Congo².

Le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) et le bacille tuberculeux forment une combinaison mortelle, chaque infection exacerbant l'autre. Les patients séropositifs pour le VIH sont particulièrement vulnérables à la tuberculose en raison de leur système immunitaire affaibli. Selon le rapport de l'OMS de 2023, environ 167 000 décès liés à la tuberculose en 2022 concernaient des patients vivant avec le VIH².

La résistance aux antibiotiques est un défi croissant dans la lutte contre la

1. Communication présentée à l'Académie des Sciences, Inscriptions et Belles-Lettres de Toulouse à la séance du 27 juin 2024.

2. Rapport mondial sur la tuberculose 2023 : <https://www.who.int/teams/global-tuberculosis-programme/tb-reports/global-tuberculosis-report-2023>

tuberculose. Les souches de *M. tuberculosis* résistantes aux médicaments, en particulier les souches multirésistantes, sont de plus en plus courantes, compliquant le traitement et augmentant le taux de mortalité. En 2022, on estimait à 410 000 le nombre de cas de tuberculose résistant aux médicaments dans le monde². La recherche de nouveaux antibiotiques et de stratégies thérapeutiques est donc essentielle pour contrôler cette maladie.

Stratégies de lutte contre la tuberculose

Pour combattre efficacement la tuberculose, il est essentiel d'adopter une approche multifacette incluant la prévention, le diagnostic précoce et le traitement efficace.

Le vaccin BCG³, dérivé par atténuation du bacille de la tuberculose bovine *Mycobacterium bovis*, une espèce très proche de *M. tuberculosis*, est le seul vaccin actuellement disponible contre la tuberculose. Bien qu'il soit efficace pour prévenir les formes graves de la maladie chez les enfants (Pereira et al., 2007), son efficacité chez les adultes est trop variable (Colditz et al., 1994 ; Mangtani et al., 2014). La recherche continue pour développer des vaccins plus efficaces, notamment des vaccins capables de prévenir la réactivation de la tuberculose latente et d'améliorer l'immunité chez les adultes. Plus d'une vingtaine de candidats vaccins font actuellement l'objet d'essais cliniques (Cobelens et al., 2022). Un de ces candidats vaccins, le vaccin sous-unitaire M72/AS01_E, a récemment montré une efficacité remarquable d'environ 50% pour prévenir la réactivation tuberculeuse chez l'adulte dans un essai clinique de phase 2 (Tait et al., 2019). D'autres candidats vaccins, sous-unitaires ou vaccins vivants atténués, sont en phase d'essais cliniques⁴.

Le traitement standard de la tuberculose sensible aux médicaments comprend une combinaison de quatre antibiotiques (isoniazide, rifampicine, pyrazinamide et ethambutol) à prendre pendant deux mois, suivis de quatre mois de traitement avec isoniazide et rifampicine seulement. Ce traitement est long, et une nouvelle recommandation de l'OMS propose un traitement de quatre mois avec quatre molécules : isoniazide, rifapentine, moxifloxacine et pyrazinamide. Le traitement des tuberculoses résistantes a fait des progrès considérables ces dernières années : alors que ces traitements pouvaient aller jusqu'à 18 mois ou plus, le nouveau protocole « BPaLM » recommande pour les tuberculoses résistantes un traitement de six mois alliant bédaquiline, prétomanide, linézolide et moxifloxacine. De nouvelles classes d'antibiotiques, des combinaisons nouvelles de médicaments et des thérapies adjuvantes sont en cours de recherche et d'essais cliniques pour améliorer davantage encore l'efficacité du traitement de la tuberculose résistante aux médicaments (Tiberi et al., 2018).

Le diagnostic précoce et précis de la tuberculose est essentiel pour commencer rapidement le traitement et limiter la propagation de la maladie. Les nouvelles technologies de diagnostic, telles que les tests moléculaires rapides et les biomarqueurs spécifiques, améliorent la détection de la tuberculose et la différenciation entre les

3. Le BCG (Bacille de Calmette et Guérin) a été inventé par Albert Calmette (1863-1933) et Camille Guérin (1872-1961), et a été inoculé pour la première fois en France en 1921.

4. Pour un panorama complet, voir le site de la *Tuberculosis Vaccine Initiative* : <https://www.tbvi.eu/what-we-do/pipeline-of-vaccines/>

souches sensibles et résistantes aux médicaments (Walzl et *al.*, 2018). D'intenses recherches sont en cours dans ce domaine également.

Si la médecine a fait d'importants progrès dans la prise en charge des patients atteints de tuberculose, le soutien à la recherche fondamentale doit être poursuivi, afin de pouvoir proposer de nouveaux candidats vaccins et candidats médicaments. Cela nécessite de mieux connaître encore l'ennemi, *M. tuberculosis*, son histoire évolutive, sa physiologie et son métabolisme, et sa pathogénicité.

Évolution du bacille de la tuberculose

Le genre *Mycobacterium* comprend plus de 170 espèces, la plupart étant des organismes environnementaux et inoffensifs. Les espèces du genre *Mycobacterium* sont traditionnellement divisées en deux groupes : les espèces à croissance rapide et celles à croissance lente. Les pathogènes du « complexe » *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC, qui désigne l'espèce *M. tuberculosis* et les espèces très proches comme *M. bovis*), ainsi que *Mycobacterium leprae* et *Mycobacterium ulcerans*, appartiennent au groupe des espèces à croissance lente. L'évolution du complexe MTBC d'un organisme environnemental à un pathogène « professionnel » a impliqué l'acquisition et la perte de gènes spécifiques. Cette transition s'est probablement produite en Afrique, bien que l'âge exact du complexe MTBC reste incertain (Gagneux, 2018).

Le transfert horizontal de gènes (HGT pour *horizontal gene transfer*) est un processus fondamental dans le monde microbien, contribuant de manière majeure à la diversité génétique et à l'adaptabilité des bactéries (Arnold et *al.*, 2022 ; Soucy et *al.*, 2015). Contrairement au transfert vertical de gènes, qui se produit par la reproduction et l'héritage de matériel génétique de parent à descendant, le HGT implique le transfert de matériel génétique entre organismes non apparentés. Ce processus permet aux bactéries d'acquérir rapidement de nouveaux traits, facilitant leur survie dans des environnements divers et souvent hostiles. Il existe trois mécanismes principaux par lesquels le HGT se produit chez les bactéries : la transformation, la transduction et la conjugaison (Arnold et *al.*, 2022 ; Soucy et *al.*, 2015).

Le processus de transformation implique l'absorption de fragments d'ADN nu provenant de l'environnement par une cellule bactérienne. L'ADN, souvent libéré par des cellules lysées, est intégré dans le génome du receveur par recombinaison. La transformation est un phénomène naturel chez de nombreuses espèces bactériennes et joue un rôle crucial dans la variation génétique. Par exemple, la découverte de la transformation chez le pneumocoque, *Streptococcus pneumoniae*, a été déterminante pour comprendre que l'ADN est le matériel de l'hérédité.

Dans le mécanisme de transduction, les bactériophages (virus qui infectent les bactéries) facilitent le transfert de matériel génétique. Au cours du cycle lytique, les phages peuvent emballer par inadvertance l'ADN bactérien hôte dans leurs particules virales. Lorsque ces phages infectent de nouvelles cellules bactériennes, l'ADN étranger peut être intégré dans le génome de l'hôte. La transduction peut être soit généralisée - n'importe quel gène bactérien peut être transféré -, soit spécialisée - seuls des gènes spécifiques adjacents au site d'intégration du phage sont transférés.

La conjugaison implique un contact direct de cellule à cellule, généralement médié par un plasmide ou un transposon conjugatif. Une cellule donneuse transfère du matériel génétique à une cellule receveuse via un pilus, une structure en forme de pont. Les

plasmides, tels que le plasmide F chez *Escherichia coli*, portent souvent des gènes de résistance aux antibiotiques et d'autres traits de survie, impactant significativement le paysage génétique des populations bactériennes.

Le HGT a des implications profondes pour l'évolution bactérienne. En acquérant de nouveaux gènes, les bactéries peuvent s'adapter rapidement à des environnements changeants, exploiter de nouvelles niches écologiques et développer de nouvelles voies métaboliques. Une des conséquences les plus significatives du HGT est la propagation de la résistance aux antibiotiques. Les gènes de résistance, souvent situés sur des plasmides, peuvent être transférés entre différentes espèces bactériennes, conduisant à l'émergence de souches multirésistantes. Cela pose un défi sérieux pour la santé publique et nécessite le développement de nouvelles stratégies pour combattre les infections bactériennes.

Le HGT joue un rôle vital dans l'écologie microbienne en permettant aux bactéries d'échanger du matériel génétique au sein des communautés microbiennes. Cet échange génétique peut renforcer la résilience et la fonctionnalité des écosystèmes microbiens. En conclusion, le transfert horizontal de gènes est un moteur crucial de la diversité génétique et de l'adaptabilité chez les bactéries. Ses mécanismes - transformation, transduction et conjugaison - facilitent l'acquisition rapide de nouveaux traits, impactant significativement l'évolution bactérienne, la résistance aux antibiotiques et l'écologie microbienne (Arnold et al., 2022 ; Soucy et al., 2015).

Rôle du transfert horizontal de gènes dans l'évolution de *M. tuberculosis* : l'exemple de la respiration des nitrates pour survivre à l'hypoxie

M. tuberculosis et les espèces du MTBC, bien que généralement considérées comme ayant une structure clonale stricte, avec peu ou pas de HGT en cours dans les souches qui circulent actuellement, ont acquis plusieurs centaines de gènes par ce mécanisme depuis sa divergence avec des espèces environnementales telles *Mycobacterium marinum* et *Mycobacterium kansasii*. Cela a été montré par des études de génomique comparative (Becq et al., 2007 ; Jang et al., 2008 ; Rosas-Magallanes et al., 2006 ; Stinear et al., 2008 ; Veyrier et al., 2009), telle celle que nous avons faite en comparant les génomes de *M. marinum* et *M. tuberculosis* (Becq et al., 2007).

L'ADN des bactéries, comme celui de tous les organismes vivants, est composé de nucléotides : adénine (A), guanine (G), cytosine (C) et thymine (T). En utilisant une méthode paramétrique de comparaison de la fréquence des « mots » de quatre lettres⁵ dans le génome de *M. tuberculosis*, nous avons pu identifier dans le génome des segments discordants ou incongruents avec le reste du génome, indiquant ainsi des zones de transfert de matériel génétique exogène. Par comparaison de la fréquence des « mots » génétiques des segments d'ADN discordants avec celle des génomes de milliers d'autres espèces, nous avons même pu retracer l'histoire évolutive de ces segments, et proposer que la plupart des gènes acquis horizontalement par l'ancêtre de *M. tuberculosis* proviennent d'espèces environnementales (ou de la « rhizosphère »),

5. Un « mot » est une combinaison de quatre lettres correspondant à quatre nucléotides. Ainsi ATCG est un « mot », ATGC est un autre mot etc. Ainsi, il est possible de former $4 \times 4 \times 4 \times 4 = 256$ « mots » différents.

comme des Rhizobiales, des Burkholderiales ou des Pseudomonadales (Becq et *al.*, 2007).

À quoi ont pu servir ces gènes acquis horizontalement ?

Pour répondre à cette question, nous avons généré des mutants génétiques inactivés dans plusieurs de ces gènes et étudié leurs caractéristiques (leur phénotype) dans plusieurs conditions, comme par exemple l'hypoxie. L'hypoxie est un stress majeur rencontré par *M. tuberculosis* au cours de son cycle infectieux dans les lésions pulmonaires, ou granulomes (Rustad et *al.*, 2009).

La formation du granulome est une réponse immunitaire complexe qui vise à contenir l'infection tuberculeuse. Le granulome est une structure composée de macrophages infectés, de cellules T et de cellules géantes fusionnées. Bien que la fonction du granulome soit de contenir l'infection, *M. tuberculosis* peut survivre et se développer à l'intérieur de cette structure en modifiant son métabolisme pour s'adapter aux conditions adverses telles que l'hypoxie et la faible disponibilité en nutriments. Les granulomes peuvent ainsi devenir des réservoirs de bactéries latentes qui peuvent se réactiver des années plus tard, provoquant une tuberculose active. Au sein des granulomes, la tension en oxygène peut diminuer jusqu'à moins de 1%, alors qu'elle est de 21% dans l'air ambiant. Comment respirer dans de telles conditions ?

La respiration désigne le processus par lequel les électrons terminaux de la chaîne respiratoire sont captés par un accepteur final d'électrons qui passe ainsi d'une forme oxydée à une forme réduite. Chez l'Homme, l'accepteur final d'électrons est l'oxygène (O_2) qui est réduit en eau (H_2O). Beaucoup d'espèces bactériennes, dont *M. tuberculosis*, peuvent, en absence d'oxygène, respirer d'autres molécules que l'oxygène, comme les nitrates (NO_3^-) qui sont alors réduits en nitrites (NO_2^-) (Sohaskey, 2008 ; Sohaskey & Wayne, 2003).

En fonction de l'espèce bactérienne et des conditions environnementales, les nitrites peuvent être réduits en divers produits finaux tels que l'ammoniac (NH_3), le diazote (N_2) ou le protoxyde d'azote (N_2O), chaque étape étant catalysée par des enzymes ou réductases spécifiques.

L'enzyme qui permet à *M. tuberculosis* de respirer les nitrates est la nitrate reductase (NR). Cette enzyme nécessite pour fonctionner un cofacteur portant un centre à molybdène : le cofacteur MoCo (pour *molybdenum cofactor*).

Nous avons montré, entre autre par des approches de génétique fonctionnelle, qu'un des îlots génomiques acquis par l'ancêtre de *M. tuberculosis* par HGT, contient des gènes essentiels pour la biosynthèse du MoCo : les gènes *moaA1*, *moaB1*, *moaC1* et *moaD1* (Levillain et *al.*, 2017). Plus spécifiquement, nos résultats ont montré que Les gènes *moaA1-D1* sont fortement induits dans des conditions hypoxiques. Cette induction est cruciale pour la capacité de *M. tuberculosis* à respirer le nitrate, à entrer en dormance et à survivre dans des conditions de limitation en oxygène. L'induction est déclenchée par le régulateur transcriptionnel MoaR1, sensible à l'hypoxie, encodé dans la même île génomique que *moaA1-D1*. Ce régulateur est également surexprimé sous hypoxie, assurant l'expression coordonnée du locus *moaA1-D1*.

Le locus génétique *moaA1-D1* est essentiel pour la respiration des nitrates en conditions hypoxiques. En effet, un mutant dépourvu de ce locus montre une capacité diminuée à réduire les nitrates, et une survie moins bonne en hypoxie. L'expression hétérologue de *moaA1-D1* chez une mycobactérie qui ne possède pas ces gènes, *M. kansasii*, améliore sa respiration des nitrates et sa survie en hypoxie, suggérant que

l'acquisition de ces gènes a été une étape cruciale pour l'adaptation évolutive de *M. tuberculosis* à l'hypoxie.

Enfin, chez des souris qui développent des granulomes hypoxiques, le mutant dépourvu du locus *moaA1-D1* montre une colonisation pulmonaire significativement réduite, indiquant que le locus *moaA1-D1* est crucial pour la survie de *M. tuberculosis* dans les lésions hypoxiques. En revanche, chez des souris qui ne développent pas de granulomes hypoxiques, le mutant ne montre pas de défaut de survie, soulignant le rôle spécifique de *moaA1-D1* dans l'adaptation à l'hypoxie.

Ainsi, l'ensemble de ces travaux suggère fortement que l'acquisition horizontale du locus *moaA1-D1* et du régulateur *MoaR1* a pu être une étape clé de l'évolution de *M. tuberculosis*, améliorant sa capacité à survivre dans les environnements hypoxiques des granulomes pulmonaires. L'étude suggère que des événements similaires de transfert horizontal de gènes ont pu contribuer au succès évolutif de *M. tuberculosis* en tant que pathogène, en lui fournissant des voies métaboliques nouvelles, facilitant la survie sous les conditions de stress imposées par l'hôte.

Où ces échanges génétiques ont-ils pu avoir lieu, et dans quel « but » évolutif ? Plusieurs auteurs ont suggéré que des protozoaires, comme les amibes, ont peut-être joué un rôle clé dans l'évolution de la virulence des mycobactéries. Les amibes sont des prédateurs bactériens vivant dans divers environnements dont les sols et l'eau ; ce sont des sortes de phagocytes environnementaux. Les mycobactéries capables de survivre à la prédation par les protozoaires étaient peut-être mieux équipées pour infecter les phagocytes humains, en l'occurrence les macrophages alvéolaires dans les poumons (Jang et al., 2008). Cette hypothèse est étayée par la capacité de plusieurs espèces de mycobactéries à persister au sein des protozoaires. Un exemple notable est fourni par le pathogène opportuniste *Mycobacterium avium*, qui possède un îlot génomique lui permettant de parasiter à la fois les macrophages humains et les protozoaires (Danelishvili et al., 2007).

Conclusion et perspectives

En identifiant et en caractérisant les îlots génomiques impliqués dans la virulence, nous pouvons proposer des cibles potentielles pour de nouveaux médicaments antituberculeux. Par exemple, on peut envisager que des inhibiteurs des protéines impliquées dans la synthèse du MoCo pourraient aider à réduire la virulence de *M. tuberculosis*, et ainsi s'ajouter à l'arsenal thérapeutique.

Plus généralement, en étudiant les voies génétiques et biochimiques de *M. tuberculosis* impliquées dans son cycle infectieux, nous pouvons identifier comment la bactérie survit et prolifère dans son hôte humain.

Grâce à la recherche fondamentale, de nouvelles cibles médicamenteuses peuvent être découvertes. Les médicaments traditionnels contre la tuberculose ciblent un nombre limité de fonctions bactériennes qui sont essentielles à la vie de la bactérie ; une telle pression sur le pathogène conduit rapidement à l'émergence de résistances aux traitements. La recherche fondamentale peut révéler de nouveaux aspects de la biologie de *M. tuberculosis*, spécifiquement essentiels dans certaines étapes-clés de son processus infectieux. Ces cibles nouvellement identifiées peuvent ensuite être exploitées pour développer des médicaments avec des mécanismes d'action nouveaux, et réduisant la probabilité de développement de résistances.

En bénéficiant d'un soutien sans faille, y compris financier, à la recherche fondamentale, la communauté scientifique peut ouvrir la voie à des percées qui conduiront *in fine* à l'éradication de la tuberculose, sauvant ainsi des millions de vies.

Bibliographie

Arnold, Brian J. *et al.*, « Horizontal gene transfer and adaptive evolution in bacteria », *Nature reviews. Microbiology* (20), 2022, pp. 206-218.

Becq, Jennifer *et al.*, « Contribution of horizontally acquired genomic islands to the evolution of the tubercle bacilli », *Molecular biology and evolution* (24), 2007, pp. 1861-1871.

Cobelens, Frank *et al.*, « Accelerating research and development of new vaccines against tuberculosis : a global roadmap », *The Lancet. Infectious diseases* (22), 2022, pp. e108-e120.

Colditz, Graham A. *et al.*, « Efficacy of BCG vaccine in the prevention of tuberculosis. Meta-analysis of the published literature », *JAMA* (271), 1994, pp. 698-702.

Danelishvili, Lia *et al.*, « Identification of *Mycobacterium avium* pathogenicity island important for macrophage and amoeba infection », *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (104), 2007, pp. 11038-11043.

Gagneux, Sébastien, « Ecology and evolution of *Mycobacterium tuberculosis* », *Nature reviews. Microbiology* (16), 2018, pp. 202-213.

Jang, Jichan *et al.*, « Horizontally acquired genomic islands in the tubercle bacilli », *Trends in microbiology* (16), 2008, pp. 303-308.

Levillain, Florence *et al.*, « Horizontal acquisition of a hypoxia-responsive molybdenum cofactor biosynthesis pathway contributed to *Mycobacterium tuberculosis* pathoadaptation », *PLoS pathogens* (13), 2017, pp. e1006752.

Mangtani, Punam *et al.*, « Protection by BCG vaccine against tuberculosis : a systematic review of randomized controlled trials », *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* (58), 2014, pp. 470-480.

Pereira, Susan M. *et al.*, « BCG vaccine against tuberculosis: its protective effect and vaccination policies », *Rev Saude Publica* (41 Suppl 1), 2007, pp. 59-66.

Rosas-Magallanes, Vania *et al.*, « Horizontal transfer of a virulence operon to the ancestor of *Mycobacterium tuberculosis* », *Molecular biology and evolution* (23), 2006, pp. 1129-1135.

Rustad, Tige R. *et al.*, « Hypoxia : a window into *Mycobacterium tuberculosis* latency », *Cellular microbiology* (11), 2009, pp. 1151-1159.

Sohaskey, Charles D., « Nitrate enhances the survival of *Mycobacterium tuberculosis* during inhibition of respiration », *Journal of bacteriology* (190), 2008, pp. 2981-2986.

Sohaskey, Charles D. *et al.*, « Role of narK2X and narGHJ in hypoxic upregulation of nitrate reduction by *Mycobacterium tuberculosis* », *Journal of bacteriology* (185), 2003, pp. 7247-7256.

Soucy, Shannon M. *et al.*, « Horizontal gene transfer : building the web of life », *Nature reviews. Genetics* (16), 2015, pp. 472-482.

Stinear, Timothy P. *et al.*, « Insights from the complete genome sequence of *Mycobacterium marinum* on the evolution of *Mycobacterium tuberculosis* », *Genome research* (18), 2008, pp. 729-741.

Tait, Dereck R. *et al.*, « Final Analysis of a Trial of M72/AS01(E) Vaccine to Prevent Tuberculosis », *The New England journal of medicine* (381), 2019, pp. 2429-2439.

Tiberi, Simon *et al.*, « Tuberculosis : progress and advances in development of new drugs, treatment regimens, and host-directed therapies », *The Lancet. Infectious diseases* (18), 2018, pp. e183-e198.

Veyrier, Frédéric *et al.*, « Phylogenetic detection of horizontal gene transfer during the step-wise genesis of *Mycobacterium tuberculosis* », *BMC evolutionary biology* (9), 2009, pp. 196.

Walzl, Gerhard *et al.*, « Tuberculosis: advances and challenges in development of new diagnostics and biomarkers », *The Lancet. Infectious diseases* (18), 2018, pp. e199-e210.