



HAL
open science

Caractérisation du rôle de la protéine Lsr2 dans la virulence des morphotypes lisse (S) et rugueux (R) de *Mycobacterium abscessus*

Elias Gerges

► **To cite this version:**

Elias Gerges. Caractérisation du rôle de la protéine Lsr2 dans la virulence des morphotypes lisse (S) et rugueux (R) de *Mycobacterium abscessus*. Bactériologie. Université Paris-Saclay, 2023. Français. NNT : 2023UPASL131 . tel-04536653

HAL Id: tel-04536653

<https://theses.hal.science/tel-04536653>

Submitted on 8 Apr 2024

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

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

Caractérisation du rôle de la protéine Lsr2 dans la virulence des morphotypes lisse (S) et rugueux (R) de *Mycobacterium abscessus*

*Unraveling the role of Lsr2 protein in the virulence of smooth (S) and
rough (R) morphotypes of Mycobacterium abscessus*

Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n° 577, structure et dynamique des systèmes vivants (SDSV)
Spécialité de doctorat : Microbiologie
Graduate School : Life Sciences and Health
Réfèrent : Université de Versailles-Saint-Quentin-en-Yvelines

Thèse préparée dans l'unité de recherche **Infection et Inflammation**
(Université Paris-Saclay, UVSQ, Inserm),
sous la direction de **Jean-Louis HERRMANN**, PU-PH,
et le co-encadrement de **Frédéric CRÉMAZY**, MCF,

Thèse soutenue à Montigny-Le-Bretonneux, le 20 Décembre 2023, par

Elias GERGES

Composition du Jury

Membres du jury avec voix délibérative

Jean-Luc MAINARDI PU-PH, CRC, Université Paris Cité	Président
Oana DUMITRESCU MCU-PH, HDR, CIRI, Université Claude Bernard Lyon 1	Rapportrice & Examinatrice
Olivier ESPÉLI DR, Collège de France, Université PSL	Rapporteur & Examineur
Virginia LIOY CR, I2BC, Université Paris-Saclay	Examinatrice

Titre : Caractérisation du rôle de la protéine Lsr2 dans la virulence des morphotypes lisse (S) et rugueux (R) de *Mycobacterium abscessus*

Mots clés : *Mycobacterium abscessus*, Lsr2, Facteur de transcription, Virulence, Résistance aux antibiotiques, Chromosome

Résumé : *Mycobacterium abscessus* (Mabs) est une mycobactérie non tuberculeuse à croissance rapide, qui provoque des infections pulmonaires chez les patients atteints de mucoviscidose. Au cours de l'infection, Mabs évolue entre un morphotype lisse (Mabs-S) et un morphotype rugueux (Mabs-R), ce dernier étant hyper-virulent. Notre équipe a précédemment identifié le gène *lsr2* comme étant différentiellement exprimé pendant la transition de Mabs-S à Mabs-R. *lsr2* code pour un facteur de transcription pléiotropique qui appartient à la superfamille des protéines associées aux nucléoïde (NAPs), lesquelles jouent un rôle clé dans la structure du chromosome bactérien. L'objectif de cette thèse est d'élucider le rôle moléculaire de Lsr2 dans la pathobiologie de Mabs en utilisant trois approches de génomique fonctionnelle : RNA-seq, ChIP-seq et Hi-C. L'analyse transcriptomique révèle que Lsr2 régule différemment l'expression des gènes dans les deux morphotypes, dont la plupart sont impliqués dans divers processus cellulaires clés de Mabs, notamment l'adaptation à l'hôte et la résistance aux antibiotiques. Ces résultats ont été confirmés par RT-qPCR, ainsi que par des tests de concentration minimale inhibitrice (CMI) et des tests d'infection sur des macrophages en présence d'antibiotiques. L'analyse ChIP-seq montre que Lsr2 se lie largement au génome de Mabs (10%) au niveau de séquences riches en AT et semble former de longs domaines par oligomérisation qui participent à la répression de ses gènes cibles. Cependant, la similitude de fixation de Lsr2 entre Mabs-S et Mabs-R et la présence d'un grand nombre de gènes liés mais non régulés suggèrent que des mécanismes plus complexes, tels que le pontage d'ADN, pourraient être impliqués pour assurer la sélectivité des gènes cibles. Dans le cadre de cette thèse, nous avons développé un protocole Hi-C pour étudier la structure tridimensionnelle du chromosome de Mabs. Ce travail a également impliqué la mise en place de la technique 3C-qPCR pour analyser les interactions physiques dépendantes de la protéine Lsr2 entre les fragments d'ADN. Ces avancées méthodologiques ouvrent de nouvelles perspectives pour la compréhension de la régulation génomique chez Mabs.

Title : Unraveling the role of Lsr2 protein in the virulence of smooth (S) and rough (R) morphotypes of *Mycobacterium abscessus*

Keywords : *Mycobacterium abscessus*, Lsr2, Transcription factor, Virulence, Antibiotic resistance, Chromosome

Abstract : *Mycobacterium abscessus* (Mabs) is a non-tuberculous mycobacterium, causing lung infections in cystic fibrosis patients. During infection, Mabs switches from smooth (Mabs-S) to rough (Mabs-R) morphotypes, the latter being hyper-virulent. Our team previously identified the gene *lsr2* as being differentially expressed during the transition from Mabs-S to Mabs-R. *lsr2* codes for a pleiotropic transcription factor that belongs to the superfamily of nucleoid-associated proteins (NAPs), which play a key role in the structure of bacterial chromosome. The objective of this thesis is to elucidate the molecular role of Lsr2 in the pathobiology of Mabs using three functional genomics approaches: RNA-seq, ChIP-seq, and Hi-C. Transcriptomic analysis reveals that Lsr2 differentially regulates gene expression in both morphotypes, with most genes being involved in various key cellular processes of Mabs, including adaptation to the host and antibiotic resistance. These results were confirmed through RT-qPCR, as well as by minimum inhibitory concentration (MIC) tests and infection tests on macrophages in the presence of antibiotics. ChIP-seq analysis revealed that Lsr2 extensively binds the Mabs genome (10%) at AT-rich sequences and appears to form long domains through oligomerization that participate in the repression of its target genes. However, the similarity in Lsr2 binding between Mabs-S and Mabs-R, and the presence of a large number of bound genes but unregulated suggest that more complex mechanisms, such as DNA bridging, may be involved in ensuring gene target selectivity. As part of this thesis, we developed a Hi-C protocol to study the three-dimensional structure of the Mabs chromosome. This work also involved the implementation of the 3C-qPCR technique to analyze Lsr2-dependent physical interactions between DNA fragments. These methodological advances open up new perspectives for understanding genomic regulation in Mabs.

Remerciements

Tout d'abord, je tiens à exprimer ma sincère gratitude envers les membres du jury, le Pr. Olivier Espéli et le Dr. Oana Dumitrescu d'avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse en tant que rapporteurs de ce manuscrit. Le Pr. Jean-Luc MAINARDI et le Dr. Virginia Lioy d'avoir accepté d'évaluer ma thèse en tant qu'examineurs.

Je tiens à remercier le Pr. Jean-Louis Herrmann, notre chef d'équipe, et mon directeur de thèse de m'avoir donné l'opportunité de rejoindre son laboratoire, pour sa présence, ses conseils et son orientation tout au long de mes 3 années de thèse, et pour toutes les discussions qui nous ont permis de grandir et d'évoluer scientifiquement.

Au Dr. Frédéric Crémazy, mon directeur de thèse qui a suivi chaque étape de ma thèse, qui m'a motivé à travers les bons et les mauvais jours, et m'a donné ses conseils et son expertise pour que je puisse développer mes propres compétences et évoluer. Je tiens à remercier ses efforts depuis le premier jour de ma thèse, et sa présence bienveillante chaque fois que j'en avais besoin.

Un grand merci à mon équipe EPIM, spécialement à Nicolas Durand pour sa gentillesse et les bons moments que nous avons passés ensemble au labo (en particulier lors de la préparation des bactéries compétentes) et pendant les deux congrès Mycodays à Lyon et Microbes à Rennes. Merci à Marion Hoareau qui a partagé mon bureau au cours de la dernière année de ma thèse et qui a participé à mon projet au cours des derniers mois. Un très grand merci également à Hamadoun Touré, un véritable collègue et ami de labo, pour son soutien avant et après mon arrivée en France. Aussi, un grand merci à toute l'unité U1173 et à Jean-Marc Corsi pour m'avoir donné l'opportunité de participer à l'enseignement du cours Bi440 à l'UVSQ.

Je tiens à remercier sincèrement les membres de mon comité de thèse, le Pr. Roland Brosch et le Pr. Stéphanie Burry-Moné pour leurs précieux conseils et leur suivi tout au long de ma thèse.

Merci à tous mes amis en France et à l'étranger, à mes collègues, à mes cousins et à mes voisins à Montigny pour votre soutien moral et intellectuel tout au long de ma démarche.

Enfin, un très grand merci à ma famille, mes parents et mon frère, Charbel, qui ont toujours été là pour moi. Merci pour votre soutien constant et vos encouragements tout au long de mes années d'études. Votre présence pendant ma soutenance de thèse est un cadeau précieux. Je suis très heureux de célébrer avec vous mon succès, le résultat de 23 ans d'études...

À tous ceux qui ont contribué de quelque manière que ce soit à ma réussite... **Merci !**

Table des matières

Remerciements	3
Table des matières	4
Abréviations	7
Index des Figures	10
Index des Tableaux	12
Introduction.....	13
Chapitre I : Les mycobactéries.....	13
1. Phylogénie et classification des mycobactéries	13
2. Caractéristiques des mycobactéries.....	16
2.1 Le contenu en guanine-cytosine (GC%) de l'ADN	16
2.2 L'enveloppe mycobactérienne	16
2.3 L'acido-alcoolo-résistance	17
3. Pathologies associées aux mycobactéries.....	19
Chapitre II : <i>Mycobacterium abscessus</i>, un pathogène opportuniste chez l'Homme	22
1. Le complexe <i>M. abscessus</i> et l'individualisation phylogénétique de <i>M. abscessus</i>	22
2. Analyse des caractéristiques génomiques de <i>M. abscessus</i>	24
2.1 Caractéristiques générales du génome et comparaison avec d'autres espèces de mycobactéries	24
2.2 Interaction génétique et environnementale	26
2.3 Exploration de l'impact génomique sur la virulence de <i>M. abscessus</i>	28
2.4 La transition S/R : de mutations génétiques irréversibles à l'origine d'une hétérogénéité phénotypique	32
3. Pouvoir pathogène de <i>M. abscessus</i>	39
3.1 Les infections causées par <i>M. abscessus</i>	39
3.2 <i>M. abscessus</i> et la mucoviscidose.....	40
3.3 <i>M. abscessus</i> et transplantation.....	45
4. Diagnostic et traitement des infections à <i>M. abscessus</i>	45

4.1 Diagnostic des infections à <i>M. abscessus</i>	45
4.2 Traitement des infections à <i>M. abscessus</i>	46
5. Polyrésistance de <i>M. abscessus</i> aux antibiotiques.....	48
Chapitre III : Le chromosome bactérien	51
1. Organisation générale du nucléoïde bactérien.....	51
2. Compaction et organisation moléculaire du chromosome bactérien.....	51
3. Le génome bactérien en trois dimensions (3D)	53
3.1 Les méthodes 3C pour l'étude du chromosome bactérien	54
3.2 L'organisation spatiale du chromosome bactérien	56
Chapitre IV : La superfamille des Protéines Associées au Nucléoïde (NAPs).....	61
1. Généralités sur les NAPs.....	61
2. Le rôle des NAPs dans la topologie du chromosome bactérien	64
2.1 Diversité des interactions NAPs-ADN pour l'architecture du chromosome.....	64
2.2 Effets des facteurs environnementaux sur les interactions NAPs-ADN.....	67
2.3 Le rôle des NAPs dans la régulation transcriptionnelle.....	68
2.4 Le rôle des NAPs dans les réponses aux stress.....	70
2.5 Le rôle des NAPs dans la virulence bactérienne.....	74
2.6 Les NAPs chez les mycobactéries	79
Chapitre V : La protéine Lsr2	82
1. Lsr2 : une protéine conservée chez les mycobactéries et les actinomycètes	82
2. Lsr2 : un déterminant physiologique important chez les mycobactéries	83
2.1 Lsr2 : un acteur majeur de la virulence des mycobactéries	83
2.2 Mutation de <i>lsr2</i> : impact sur la morphologie, la composition et la dynamique cellulaire des mycobactéries	85
3. Lsr2 comme une protéine associée au nucléoïde (NAP).....	87
3.1 Lsr2 comme une protéine architecturante de l'ADN	87
3.2 Lsr2 comme un facteur de transcription	91
4. Modifications post-traductionnelles et interactions avec d'autres NAPs.....	92
Objectifs	94

Résultats	96
Partie I: Lsr2, un régulateur pléiotropique au cœur de la stratégie infectieuse de <i>Mycobacterium abscessus</i>	96
Partie II : Analyse de la conformation 3D du génome de <i>M. abscessus</i> par Hi-C et 3C-qPCR ... 97	
1. Étude de la structure 3D du chromosome des morphotypes Mabs-S et Mabs-R par Hi-C... 97	
2. Étude de l'effet de Lsr2 sur les interactions d'ADN chez <i>M. abscessus</i> par 3C-qPCR 106	
Partie III : Étude de la localisation subcellulaire de Lsr2 sur le génome de <i>M. abscessus</i> et l'effet de la mutation du domaine N-terminal de Lsr2 dans sa fixation	110
1. Étude de la localisation subcellulaire de Lsr2 chez <i>M. abscessus</i> par la microscopie super-résolution.....	110
2. Étude de la fixation de Lsr2 mutée au niveau de son domaine N-terminal par ChIP-seq... 113	
Partie IV: Le Zafirlukast : Une molécule candidate pour cibler la protéine Lsr2 chez <i>M. abscessus</i> ?	116
1. Contexte.....	116
2. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) du zafirlukast chez <i>M. abscessus</i>	117
3. Évaluation de l'activité antibactérienne du zafirlukast chez <i>M. abscessus</i>	118
4. Étude de l'effet du zafirlukast sur la fixation de Lsr2 sur le génome de <i>M. abscessus</i>	119
5. Étude de l'effet du zafirlukast sur l'expression des gènes cibles de Lsr2	120
Partie V: Étude de l'effet des facteurs de stress sur la synthèse de Lsr2 et sa fixation chez <i>M. abscessus</i>	124
Discussion Générale - Perspectives	127
Matériels et Méthodes	139
Références Bibliographiques	144
Annexes	180
Annexe 1: Shedding light on bacterial chromosome structure: exploring the significance of 3C-based approaches	180
Annexe 2: Courbes de croissance	181

Abréviations

°C : degrés celsius

3C : Chromosome Conformation Capture

3C-qPCR : Chromosome Conformation Capture quantitative Polymerase Chain Reaction

3C-seq : Chromosome Conformation Capture – sequencing

3D : structure tridimensionnelle

4C : Chromosome conformation capture on chip

5C : Chromosome conformation capture carbon copy

ABC : ATP-Binding Cassette

AFM : atomic force microscopy

AG : arabinogalactane

AM : acide mycolique

ADN: acide désoxyribonucléique

anti-TNF : anti-tumor necrosis factor

ARN : acide ribonucléique

ARNm : ARN messenger

ARNr : ARN ribosomal

ARNt : ARN de transfert

ATCC : American Type Culture Collection

ATP : adénosine triphosphate

ATS : American Thoracic Society

BAAR : bacille acido-alcool résistants

c-di-GMP : cyclic diguanylate monophosphate

CDS : Coding sequence

CFTR : Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator

CFU : Colony Forming Units

ChIP-seq : Chromatin immunoprecipitation-sequencing

CID : Chromosome interaction domain

CIP : Collection Institut Pasteur

CLSI : Clinical and Laboratory Standards Institute

CMI : Concentration minimale inhibitrice

CTD : domaine C-terminal

CYSLTR1 : cysteinyl leukotriene receptor 1

dCTP : désoxycytidine triphosphate

ESX : Early Antigenic Secretion System

ETZ : electron translucent zone

FISH : Fluorescent In Situ Hybridization
GDND : glycosyl diacylated nonadecyl diol
GO : Gene Ontology
GPL : glycopeptidolipide
H₂O₂ : peroxyde d'hydrogène
HEG : gènes hautement exprimés
Hi-C : High-throughput Chromosome Conformation Capture
IDSA : Infectious Diseases Society of America
IgA : immunoglobuline A
IL-1 β : interleukine-1 β
IL-4 : interleukine-4
IS : séquence d'insertion
KCl : chlorure de potassium
kDa : kilodaltons
K-hepes : 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique associé à du potassium
Kilobase : kb
LAM : lipoarabinomannane
LCR : région de contrôle du locus
LEE : locus de pathogénicité de l'effacement des entérocytes
LM : lipomannane
Lpd : dihydrolipoamide dehydrogenase
Mabs-R : *M. abscessus* rough
Mabs-S : *M. abscessus* smooth
MAC: *Mycobacterium avium* complex
MatP : macrodomain Ter protein
matS : macrodomain Ter site
Mb : mégabase
Mce : mammalian cell entry
MCL : mycobactérie à croissance rapide
MCR : mycobactérie à croissance lente
MD : macrodomaine
Mg²⁺ : ions magnésium
MgtC : Mg²⁺ Transport protein C
MmpL : Mycobacterial membrane protein Large
MNT : mycobactérie non-tuberculeuse
MTbC : *Mycobacterium tuberculosis* complex
MsrA : méthionine sulfoxyde réductase A
NAP : Nucleoid-Associated Proteins

NGS : Next-Generation Sequencing
NMR : Nuclear Magnetic Resonance
NSL : Non-structured Left
NSR : Non Structured-Right
NTD : domaine N-terminal
OD₆₀₀ : optic density (600 nm)
Ori : origin of replication
PALM : photo-activated localization microscopy
Pb : paire de bases
Pdh : pyruvate déshydrogénase
PDIMs : phthiocerol dimycocerosates
PE : proline-glutamate
PEE : proline-proline-glutamate
PG : peptidoglycane
PIM : phosphatidylinositol mannoside
PLC : phospholipase C
R : rough
RNA-seq : RNA-sequencing
RNR : ribonucléotides reductase
ROI : reactive oxygen intermediates
ROS : reactive oxygen species
RT-qPCR : Reverse Transcription quantitative Polymerase Chain Reaction
S : smooth
SMC : Structural maintenance of chromosome
SNP : polymorphisme mononucléotidique
SPI : îlots de pathogénicité de *Salmonella*
SQ : Starting Quantity
Ter : DNA replication terminus
TFLM : Time-lapse fluorescence microscopy
Th1: cellules T helper de type 1
Th2: Cellules T helper de type 2
TLR2 : Toll-Like receptor 2
TMM/TDM : mono/dimycolates de tréhalose
TNF : tumor necrosis factor
Tris : tris(hydroxyméthyl)aminométhane
UV : ultraviolets
VIH : virus de l'immunodéficience humaine

Index des Figures

Figure 1 : Arbre phylogénétique du genre <i>Mycobacterium</i> basée sur la comparaison des génomes entiers	15
Figure 2 : Représentation schématique de l'enveloppe cellulaire de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	18
Figure 3 : Coloration de Ziehl-Neelsen	18
Figure 4 : Classification des mycobactéries selon leur temps de croissance et leur pathogénicité.	20
Figure 5 : Principaux changements taxonomiques de <i>M. abscessus</i> depuis sa découverte en 1952 et jusqu'à aujourd'hui	23
Figure 6 : Représentation du génome de <i>M. abscessus</i> CIP-104536T	25
Figure 7 : Morphologie des colonies observées par la loupe binoculaire pour les morphotypes lisse (S) et rugueux (R) de <i>M. abscessus</i> sur le milieu de culture solide 7H11	32
Figure 8 : Cultures liquides des morphotypes lisse (S) et rugueux (R) de <i>M. abscessus</i> en milieu 7H9. ...	33
Figure 9 : Analyse comparative des transcriptomes des morphotypes S et R.	35
Figure 10 : Effet de la formation de cordes par le morphotype R sur la phagocytose bactérienne	38
Figure 11 : Prévalence des espèces mycobactériennes isolées chez les patients atteints de la mucoviscidose aux États-Unis d'Amérique en 2021.	42
Figure 12 : Rôle du canal CFTR dans le contrôle de l'immunité innée contre l'infection à <i>M. abscessus</i> chez le modèle zebrafish.	44
Figure 13 : L'antibiothérapie en deux phases, intensive et de prolongation pour le traitement des infections à <i>M. abscessus</i>	46
Figure 14 : Le surenroulement de l'ADN.	52
Figure 15 : Matrice de contact Hi-C.	56
Figure 16 : Organisation spatiale des chromosomes bactériens	57
Figure 17 : Matrices de contact Hi-C pour <i>C. crescentus</i>	59
Figure 18 : Nombre de publications concernant les NAPs de 1968 à 2022.	62
Figure 19 : Variation des niveaux intracellulaires de 12 NAPs étudiées chez <i>E. coli</i> W3110 au cours des phases de croissance.	63
Figure 20 : L'organisation de l'ADN par les NAPs.	64
Figure 21 : Mécanisme de répression des NAPs de type H-NS (H-NS, Lsr2) dépendant de l'oligomérisation et du pontage d'ADN	69
Figure 22 : L'effet de la protéine Fis dans l'adaptation de <i>S. enterica</i> aux environnements hostiles	73
Figure 23 : Volcano plot montrant les gènes différentiellement régulés par H-NS dans <i>A. baumannii</i> en comparant les transcriptomes des souches sauvages (WT) et mutantes pour <i>hns</i> (Δhns).	75
Figure 24 : Alignement de séquences de Lsr2 à partir d'espèces mycobactériennes.	82
Figure 25 : Lsr2 un déterminant physiologique important pour la virulence de <i>M. abscessus</i>	84
Figure 26 : Influence de la mutation de <i>lsr2</i> sur la morphologie de <i>M. smegmatis</i>	85

Figure 27 : Effet de mutation du gène <i>lsr2</i> sur la taille des colonies des morphotypes S et R de <i>M. abscessus</i>	86
Figure 28 : Structure 3D de la protéine Lsr2.....	88
Figure 29 : Les complexes Lsr2/ADN observés <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i>	89
Figure 30 : Assemblage des complexes protéine-ADN fonctionnels par les NAPs de type H-NS (H-NS, Lsr2, MvAT et Rok)	90
Figure 31 : Vue d'ensemble des étapes du protocole Hi-C.	99
Figure 32 : Distribution des longueurs des fragments de restriction de SalI dans <i>M. abscessus</i>	99
Figure 33 : Vérification de l'intégrité, digestion par SalI et ligation de l'ADN génomique sur gel électrophorèse	100
Figure 34 : Rapports de contrôle de qualité des données Hi-C des différentes banques pour Mabs-S, générés par le pipeline <i>hicstuff</i>	102
Figure 35 : Matrices de contact Hi-C représentant la structure topologique du chromosome du morphotype S de <i>M. abscessus</i>	104
Figure 36 : Matrices de contact Hi-C représentant la structure topologique du chromosome de <i>M. abscessus</i>	105
Figure 37 : Conception expérimentale de la 3C-qPCR.	107
Figure 38 : Analyse 3C-qPCR des interactions au locus <i>mmpL8</i> chez les souches sauvages et mutantes pour <i>lsr2</i> de <i>M. abscessus</i>	109
Figure 39 : Distribution subcellulaire de Lsr2-mEos3.2 chez les deux morphotypes S et R de <i>M. abscessus</i>	111
Figure 40 : Les séquences protéiques de Lsr2 de <i>M. abscessus</i> pour la souche sauvage (Mabs-Lsr2) et pour la souche mutante pour le domaine N-terminal de Lsr2, marquée par une étiquette FLAG (Mabs-Lsr2 _{ΔNTD} -FLAG).....	113
Figure 41 : Analyse comparative du niveau d'expression du gène <i>lsr2</i> , pour les domaines NTD et CTD par RT-qPCR	114
Figure 42 : Effet de la mutation NTD sur la fixation de Lsr2 au génome de <i>M. abscessus</i>	115
Figure 43 : Effet bactériostatique du zafirlukast sur Mabs-S et Mabs-R.	118
Figure 44 : Effet du zafirlukast sur la fixation de Lsr2 sur le génome de Mabs-S	119
Figure 45 : Effet du zafirlukast sur le niveau d'expression des gènes <i>lsr2</i> , <i>eis2</i> et <i>MAB_2037</i>	123
Figure 46 : Effet de l'amikacine et de l'H ₂ O ₂ sur la fixation de Lsr2 sur le génome de Mabs-R	125
Figure 47 : Effet de l'amikacine et de l'H ₂ O ₂ sur le niveau d'expression du gène <i>lsr2</i>	126

Index des Tableaux

Tableau 1 : Classification des mycobactéries par Runyon	13
Tableau 2 : Répartition des germes respiratoires isolés à partir des poumons des personnes atteintes de la mucoviscidose. Les chiffres dans chaque colonne représentent le nombre total de patients par classes d'âge. La colonne (%) représente le pourcentage de positivité par rapport à l'effectif total (Rapport annuel 2019 du registre français de la mucoviscidose).....	42
Tableau 3 : Mode d'action des principales classes d'antibiotiques utilisées dans le traitement clinique de <i>M. abscessus</i> (Lavollay <i>et al.</i> , 2011) (Wilson, 2014) (Schedlbauer <i>et al.</i> , 2015) (Degiacomi <i>et al.</i> , 2019) (Illouz <i>et al.</i> , 2021) (Griffith and Daley, 2022).	47
Tableau 4 : Comparaison des susceptibilités aux antibiotiques (CMI) de <i>M. abscessus</i> et de <i>M. tuberculosis</i> (adapté de Luthra <i>et al.</i> , 2018).	48
Tableau 5 : Organisation spatiale des chromosomes bactériens	58
Tableau 6 : Exemples de NAPs impliquées dans la réponse cellulaire déclenchée lors de la détection de conditions de stress chez différentes espèces bactériennes. Drd : <i>Deinococcus radiodurans</i> , Hpy : <i>Helicobacter pylori</i> , Mtb : <i>Mycobacterium tuberculosis</i> , Sar: <i>Staphylococcus aureus</i> , Sco : <i>Streptomyces coelicolor</i> , Ftn : <i>Francisella tularensis</i> , Sm : <i>Salmonella</i> , Dnd : <i>Dickeya dadantii</i> , Sven : <i>Streptomyces venezuelae</i> (Hołówka and Zakrzewska-Czerwińska, 2020).....	71
Tableau 7 : Les espèces bactériennes sécrétant la protéine HU (d'après Stojkova and Spidlova, 2022).	77
Tableau 8 : Optimisations des expériences Hi-C	101
Tableau 9 : Profil de susceptibilité au zafirlukast des souches Mabs-S et Mabs-R en μM et en $\mu\text{g/mL}$ 3 à 5 jours d'incubation (n=3).....	117
Tableau 10 : Liste des amorces utilisées dans les parties résultats II, III, IV et V, ainsi que leurs séquences.	143

Introduction

Chapitre I : Les mycobactéries

1. Phylogénie et classification des mycobactéries

Les mycobactéries ont été décrites pour la première fois en 1896 par Lehmann et Neumann comme des bacilles Gram positif, droits ou légèrement incurvés, non sporulants, non flagellés, et mesurant de 1 à 10 μm de long et 0.3 à 0.6 μm de large. Elles présentent un métabolisme aérobie strict ou microaérophile, avec des optimums de croissance compris entre 25°C et 50°C, selon les espèces. Les mycobactéries appartiennent au phylum des *Actinomycetota*, à l'ordre des *Actinomycetales* et à la famille des *Mycobacteriaceae*. Dans cette famille, le genre *Mycobacterium* est le premier et le principal genre identifié (Lehmann, 1896), regroupant à ce jour près de 200 espèces mycobactériennes, présentes dans une gamme variée d'environnements (sol, eau, air) et arborant une grande diversité morphologique, biochimique et physiologique (Parte, 2014) (Tortoli *et al.*, 2017).

Selon la classification d'Ernest Runyon en 1959, les mycobactéries sont classées en quatre groupes en fonction de deux critères phénotypiques : la synthèse de pigments en présence ou en absence de lumière et la vitesse de croissance (**Tableau 1**).

Tableau 1 : Classification des mycobactéries par Runyon

Groupes	Pigmentation des colonies	Vitesse de croissance	Exemples de mycobactéries
I	Photochromogène	Lente	<i>Mycobacterium marinum</i> , <i>Mycobacterium kansasii</i>
II	Scotochromogène	Lente	<i>Mycobacterium gordonae</i> , <i>Mycobacterium scrofulaceum</i>
III	Nonchromogène	Lente	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> , <i>Mycobacterium ulcerans</i>
IV	Tout type	Rapide	<i>Mycobacterium abscessus</i> , <i>Mycobacterium fortuitum</i>

Les mycobactéries photochromogènes donnent des colonies qui se pigmentent uniquement à la suite d'une exposition à la lumière après culture dans l'obscurité. Les mycobactéries scotochromogènes forment des colonies pigmentées aussi bien en présence qu'en absence de lumière. Enfin, les mycobactéries non chromogènes ne se pigmentent pas, que ce soit après une culture dans l'obscurité ou à la lumière.

La vitesse de croissance des mycobactéries sur milieu gélosé permet de distinguer les mycobactéries à croissance rapide (MCR) des mycobactéries à croissance lente (MCL). Les MCR poussent en 7 jours sur milieu solide, avec un temps de génération de 5 à 6 heures, tandis que les MCL nécessitent plus de 7 jours, soit entre 2 et 3 semaines, pour donner des colonies visibles sur milieu solide, avec un temps de génération de 24 heures. La phylogénie moléculaire, basée sur le séquençage du gène *ARNr 16S* dans les années 1980, ainsi que sur d'autres gènes tels que *recA*, *rpoB*, *hsp65* et *sodA*, puis plus récemment la phylogénomique basée sur le séquençage de génomes entiers, ont permis de séparer les MCL et les MCR en deux clades phylogénétiques distincts (Kim *et al.*, 1999) (Devulder *et al.*, 2005) (Fedrizzi *et al.*, 2017) (Tortoli *et al.*, 2017) (**Figure 1**).

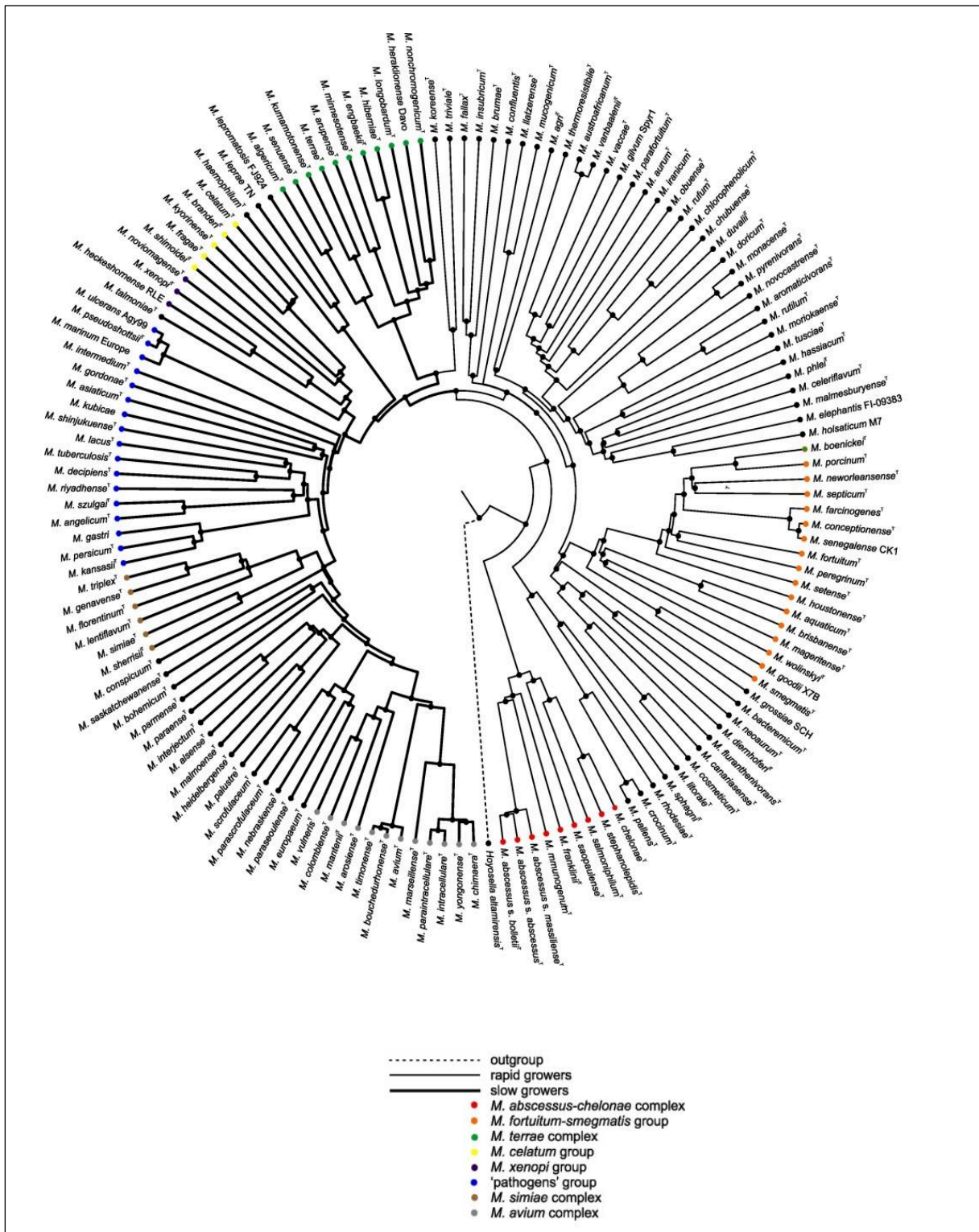


Figure 1 : Arbre phylogénétique du genre *Mycobacterium* basée sur la comparaison des génomes entiers (Tortoli *et al.*, 2017).

2. Caractéristiques des mycobactéries

Les mycobactéries possèdent trois caractéristiques principales :

2.1 Le contenu en guanine-cytosine (GC%) de l'ADN

Les génomes mycobactériens présentent un contenu élevé en guanine-cytosine (GC%) qui est compris entre 62 et 70% (Fedrizzi *et al.*, 2017). La taille des génomes varie de 3.2 à 8.1 mégabases (Mb) avec une moyenne de 5.7 Mb (Behra *et al.*, 2022). *Mycobacterium leprae* présente le plus petit génome de 3.27 Mb parmi les mycobactéries avec la plus faible richesse en GC qui est de 58% (Cole *et al.*, 2001).

2.2 L'enveloppe mycobactérienne

Les mycobactéries se caractérisent par une architecture d'enveloppe cellulaire unique, notamment caractérisée par une forte teneur en lipides qui représentent jusqu'à 60% du poids sec de l'enveloppe, contre seulement 5% chez d'autres bactéries Gram + ou 10% chez les Gram - (Daffé, 2015). Cette enveloppe se compose d'une membrane plasmique interne typique des membranes bactériennes, d'un squelette pariétal formé du complexe peptidoglycane (PG) - arabinogalactane (AG) - acides mycoliques (AMs), appelé paroi mycobactérienne et d'une membrane externe nommée mycomembrane. La capsule constitue la dernière couche de l'enveloppe mycobactérienne (Jackson, 2014) (**Figure 2**). La membrane plasmique est composée de protéines et de lipides polaires, majoritairement des phospholipides comme les phosphatidylinositol mannosides (PIMs). La mycomembrane est constituée d'une bicouche lipidique organisée de façon asymétrique, comprenant des AMs fixés à l'AG, mais également libres, ainsi que des lipides complexes. Ceux-ci comprennent des lipoglycane (lipomannanes (LMs) et lipoarabinomannanes (LAMs)), des glycolipides à base de tréhalose (mono/dimycolates de tréhalose (TMM/TDM)), des glycolipides phénoliques (phthiocerol dimycocerosates (PDIMs)) et des glycopeptidolipides (GPLs). Les GPLs, jouent un rôle important chez les mycobactéries dans la motilité, la formation de biofilm, le morphotype et la virulence. Les AMs sont des acides gras ramifiés à longue chaîne carbonée, représentant la moitié du poids de la paroi cellulaire, qui jouent des rôles clés dans la pathogénicité de *Mycobacterium tuberculosis* pendant la réplication active et les stades persistants de l'infection. L'incorporation des AMs rend les cellules mycobactériennes très hydrophobes. Finalement, la capsule est composée majoritairement de polysaccharides comme le D-arabino-D-mannane ainsi que de nombreuses protéines sécrétées par la bactérie jouant un rôle dans l'immuno-pathologie des mycobactéries pathogènes comme *M.*

tuberculosis (Brennan and Nikaido, 1995) (Draper, 1998) (Ojha *et al.*, 2005) (Gutiérrez *et al.*, 2018) (Parmar and Tocheva, 2023).

2.3 L'acido-alcoolo-résistance

Grâce à la forte imperméabilité de la paroi mycobactérienne à différents composés, les mycobactéries sont décrites comme des bacilles acido-alcoolo-résistants (BAAR). Cette propriété tinctoriale est mise en évidence par la coloration de Ziehl-Neelsen. Les bacilles, colorés en rouge par la fuchsine, restent teintés en présence du mélange acide chlorhydrique-éthanol, tandis que ce dernier décolore les autres micro-organismes (Vilchèze and Kremer, 2017) (Arteta *et al.*, 2022) (**Figure 3**). Cette coloration reste très utilisée, notamment dans les pays en voie de développement, car elle permet de détecter rapidement les BAAR dans les expectorations des patients atteints d'infection respiratoire à mycobactérie, comme pour la tuberculose, aidant ainsi à identifier les patients contagieux.

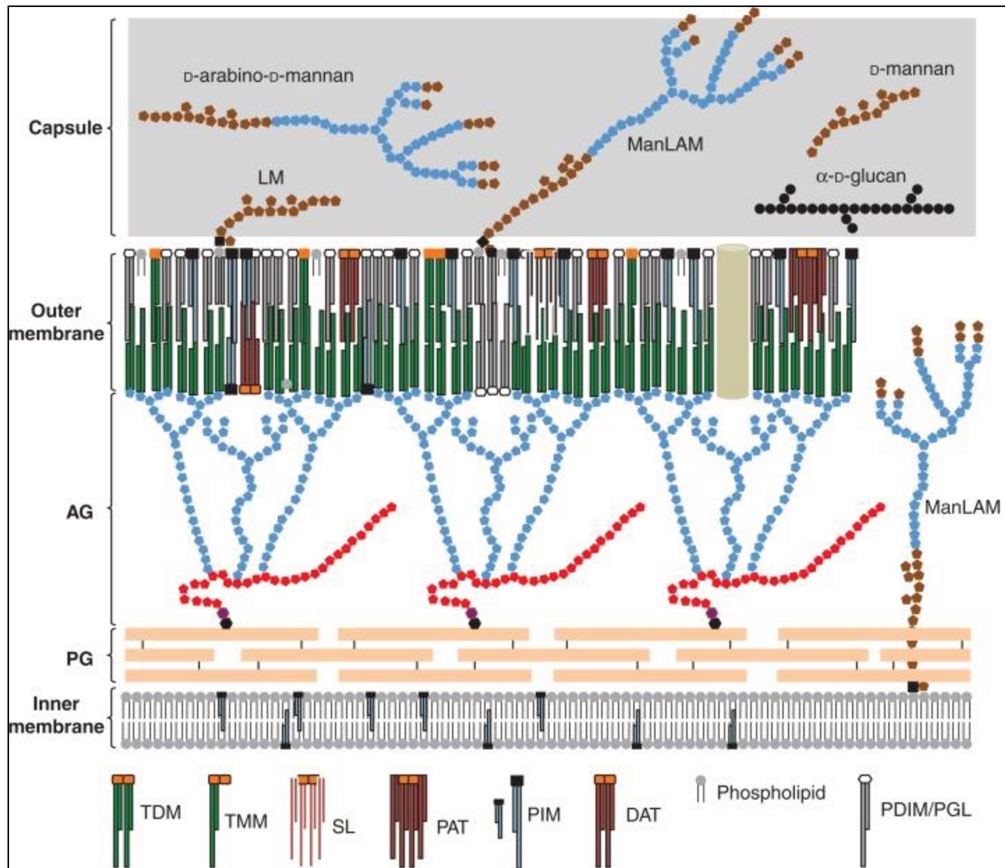


Figure 2 : Représentation schématique de l'enveloppe cellulaire de *Mycobacterium tuberculosis*. LM : lipomannan ; ManLAM : mannose capped lipoarabinomannan ; AG : arabinogalactan ; PG : peptidoglycan ; TDM: trehalose dimycolate ; TMM : trehalose monomycolates ; SL : sulfolipid ; PAT : polyacyltrehalose ; PIM : phosphatidylinositol mannosides ; DAT : diacyltrehalose ; PDMI/PGL : phthiocerol dimycocerosates/phenolic glycolipids (Jackson, 2014).

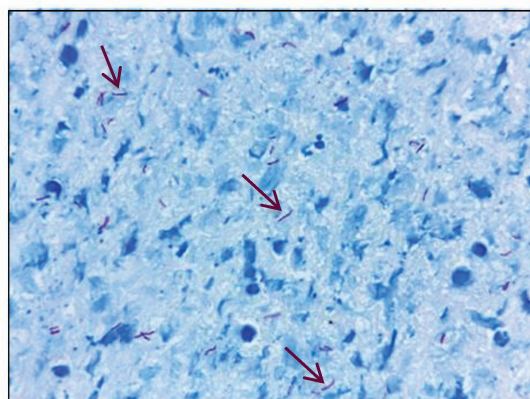


Figure 3 : Coloration de Ziehl-Neelsen. Mise en évidence des mycobactéries (bacilles roses montrés par des flèches) sur un prélèvement de lavage bronchoalvéolaire (100X) (Arteta *et al.*, 2022).

3. Pathologies associées aux mycobactéries

En plus de la pigmentation et de la vitesse de croissance, la pathogénicité est un critère supplémentaire permettant la classification des mycobactéries. Parmi les mycobactéries, 95% sont des bactéries environnementales présentes dans le sol, l'air et l'eau, alors que très peu d'espèces provoquent des maladies chez les humains et/ou les animaux (Angenent *et al.*, 2005) (Falkinham *et al.*, 2008).

Les mycobactéries pathogènes sont principalement composées de différentes espèces, notamment le complexe *Mycobacterium tuberculosis* (MTbC) (comme *M. tuberculosis*, *Mycobacterium africanum* et *Mycobacterium bovis*), qui sont responsables de la tuberculose chez les humains et les animaux. Ensuite, il y a *Mycobacterium ulcerans* et *Mycobacterium marinum*, qui provoquent des infections cutanées. Enfin, *M. leprae* qui est à l'origine de la lèpre (Johansen, Herrmann and Kremer, 2020) (**Figure 4**). Ces mycobactéries pathogènes strictes provoquent des maladies pulmonaires et extrapulmonaires atteignant tout organe. La tuberculose demeure une maladie infectieuse de première importance au niveau mondial, avec plus de 10 millions de cas et entraînant 1.4 millions de décès chaque année (Bouzeyen and Javid, 2022).

D'autres infections chez l'animal et l'Homme sont causées par des mycobactéries pathogènes opportunistes, principalement les MNT appartenant au complexe *Mycobacterium avium* (MAC), comprenant *M. avium*, *Mycobacterium intracellulare* et *Mycobacterium chimaera*, ainsi que le complexe *Mycobacterium chelonae-abscessus*, qui est composé de *Mycobacterium chelonae*, *Mycobacterium abscessus subsp. abscessus*, *M. abscessus subsp. bolletti* et *M. abscessus subsp. massiliense*. *Mycobacterium smegmatis* et *Mycobacterium gordonae*, sont les représentants saprophytes et non pathogènes des MNT (Johansen, Herrmann and Kremer, 2020) (**Figure 4**).

Toutes les espèces pathogènes strictes et opportunistes les plus fréquentes appartiennent au groupe des MCL (MTbC et MAC par exemple). Les MCR regroupent essentiellement des espèces saprophytes et le complexe *M. abscessus-chelonae* comme pathogènes opportunistes auquel nous pouvons ajouter des espèces plus rarement retrouvées comme *Mycobacterium fortuitum* (Johansen, Herrmann and Kremer, 2020) (**Figure 4**).

Non-tuberculous mycobacteria		
Rapidly growing mycobacteria	Slowly growing mycobacteria	
<i>M. chelonae</i> –abscessus complex <ul style="list-style-type: none"> • <i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i> • <i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i> • <i>M. abscessus</i> subsp. <i>massiliense</i> • <i>M. chelonae</i> <i>M. fortuitum</i>	<i>M. marinum</i> <i>M. ulcerans</i>	<i>M. tuberculosis</i> complex
<i>M. smegmatis</i> <i>M. vaccae</i>	<i>M. avium</i> complex <ul style="list-style-type: none"> • <i>M. avium</i> • <i>M. intracellulare</i> • <i>M. chimaera</i> <i>M. haemophilum</i> <i>M. xenopi</i> <i>M. kansasii</i> <i>M. simiae</i>	<i>M. leprae</i>
	<i>M. terrae</i> complex <i>M. goodii</i>	

<ul style="list-style-type: none"> True pathogens Opportunistic pathogens Saprophytes*

Figure 4 : Classification des mycobactéries selon leur temps de croissance et leur pathogénicité (Johansen, Herrmann and Kremer, 2020).

Une caractéristique des infections par les MNT est l'acquisition potentielle des mycobactéries à partir de l'environnement. Les MNT ne se transmettent pas de personne à personne, contrairement aux mycobactéries tuberculeuses qui se propagent exclusivement d'hôte à hôte (Turenne, 2019). La manifestation clinique la plus fréquente de l'infection par les MNT est la maladie pulmonaire. Les infections systémiques et/ou disséminées peuvent également être présentes (Sharma and Upadhyay, 2020), notamment dans un contexte d'immunosuppression (syndrome d'immunodéficience acquise) (Rosain *et al.*, 2019), ou de transplantation (Richey *et al.*, 2013). En raison de leur multirésistance aux antibiotiques, il est important de noter que les infections causées par les MNT peuvent représenter un problème de santé publique. Plusieurs études ont rapporté une résistance élevée des MNT à différentes molécules d'antibiotiques telles que la rifampicine, la clarithromycine, l'éthambutol, la ciprofloxacine, la rifabutine et la linézolide (Araj *et al.*, 2019) (Zhou *et al.*, 2020) (Akrami *et al.*, 2023). En effet, la prévalence des MNT augmente dans certains pays, notamment les pays développés, où la tuberculose diminue (Marras *et al.*, 2013) (Gopaldaswamy *et al.*, 2020).

Plusieurs facteurs liés à l'hôte et favorisant une susceptibilité importante aux infections MNT ont été décrits, tels que les maladies pulmonaires sous-jacentes (y compris la mucoviscidose et la bronchectasie) (Griffith *et al.*, 2007), l'immunosuppression (Brown-Elliott and Philley, 2017) et l'antibiothérapie à large spectre (Catherinot *et al.*, 2013). Chez les patients immunodéprimés, classiquement les patients séropositifs pour le virus de l'immunodéficience humaine (VIH), *M. avium* est responsable d'infections pulmonaires et disséminées,

soulignant le rôle crucial des lymphocytes T CD4⁺ dans le contrôle de l'infection mycobactérienne (Collins, 1989) (Procop, 2017). Des mutations de la voie de l'interféron- γ augmentent le risque d'infection par *M. avium* et *M. abscessus* (Casanova and Abel, 2022). De même, les personnes qui reçoivent une immunothérapie par anti-TNF (anti-tumor necrosis factor) sont plus susceptibles de contracter des infections aux MNT et aux mycobactéries pathogènes (Mufti *et al.*, 2005) (Rosain *et al.*, 2019).

Chapitre II : *Mycobacterium abscessus*, un pathogène opportuniste chez l'Homme

1. Le complexe *M. abscessus* et l'individualisation phylogénétique de *M. abscessus*

L'histoire des principales espèces pathogènes opportunistes appartenant au groupe des MCR remonte au début du 20^{ème} siècle avec la découverte de *M. chelonae* en 1903 dans les poumons de deux tortues de mer par Friendman (Cobbett, 1918). Environ 50 ans plus tard, *M. abscessus* a été isolée pour la première fois à partir d'un abcès sous-cutané du genou chez une jeune fermière, aux États-Unis. C'est ainsi que le terme "*abscessus*" a été utilisé, faisant référence à la présence d'un abcès (Moore and Frerichs, 1953). Selon la classification de Runyon, *M. abscessus* appartient au groupe IV des mycobactéries (**Tableau 1**). Au fil du temps, la classification de l'espèce *M. abscessus* a été sujette à de nombreux changements (Lopeman *et al.*, 2019) (**Figure 5**).

Jusque dans les années 1990, *M. abscessus* a été regroupée avec *M. chelonae* dans le complexe *M. fortuitum*, sous le groupe "*chelonae-abscessus*", où *M. abscessus* était considérée comme une sous-espèce de *M. chelonae* en raison de leurs caractéristiques biochimiques très similaires (Kubica *et al.*, 1972). En 1992, à la suite du développement des techniques d'hybridation ADN-ADN, Kusunoki et Ezaki ont montré qu'il n'existait que 35 % de parenté génétique entre *M. chelonae subsp. chelonae* et *M. chelonae subsp. abscessus*. À la lumière de ces résultats, *M. abscessus* a finalement été reclassée au rang d'espèce (Kusunoki and Ezaki, 1992). Si le groupe *M. chelonae* se caractérise par des concentrations minimales inhibitrices (CMI) élevées pour la céfoxitine (> 64 mg/L) et une sensibilité à la tobramycine (CMI ≤ 4 mg/L), *M. abscessus*, en revanche, présente des CMI plus faibles pour la céfoxitine (CMI ≤ 64 mg/L) et une résistance à la tobramycine (CMI > 8 mg/L) (Yakrus *et al.*, 2001).

La taxonomie de *M. abscessus* a connu par la suite une évolution rapide dans les années 2000 avec la caractérisation de deux nouvelles espèces, qui se sont avérées être en réalité des sous-espèces de *M. abscessus* (Adékambi and Drancourt, 2004) (Adékambi *et al.*, 2006). La classification de ces deux nouvelles sous-espèces était basée sur une caractérisation biochimique et sur le séquençage des gènes *hsp65* et *rpoB*. La première sous-espèce, appelée *Mycobacterium massiliense*, a été isolée en 2004 à partir d'un échantillon d'expectoration (Adékambi and Drancourt, 2004). La seconde, appelée *Mycobacterium bolletii*, a été isolée en 2006 à partir d'un échantillon provenant des voies respiratoires (Adékambi *et al.*, 2006). En 2011, une modification du complexe *M. abscessus* a été proposée en incluant *M.*

abscessus subsp. *abscessus* et en combinant les deux sous-espèces pour former une seule sous-espèce, *M. abscessus* subsp. *bolletii* (Leao *et al.*, 2011). Finalement, en 2013, des études phylogénétiques basées sur des comparaisons de génomes entiers ont conduit à la création du complexe *M. abscessus*, englobant les trois sous-espèces suivantes : *M. abscessus* subsp. *abscessus*, *M. abscessus* subsp. *massiliense*, *M. abscessus* subsp. *bolletii*, connues respectivement sous les noms de *M. abscessus*, *M. massiliense* et *M. bolletii* (Cho *et al.*, 2013) (Tortoli *et al.*, 2016). Ces trois sous-espèces se distinguent principalement par leurs différences de sensibilité aux antibiotiques, ce qui rend essentiel de déterminer la sous-espèce spécifique avant de choisir un traitement clinique approprié (Benwill and Wallace, 2014).

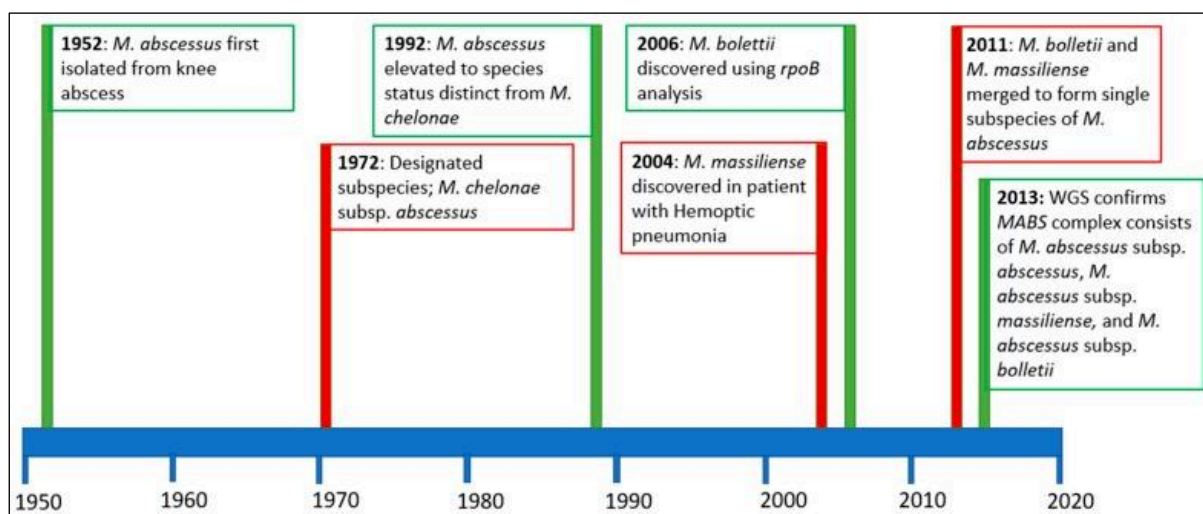


Figure 5 : Principaux changements taxonomiques de *M. abscessus* depuis sa découverte en 1952 et jusqu'à aujourd'hui (Lopeman *et al.*, 2019).

2. Analyse des caractéristiques génomiques de *M. abscessus*

Suite à la reconnaissance de *M. abscessus* en tant qu'entité distincte présentant une importance clinique parmi les NMT, ainsi qu'au développement de méthodes moléculaires d'identification des mycobactéries, notre équipe a réalisé le séquençage du génome entier de la souche CIP-104536T en 2009 (Collection Institut Pasteur) afin de mieux caractériser cette espèce (Ripoll *et al.*, 2009) (**Figures 6A et 6B**).

2.1 Caractéristiques générales du génome et comparaison avec d'autres espèces de mycobactéries

Tout d'abord, le génome de *M. abscessus* est composé d'un chromosome circulaire de 5 067 172 paires de bases (pb) et d'un plasmide de 23 319 pb (**Figure 6A**). Cette taille est proche de la taille du génome de *M. tuberculosis* (4.4 Mb), et environ 1.92 Mb plus petit que le génome de *M. smegmatis*. Le génome de *M. abscessus* comprend 4920 séquences codantes prédites (CDS) avec une capacité de codage de 93 %, et une richesse en GC de 64 % (Ripoll *et al.*, 2009).

En ce concerne la fonctionnalité du génome de *M. abscessus*, 60.5% des régions ont des fonctions biologiques attribuées, 27.5% codent des protéines hypothétiques conservées et 12% sont uniques à *M. abscessus*. Comparé à *M. smegmatis*, Le génome de *M. abscessus* code pour plus de protéines potentiellement associées à la pathogénicité et moins de protéines impliquées dans l'adaptation à divers environnements (Ripoll *et al.*, 2009).

Malgré la classification de *M. abscessus* parmi les MCR, cette bactérie partage aussi certaines caractéristiques avec *M. tuberculosis*. Tout comme *M. tuberculosis*, *M. abscessus* possède un seul ARN ribosomal (ARNr), contrairement à d'autres MCR qui possèdent deux opérons d'ARN ribosomal (Kim *et al.*, 2008) (Stinear *et al.*, 2008). En plus, le chromosome de *M. abscessus* comprend 47 gènes d'ARN de transfert (ARNt) et seulement 5 séquences d'insertions (IS). Comparativement, le génome de *M. smegmatis* présente 23 fois plus d'IS que *M. abscessus*. La présence d'un grand nombre de séquences d'IS chez *M. smegmatis* reflète sa capacité d'adaptation à l'environnement, sa plasticité génomique et son potentiel évolutif, ce qui lui permet de survivre dans des habitats divers (Ripoll *et al.*, 2009).

M. abscessus possède un plasmide de résistance au mercure avec une teneur en GC de 68%. Il présente 99.9% d'homologie avec le plasmide de résistance au mercure *pMM23* de 23 kilobases (kb) de *M. marinum* (Stinear *et al.*, 2008) (**Figure 6B**). Ce plasmide porte un opéron *mer* avec des gènes codant pour des protéines de type réductase de mercure lui conférant une résistance aux composants organo-mercuriels. Il contient également deux gènes

(*MAB_p04c* et *MAB_p10*) codant pour des recombinaisons spécifiques et une relaxase – hélicase (*MAB_p15c*) jouant un rôle dans les phénomènes de conjugaison et de mobilité (Ripoll *et al.*, 2009).

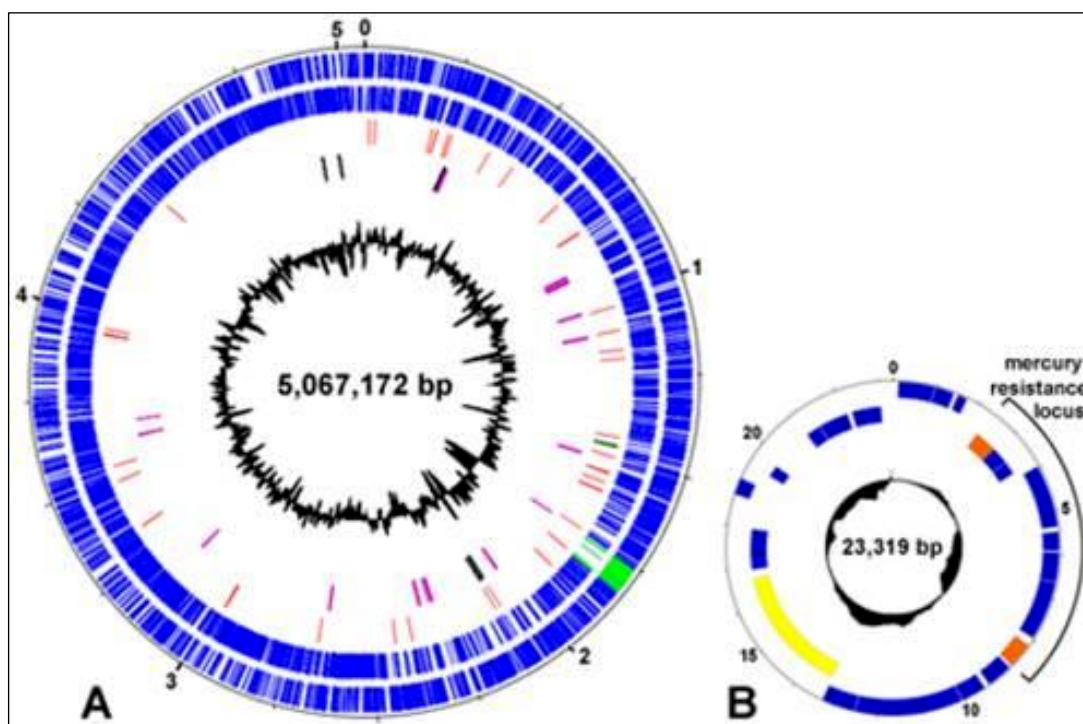


Figure 6 : Représentation du génome de *M. abscessus* CIP-104536T.

(A) : Représentation circulaire du chromosome de *M. abscessus* CIP-104536T. De l'extérieur vers l'intérieur : Les deux premiers cercles (lignes bleues) représentent les gènes sens et antisens. Les traits verts clairs montrent les gènes du phage. Le troisième cercle montre les 47 gènes de l'ARNt (en rouge) et l'opéron de l'ARNr (en vert foncé). Le quatrième cercle montre les gènes acquis par transfert horizontal (en violet) et les séquences d'insertion (en noir). L'histogramme intérieur donne le pourcentage en contenu GC de chaque région.

(B) : Représentation circulaire du plasmide de résistance au mercure de *M. abscessus* CIP-104536T. Les gènes et le pourcentage en contenu GC sont représentés en bleu et noir respectivement. En orange, sont représentés les deux gènes *MAB_p04c* et *MAB_p10* codant pour des recombinaisons spécifiques et en noir, est représenté le gène (*MAB_p15c*) codant pour une relaxase – hélicase (Ripoll *et al.*, 2009).

2.2 Interaction génétique et environnementale

a. Le réservoir de *M. abscessus*

Les MNT sont des bactéries qui vivent dans un large éventail d'environnements hydrotelluriques, y compris le sol, l'eau, les biofilms et divers habitats naturels (Bryant *et al.*, 2013). Si la présence de certaines espèces MNT telles que *M. avium*, *M. marinum*, *M. fortuitum* et *M. chelonae* a été montrée dans ces réservoirs grâce à leur caractère hydrophobe qui favorise leur adhérence aux surfaces et la formation de biofilms, le réservoir environnemental de *M. abscessus* ne semble pas encore clairement défini (Griffith *et al.*, 2007) (El Amrani *et al.*, 2010) (To *et al.*, 2020) (Akram *et al.*, 2023).

Selon les études, *M. abscessus* a été isolée une seule fois dans de l'eau potable en Australie (Thomson *et al.*, 2013a). En dehors de cette observation, cette bactérie n'a été jamais isolée dans l'environnement (Mougari *et al.*, 2016). Cependant, plusieurs gènes chez *M. abscessus* ont été identifiés comme étant liés à sa présence dans l'environnement (Ripoll *et al.*, 2009). Parmi ces gènes, on observe la présence de ceux qui sont impliqués dans la résistance à l'arsenic, une caractéristique fréquente chez les bactéries environnementales. De même, l'analyse du génome a révélé des regroupements de gènes synténiques provenant d'organismes non-mycobactériens tels que *Rhodococcus sp.*, *Streptomyces sp.* et *Nocardia sp.*, des actinobactéries environnementales caractérisées par une forte teneur en GC. Ces gènes non-mycobactériens ont été acquis par transfert horizontal et sont totalement absents chez d'autres espèces de mycobactéries séquencées. *M. abscessus* contient également des gènes retrouvés chez d'autres pathogènes associés à la mucoviscidose, tels que *Pseudomonas aeruginosa* et *Burkholderia cepacia*. La présence d'un plasmide de résistance au mercure présentant 99.9% d'homologie avec l'épisode de *M. marinum* suggère que ces deux mycobactéries ont pu échanger ce plasmide en partageant le même écosystème. Notamment, plusieurs études ont mis en évidence que *M. abscessus* et *M. marinum* sont tous deux capables de provoquer des infections chez les poissons, ce qui pourrait être un environnement propice à de telles interactions (Clayton *et al.*, 2012) (Puk and Guz, 2020).

Ces échanges génétiques horizontaux se produisent dans un écosystème partagé en particulier à l'interface eau-sol. Les amibes, protozoaires vivant dans les interfaces eau-sol-végétaux pourraient être le réservoir environnemental de *M. abscessus*. Notre équipe a pu montrer que *M. abscessus* peut se multiplier au sein d'amibes (Laencina *et al.*, 2018). De plus, la co-culture d'amibes et de *M. abscessus* avant l'infection chez la souris a démontré une augmentation de la virulence de la mycobactérie (Bakala N'Goma *et al.*, 2015). En effet, la vie intra-amibienne de *M. abscessus* contribue à son adaptation aux phagocytes de l'hôte

humain, lui permettant de passer de son statut d'organisme environnemental à celui de pathogène adapté à l'Homme (Johansen *et al.*, 2020). Cependant, bien que *M. abscessus* puisse se multiplier au sein d'amibes, il n'a jamais été isolé dans des amibes environnementales libres contrairement à d'autres MNT (Ovrutsky *et al.*, 2013). La compréhension complète de l'adaptation environnementale de *M. abscessus* nécessite des recherches supplémentaires et une analyse plus approfondie de son génome et de son comportement dans différents milieux.

b. La transmission de *M. abscessus*

Étant donné que le réservoir de *M. abscessus* n'a jamais été confirmé, les voies exactes de sa transmission ne sont pas bien comprises à ce jour. Comme pour tous les MNT responsables de mycobactérioses pulmonaires, ces infections sont transmises à la suite d'un contact direct de l'hôte avec le réservoir environnemental. Des études réalisées suggèrent que les infections à *M. abscessus* peuvent être contractées par la contamination avec des souches environnementales présentes dans les réseaux d'eau potable. Les deux études australiennes publiées par Thomson et ses collaborateurs (2013) ont montré la présence d'une forte similitude entre des souches de *M. abscessus* isolées de patients présentant des infections pulmonaires et celles provenant de prélèvements d'eau potable. L'équipe a également réussi à identifier chez une patiente la même souche de *M. abscessus* que celle déjà trouvée dans la tuyauterie du réseau d'eau potable qui desservait son domicile (Thomson *et al.*, 2013a) (Thomson *et al.*, 2013b). La forte similarité entre les souches de *M. abscessus* provenant de l'eau potable et celles responsables des infections chez les humains de la même zone géographique renforce l'hypothèse selon laquelle l'eau potable pourrait être la source d'infection chez ces patients.

La plupart des infections à *M. abscessus* chez les patients atteints de mucoviscidose sont dues à une transmission via des fomites ou par aérosol (Falkinham, 2011) (Bryant *et al.*, 2013) (Bryant *et al.*, 2016). Les cas de transmission interhumaine directe n'ont pas pu être véritablement démontrés. Cependant, au cours des dernières années, la possibilité d'une transmission interhumaine a été suggérée grâce au séquençage du génome entier (Bryant *et al.*, 2021). Les résultats de l'étude menée par Bryant et ses collègues (2016) ont révélé que parmi les 1080 isolats cliniques de *M. abscessus* provenant de patients atteints de mucoviscidose en Europe, aux États-Unis et en Australie, 74% des isolats étaient regroupés en trois clones circulants dominants présents dans tous les centres médicaux où les échantillons cliniques ont été prélevés. Les polymorphismes mononucléotidiques (SNPs) des souches regroupées étaient inférieurs à 20 (Bryant *et al.*, 2016). Bien que cela ait suggéré une

potentielle transmission interhumaine, le fait que cela soit retrouvé chez des patients géographiquement séparés indiquerait l'existence de clones dominants responsables des pathologies respiratoires contractées par les patients atteints de mucoviscidose (Bryant *et al.*, 2021). Selon une autre étude, trois patients atteints de mucoviscidose hospitalisés en même temps dans le même centre, mais dans des chambres séparées ont été infectés par des isolats de *M. abscessus* qui différaient par moins de 7 SNPs, confirmant une transmission par aérosol ou par les fomites (Yan *et al.*, 2020) comme évoqué précédemment. De même, il y avait une forte similarité entre les génomes de ces isolats et ceux qui avaient été décrits précédemment par Bryant et ses collaborateurs (2016). Ces résultats soulignent donc la notion de clones prédominants de *M. abscessus* qui seraient responsables d'infections pulmonaires dans les centres de mucoviscidose à travers le monde (Yan *et al.*, 2020). Finalement, étant donné que *M. abscessus* peut être retrouvé chez des poissons et des animaux, cela suggère aussi qu'ils pourraient potentiellement servir de réservoirs pour les infections humaines (Jassies-van der Lee *et al.*, 2009) (Reisfeld *et al.*, 2018) (Puk *et al.*, 2018).

2.3 Exploration de l'impact génomique sur la virulence de *M. abscessus*

Comme d'autres bactéries pathogènes, le génome de *M. abscessus* code des gènes de virulence qui favorisent l'invasion et la colonisation des cellules hôtes, sa croissance intracellulaire, ainsi que sa résistance aux mécanismes de défense de l'hôte. Ces gènes codent pour des protéines appartenant à diverses catégories fonctionnelles, telles que les protéines de l'enveloppe, les systèmes de sécrétion, les transporteurs de métaux, les protéines de résistance aux facteurs antimicrobiens, ainsi que d'autres protéines dont leurs fonctions restent inconnues ou sont en cours d'étude (Ripoll *et al.*, 2009) (Choo *et al.*, 2014). *M. abscessus* partage de nombreux facteurs de virulence avec *M. tuberculosis* (Sayes *et al.*, 2012). Comme mentionné précédemment dans ce chapitre (partie 2.2.1), l'analyse du génome a suggéré l'acquisition par *M. abscessus* des facteurs de virulence de bactéries environnementales grâce au transfert horizontal de gènes. De plus, son tropisme pulmonaire pourrait faciliter l'acquisition de nouveaux gènes provenant d'autres pathogènes pulmonaires (Ripoll *et al.*, 2009) (Choo *et al.*, 2014). On distingue alors deux types de gènes codant pour des facteurs de virulence dans le génome de *M. abscessus* : les gènes d'origine non-mycobactérienne et les gènes d'origine mycobactérienne.

a. Gènes codant des facteurs de virulence d'origine non-mycobactérienne

- Le gène *MAB_0555* qui code pour une phospholipase C (PLC), absente chez la plupart des autres MCR, tels que *M. chelonae* et *M. smegmatis* et chez la MCL *M. avium* (Ripoll *et al.*, 2009). Chez *M. abscessus*, cette protéine présente une forte similitude avec les protéines PLC de *Streptomyces spp*, *Chromobacterium violaceum* et *P. aeruginosa* (Ripoll *et al.*, 2009). Les PLC sont connues pour leur rôle dans la virulence des pathogènes intracellulaires, en permettant aux bactéries intracellulaires comme *Listeria monocytogenes* de s'échapper des vacuoles phagocytaires (Marquis and Hager, 2000). De manière intéressante, chez *M. abscessus*, l'expression du gène *plc* n'est induite qu'après une co-culture avec des amibes, entraînant une augmentation de la virulence de *M. abscessus* chez la souris (Bakala N'Goma *et al.*, 2015). Ces résultats soutiennent à nouveau l'hypothèse selon laquelle *M. abscessus* a pu évoluer dans un environnement en contact avec des amibes et d'autres bactéries pathogènes, et mettent en évidence le rôle crucial des amibes en tant que contributeur de sa virulence.
- Le gène *MAB_3593* qui code pour la protéine MgtC (Mg²⁺ Transport protein C), absente chez *M. smegmatis* mais présente chez *M. chelonae* (Ripoll *et al.*, 2009). Cette protéine joue un rôle dans l'homéostasie du magnésium en augmentant la concentration intracellulaire en Mg²⁺, favorisant ainsi la survie intracellulaire des bactéries, telles que *Salmonella sp.* (Choo *et al.*, 2014), *Bordetella pertussis* (Cafiero *et al.*, 2018), *M. marinum* (Belon *et al.*, 2014) et *M. tuberculosis* (Buchmeier *et al.*, 2000). Chez *M. abscessus*, la protéine MgtC est induite en réponse à une faible concentration en Mg²⁺ dans le milieu de culture ainsi qu'à l'intérieur des macrophages. Le gène *mgtC* aurait probablement été acquis par transfert génétique horizontal chez *M. abscessus* à partir d'autres actinobactéries. En raison de son rôle immunogène, cette protéine présente un potentiel thérapeutique prometteur dans le développement de vaccins (Ripoll *et al.*, 2009) (Le Moigne *et al.*, 2016).
- Le gène *MAB_0120* qui code la protéine MrsA, une méthionine sulfoxyde réductase. Ce gène montre une forte similitude avec celui trouvé chez *Rhodococcus sp.* (Ripoll *et al.*, 2009). MrsA est impliquée dans la protection de la bactérie contre les dommages oxydatifs induits par les dérivés azotés produits par les macrophages (St John *et al.*, 2001) (Taylor *et al.*, 2003).
- Le locus des gènes *MAB_1501-MAB_1504* qui code pour des transporteurs de fer de type ABC (ATP-Binding Casette). Ces gènes jouent un rôle dans la captation du fer en raison de sa concentration limitée dans les hôtes vivants chez *M. abscessus*, ainsi que chez

d'autres bactéries pathogènes comme *Salmonella sp.*, *Burkholderia sp.* et *Rhodococcus sp.* (Ripoll *et al.*, 2009).

- Le locus des gènes *MAB_0295-MAB_0298* qui est impliqué dans la biosynthèse des phénazines. Les composés phénaziniques, tels que la pyocyanine, semblent jouer un rôle dans la virulence et la persistance de *P. aeruginosa* chez les patients atteints de mucoviscidose (Lau *et al.*, 2004) (Ripoll *et al.*, 2009).
- Le locus des gènes *MAB_0906-MAB_0910* qui joue un rôle dans la dégradation de l'acide phénylacétique. Ces gènes ont probablement été acquis des β -protéobactéries chez *M. abscessus* et sont présents chez *B. cepacia*, où le gène *paa* (*MAB_0910*) est requis pour la survie intracellulaire dans un modèle d'infection pulmonaire chronique de rat (Hunt *et al.*, 2004) (Ripoll *et al.*, 2009).
- Le locus *dnd* (*MAB_1093c-MAB_1098*) qui code des cystéines désulfurases, enzymes impliquées dans la dégradation de l'ADN. Ces gènes sont retrouvés en grande quantité dans le mucus bronchique des patients atteints de mucoviscidose, ce qui en fait une source de nutriments potentiellement importante pour *M. abscessus* (Zhang *et al.*, 2004) (Ripoll *et al.*, 2009).

b. Gènes codant des facteurs de virulence d'origine mycobactérienne

- Les gènes *mce* (mammalian cell entry) jouent un rôle crucial dans la virulence et l'interaction des mycobactéries avec les cellules des mammifères. Ces gènes codent pour les protéines Mce, essentielles pour la reconnaissance et l'invasion cellulaire des mycobactéries, favorisant ainsi leur internalisation dans les cellules hôtes (Kumar *et al.*, 2005). Le génome de *M. tuberculosis* code 7 opérons *mce*. Chez *M. abscessus*, les gènes *mce* sont également regroupés de façon similaire, soulignant leur rôle dans la virulence. En revanche, *M. smegmatis* ne possède que 4 opérons de *mce*, dont l'un est interrompu par une insertion (Ripoll *et al.*, 2009). Il a été suggéré que le nombre d'opérons *mce* pourrait être un indicateur de pathogénicité chez les actinomycètes (Ishikawa *et al.*, 2004). En plus de leur rôle dans l'invasion et la survie intracellulaire, ces protéines jouent un rôle dans l'absorption et le transport de nutriments. Elles sont également impliquées dans la modulation de la réponse immunitaire de l'hôte en interférant avec la voie de signalisation de l'immunité innée, favorisant ainsi l'évasion du système immunitaire de l'hôte et permettant aux mycobactéries de persister et de se propager (Isom *et al.*, 2017) (Fenn *et al.*, 2020) (Klepp *et al.*, 2022).

- Les gènes codant pour les protéines de la famille MmpL (Mycobacterial membrane protein Large) jouent également un rôle fondamental dans la physiologie et la virulence de *M. abscessus*. Ces MmpLs, quasi spécifiques des *Actinomycétales*, correspondent à des transporteurs transmembranaires chez les mycobactéries. Elles jouent un rôle dans le transport des lipides complexes à travers la membrane cellulaire de la bactérie et contribuent ainsi à l'élaboration de l'enveloppe mycobactérienne. Leur implication dans ce processus est essentielle pour la pathogénèse (Viljoen *et al.*, 2017). Certaines protéines MmpL telles que MmpL3 et MmpL5 se sont révélées être des pompes participant à l'efflux actif de médicaments antituberculeux (Hartkoorn *et al.*, 2014) (Bailo *et al.*, 2015). Chez *M. abscessus*, des travaux réalisés dans notre équipe ont mis en évidence le rôle crucial de la protéine MmpL8, codée par le gène *MAB_0855*, dans la croissance intracellulaire de la bactérie au sein d'amibes et de macrophages (Dubois *et al.*, 2018). MmpL8 est le transporteur d'un lipide complexe, le glycosyl diacylated nonadecyl diol (GDND). La mutation du gène *mmpL8* entraîne un défaut d'adhésion et de croissance intracellulaire de *M. abscessus*, lié à une absence de rupture de la membrane du phagosome chez les cellules infectées. En outre, son absence a montré une atténuation de la virulence de *M. abscessus* chez la souris et les poissons-zèbres (Dubois *et al.*, 2018).
- Les deux loci ESX (Early Antigenic Secretion System), ESX3 et ESX4, qui appartiennent au système de sécrétion de type VII. Diverses fonctions ont été assignées aux systèmes ESX, telles que la virulence, l'absorption de nutriments et d'ions, le transport et la sécrétion de toxines, ainsi que la conjugaison mycobactérienne (Tufariello *et al.*, 2016) (Lagune *et al.*, 2022). À titre comparatif, les mycobactéries strictement pathogènes telles que *M. marinum* et *M. tuberculosis* possèdent respectivement 4 loci ESX (ESX1-4) ou 5 loci ESX (ESX1-5). En revanche, *M. abscessus* ne présente que les deux loci ESX3 et ESX4 (Ripoll *et al.*, 2009) (Lagune *et al.*, 2021). Le système ESX-3 joue un rôle crucial dans l'absorption des métaux et dans l'adaptation des mycobactéries aux environnements déficients en zinc (Siegrist *et al.*, 2009). Par ailleurs, le système ESX-4 intervient dans la survie intracellulaire de *M. abscessus* au sein des amibes et des macrophages, en bloquant l'acidification du phagosome et en induisant la rupture de la membrane phagosomale (Laencina *et al.*, 2018).
- Les gènes codant pour les protéines PE (proline-glutamate) et pour les protéines PEE (proline-proline-glutamate). Ces deux types de protéines sont considérées comme des protéines associées à la surface cellulaire des mycobactéries, jouant un rôle dans l'interaction hôte-pathogène et l'évasion immunitaire (Saini *et al.*, 2016) (Ates, 2020).

Qu'elles soient associées à la surface ou sécrétées sous forme soluble, les protéines PE et PEE sont d'abord transportées à travers les membranes internes bactériennes par leurs systèmes de sécrétion de Type VII spécifiques (Beckham *et al.*, 2017).

- Les gènes codant pour des facteurs de transcription tels que les facteurs sigma (SigA, SigC, SigD, SigE et SigH), connus pour contrôler des facteurs de virulence chez les mycobactéries (Manganelli, 2014). Par exemple, il a été montré que les gènes *sigD* et *sigE* sont impliqués dans la viabilité des bactéries phagocytées par les macrophages en leur conférant une résistance au stress oxydatif (Calamita *et al.*, 2005) (Sachdeva *et al.*, 2010). D'autres régulateurs transcriptionnels tels que *whiB*, *dos* et *mpr* ont été décrits chez *M. abscessus*, comme jouant un rôle dans la résistance aux antibiotiques, l'adaptation au stress et la persistance des mycobactéries (Forrellad *et al.*, 2013) (Chen *et al.*, 2013) (Hurst-Hess *et al.*, 2017).

2.4 La transition S/R : de mutations génétiques irréversibles à l'origine d'une hétérogénéité phénotypique

a. Les morphotypes lisse et rugueux de *M. abscessus*

M. abscessus présente deux morphotypes différents qui peuvent être facilement identifiés sur milieu de culture solide : le morphotype S pour "Smooth" (lisse) et le morphotype R pour "Rough" (rugueux) (Byrd and Lyons, 1999). Le morphotype S donne des colonies lisses, bien rondes, d'aspect brillant, tandis que le morphotype R donne des colonies sèches et rugueuses aux bordures irrégulières (**Figure 7**).

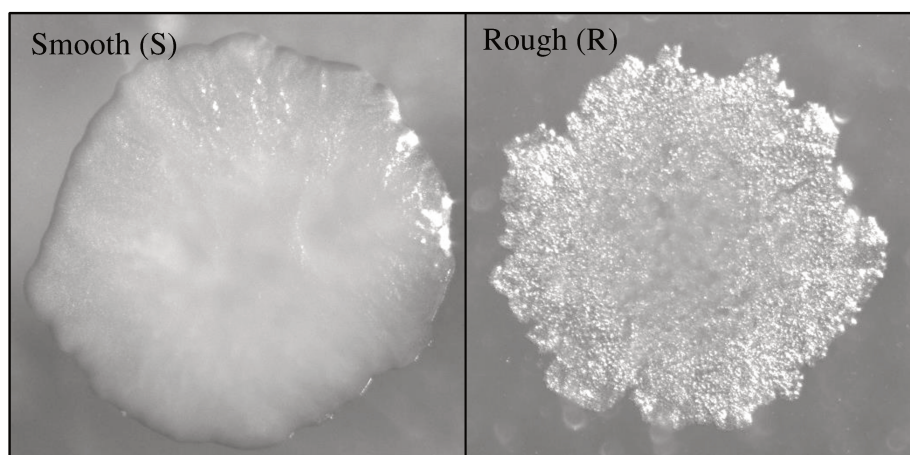


Figure 7 : Morphologie des colonies observées par la loupe binoculaire pour les morphotypes lisse (S) et rugueux (R) de *M. abscessus* sur le milieu de culture solide 7H11.

La principale différence entre ces deux morphotypes réside dans l'absence des glycopeptidolipides (GPLs) à la surface du morphotype R. Par conséquent, ce dernier perd sa motilité ainsi que sa capacité à former des biofilms (Howard *et al.*, 2006) (Ripoll *et al.*, 2007). L'existence de morphotypes est une caractéristique aussi observable chez d'autres mycobactéries, telles que *M. avium*, *Mycobacterium gilvum*, et *Mycobacterium kansasii* (Julián *et al.*, 2010), et qui pourrait être influencée par divers facteurs, notamment l'absence de lipooligosaccharides dans le morphotype R de *M. kansasii* et l'absence d'un polyester saturé dans le morphotype R de *Mycobacterium vaccae* (Rodríguez-Güell *et al.*, 2006) (Agustí *et al.*, 2008). En outre, le morphotype R a la capacité de s'agréger et de former des cordes en milieu de culture liquide (Cortes *et al.*, 2010) (Sánchez-Chardi *et al.*, 2020) (**Figure 8**). Cette caractéristique d'agrégation est notamment observée chez d'autres mycobactéries telles que *M. tuberculosis*, *M. gilvum*, *M. vaccae*, et *M. marinum* (Julián *et al.*, 2010).

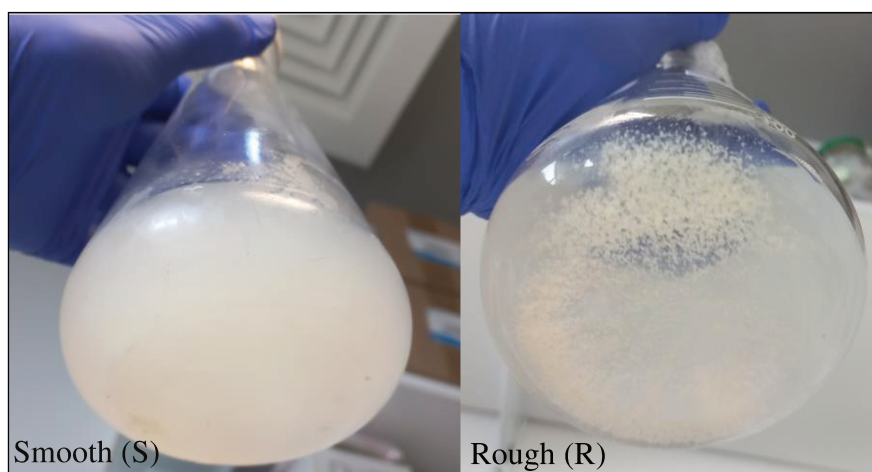


Figure 8 : Cultures liquides des morphotypes lisse (S) et rugueux (R) de *M. abscessus* en milieu 7H9. Le morphotype R forme des agrégats bien visibles au fond de la culture.

Le morphotype S est considéré comme la forme infectante pour l'Homme. La transition de morphotypes survient exclusivement *in vivo*, au cours des infections pulmonaires persistantes, et s'observe toujours dans le sens S vers R. Cette transition est irréversible (Pawlik *et al.*, 2013). Effectivement, plusieurs études ont signalé la présence de colonies issues des deux morphotypes S et R chez des patients infectés et présentant des infections pulmonaires sévères (Jönsson *et al.*, 2007) (Rüger *et al.*, 2014). De plus, une étude a rapporté l'émergence du morphotype R chez un patient atteint de mucoviscidose, initialement infecté par un morphotype S de *M. abscessus* (Catherinot *et al.*, 2009). En laboratoire, des colonies

de morphotype R ont été isolées chez des souris dépourvues de réponse humorale, et ce, 45 jours après injection intraveineuse du morphotype S (Rottman *et al.*, 2007).

b. Analyse comparative des génomes S et R de *M. abscessus*

Comme indiqué précédemment, la transition irréversible S vers R est associée à une perte de la capacité de *M. abscessus* à produire des GPLs à sa surface membranaire. Afin de rechercher les mécanismes moléculaires impliqués dans cette transition S/R, notre équipe a réalisé une analyse transcriptomique et génomique à l'aide de trois couples isogéniques de *M. abscessus* (Pawlik *et al.*, 2013) ;

- 19977-AT-S et 19977-AT-R : American Type Culture Collection,
- 19977-IP-S et 19977-IP-R : Collection de l'Institut Pasteur (CIP),
- CF-S et CF-R : couple isogénique isolé à partir d'échantillons pulmonaires d'un patient hospitalisé atteint de mucoviscidose (Catherinot *et al.*, 2009).

Le séquençage complet des génomes S et R pour les trois couples isogéniques a révélé la présence de polymorphismes nucléotidiques, ainsi que des délétions et des insertions (indels) dans le morphotype R, au sein du locus des gènes *mps1* (*MAB_4099c*), *mps2* (*MAB_4098c*) (gènes de synthèse non ribosomique de peptides) et *gap* (*MAB_4097c*) (gène de transport de glycopeptidolipides), tous impliqués dans la biosynthèse des GPLs. De plus, une délétion a été observée dans le gène *mmpL4b* (*MAB_4115c*), responsable du transport des GPLs vers la membrane de la bactérie. À titre d'exemple, une insertion GC au niveau de la région 5' du gène *mps1* a été détectée chez la souche 19977-IP-R. Cette mutation induit un décalage du cadre de lecture, entraînant ainsi un arrêt complet de la transcription des gènes *mps1*, *mps2* et *gap* du locus GPL. Ces résultats ont été confirmés par l'étude des transcriptomes des souches 19977-IP-R et 19977-IP-S via RNA-seq (RNA sequencing) (Pawlik *et al.*, 2013) (**Figure 9**). En parallèle, l'étude des transcriptomes par microarray a révélé que les gènes *mps1*, *mps2* et *gap* étaient les gènes les plus fortement réprimés dans le morphotype R par rapport au morphotype S, résultats qui furent également confirmés par RT-qPCR (Reverse Transcription quantitative Polymerase Chain Reaction). Bien que les mutations détectées au niveau du locus GPL diffèrent entre les trois couples isogéniques étudiés, les conséquences sur la synthèse de GPLs et le changement morphologique de *M. abscessus* demeurent similaires. En outre, d'autres études ont signalé la présence de mutations dans les gènes *mmpL4a* et *mmpL4b* dans des souches R cliniques ou de laboratoire, entraînant également un arrêt de la transcription de ces protéines de transport de GPLs (Medjahed and Reyrat, 2009) (Park *et al.*, 2015) (Bernut *et al.*, 2016).

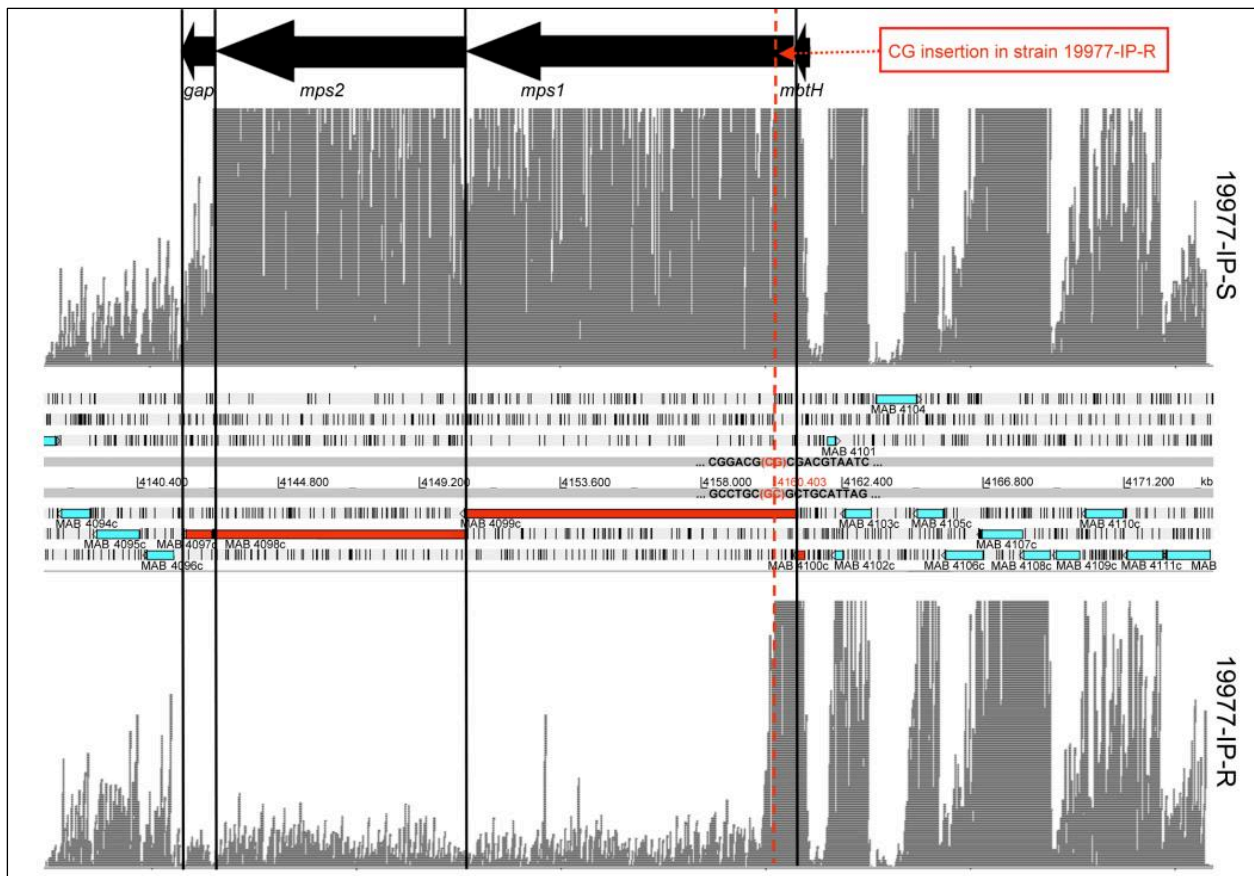


Figure 9 : Analyse comparative des transcriptomes S et R. Représentation de la densité de lectures mesurées par RNA-seq des souches 19977-IP-R et 19977-IP-S montrant l'arrêt de la transcription de l'ARNm des gènes *mps1*, *mps2* et *gap* du locus GPL à partir du niveau de l'insertion GC chez la souche 19977-IP-R de *M. abscessus* (Pawlik *et al.*, 2013).

En marge de l'impact des mutations observées sur le locus GPL, la même étude a permis de montrer que cette transition s'accompagne aussi d'un changement d'expression d'un large panel de gènes, parmi lesquels (Pawlik *et al.*, 2013) ;

- Le gène *MAB_0545*, qui code pour la protéine Lsr2 (leprosy serum reactive clone 2) (l'objet d'étude de mon projet de thèse), est plus fortement exprimé dans le morphotype R. **(Chapitre 5).**
- Le gène *MAB_4850c*, qui code pour la protéine PstA impliquée dans la synthèse des GPLs, est fortement sous-exprimé dans le morphotype R.
- Les gènes du régulon Dos (*MAB_2489*, *MAB_2490*, *MAB_3354*, *MAB_3890c*, *MAB_3902c* et *MAB_3903*) sont plus fortement exprimés dans le morphotype R. Ces gènes jouent un rôle crucial dans la survie et l'adaptation des mycobactéries au sein de l'hôte en présence de certains types de stress, tels que l'anaérobiose, et lors de leur persistance au sein de l'hôte (Chen *et al.*, 2016).

- Le locus des gènes *MAB_0897c-MAB_0894c*, qui code pour un complexe pyruvate deshydrogénase (les protéines PdhA-C) ainsi que la protéine Lpd (Dihydrolipoamide dehydrogenase). Lpd est plus fortement exprimée dans le morphotype R. Cette protéine est essentielle pour la virulence de *M. tuberculosis* en contribuant à la résistance aux stress oxydatif et nitré, ce qui lui permet de survivre et de prospérer dans l'environnement hostile de l'hôte (Venugopal *et al.*, 2011).
- Les gènes *nrdI* (*MAB_3413*), *nrdH* (*MAB_3414*) et *nrdF* (*MAB_3415*) qui codent pour des protéines enzymatiques de types ribonucléotides reductase (RNR), sont plus fortement exprimés dans le morphotype R. Les protéines Nrd jouent un rôle clé dans la protection de l'ADN. Leur surexpression dans le morphotype R permet la survie des mycobactéries au sein des phagolysosomes en aidant à contrer les effets génotoxiques des stress oxydatifs et nitrés induits par les macrophages (Nordlund and Reichard, 2006) (Pawlik *et al.*, 2013).

Enfin, bien que les mutations détectées au sein du génome du morphotype R puissent expliquer le changement dans la morphologie des colonies de *M. abscessus* et que l'expression différente de certains gènes entre les deux morphotypes pourrait expliquer une persistance du morphotype R, elles ne justifient pas à elles seules la virulence de ce morphotype observée dans plusieurs modèles cellulaires et animaux (Bernut *et al.*, 2014) (Roux *et al.*, 2016). À l'heure actuelle, nous n'avons pas encore une connaissance approfondie des voies biochimiques et métaboliques impliquées dans la transition S/R chez *M. abscessus*. C'est pourquoi il apparaît nécessaire de mener davantage d'études et de recherches approfondies afin de mieux comprendre les mécanismes qui régulent cette transition.

c. L'impact de la transition S/R sur la virulence de *M. abscessus*

Afin de comprendre l'hypervirulence accrue observée chez le morphotype R au cours de l'infection (Jönsson *et al.*, 2007) (Catherinot *et al.*, 2009) (Bernut *et al.*, 2014) (**Figure 10**), de nombreuses études ont été menées. Celles-ci ont mis en évidence différentes caractéristiques distinctes entre le morphotype R et le morphotype S. Ces études ont principalement porté sur la réponse inflammatoire face au morphotype R (Roux *et al.*, 2011) (Bernut *et al.*, 2014), les différences dans le comportement intracellulaire des deux morphotypes au sein des phagocytes, ainsi que leur adaptation spécifique au sein de l'hôte (Roux *et al.*, 2016). Tout d'abord, cette hypervirulence est liée à la capacité accrue du morphotype R à induire une réponse hyper-pro-inflammatoire chez l'hôte. Les changements dans la composition de l'enveloppe cellulaire du morphotype R, tels que l'absence des GPLs, provoquent des modifications majeures dans les profils de cytokines des cellules

présentatrices d'antigène infectées (Roux *et al.*, 2011). À la suite de la perte des GPLs membranaires, l'exposition modifiée des molécules de surface, telles que l'exposition des lipoprotéines de surface, entraîne une réponse exacerbée du TLR2 (Toll-Like receptor 2). Cette réponse est accompagnée d'une augmentation de la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires TNF- α (tumor necrosis factor) et IL-1 β (interleukine-1 β) par les macrophages infectés par le morphotype R (Catherinot *et al.*, 2007) (Roux *et al.*, 2011) (Jönsson *et al.*, 2013). De même, une augmentation significative de la production de TNF- α a été observée à la suite de l'infection des macrophages par une souche S mutante pour le gène *mmpL4b*, impliqué dans le transport des GPLs à la membrane. Cette production est aussi atténuée lors de tests de complémentation réalisés chez la souche R (Roux *et al.*, 2011). En outre, l'activation de la voie TLR2 joue un rôle essentiel dans la mise en place de la réponse immunitaire adaptative par l'activation des cellules T helper de type 1 (Th1) et des cellules B pour l'élimination de *M. abscessus* (Rottman *et al.*, 2007) (Kim *et al.*, 2015).

Ensuite, un autre élément crucial contribuant à la virulence du morphotype R est sa forte propension à former des cordes ou de gros agrégats au cours de l'infection, ce qui empêche une phagocytose efficace par les macrophages. La résistance à la phagocytose favorise ainsi la réplication extracellulaire de la bactérie et, par conséquent, l'extension de l'infection (Bernut *et al.*, 2014) (**Figure 10**). En raison de la réplication extracellulaire intense des bactéries du morphotype R, la taille de ces agrégats augmente rapidement et conduisent à la formation d'abcès volumineux dans les tissus infectés, accompagnée d'une destruction tissulaire importante (Bernut *et al.*, 2017).

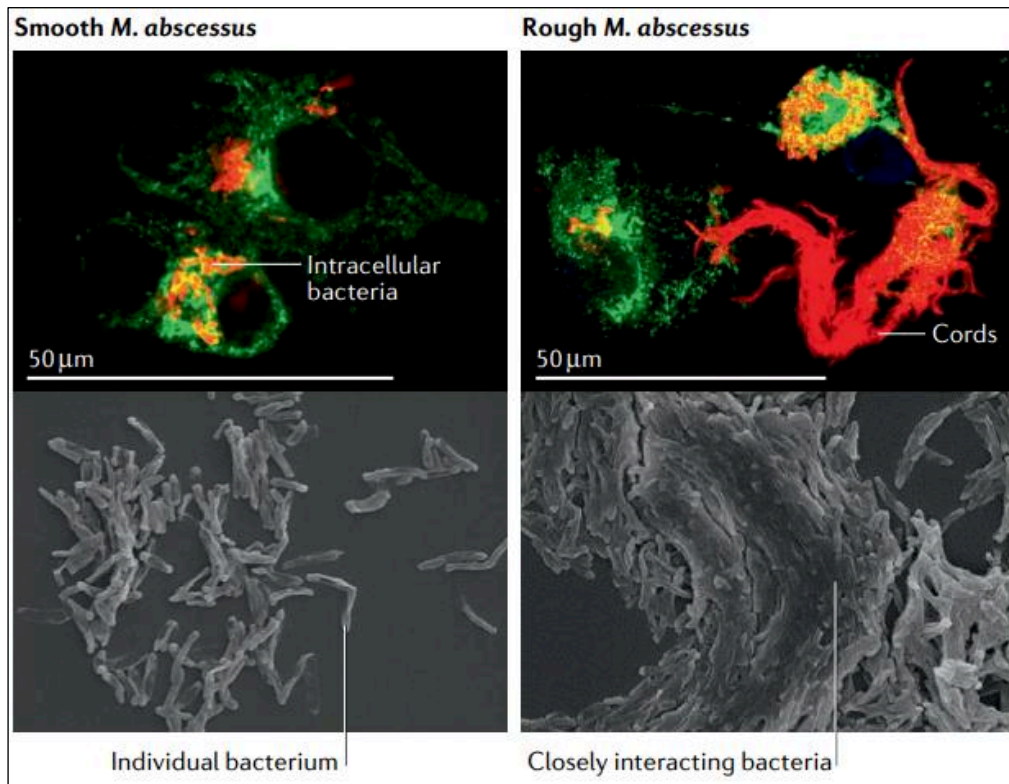


Figure 10 : Effet de la formation de cordes par le morphotype R sur la phagocytose bactérienne. A droite, pour le morphotype R, la formation d'agrégats rend les bactéries plus difficiles à être phagocytées et éliminées par les macrophages, ce qui favorise leur croissance extracellulaire. A gauche, pour le morphotype S, les bactéries individuelles sont facilement internalisées et phagocytées par les macrophages, ce qui limite la charge bactérienne et contribue au contrôle de l'infection (Johansen, Herrmann and Kremer, 2020).

Enfin, des études en microscopie électronique menées par notre équipe ont montré des différences majeures du comportement intracellulaire des deux morphotypes S et R (Roux *et al.*, 2016). Dans les macrophages infectés, une seule bactérie S est observée dans les phagosomes avec une zone translucide « electron translucent zone » (ETZ) épaisse autour de la mycobactérie, alors que pour le morphotype R, les phagosomes contiennent plusieurs bacilles avec une ETZ très fine entre la bactérie et la membrane du phagosome. Le morphotype S est capable de restreindre l'acidification intraphagosomale, ce qui le distingue de manière significative du morphotype R, où le phagosome s'acidifie rapidement. De plus, le morphotype R induit davantage d'apoptose et d'autophagie dans les cellules par rapport au morphotype S. Il semble que le morphotype R déclenche la mort des cellules pour passer dans le milieu extracellulaire, où les bactéries se multiplient et forment des agrégats (Roux *et al.*, 2016).

3. Pouvoir pathogène de *M. abscessus*

Chez l'Homme, une distinction importante entre mycobactéries non pathogènes et pathogènes réside dans la capacité de ces dernières à survivre et se multiplier au sein des macrophages et des cellules dendritiques, en empêchant la maturation des phagosomes (El-Etr and Cirillo, 2001). *M. abscessus* possède également ces caractéristiques de survie intracellulaire (Roux *et al.*, 2016). En effet, *M. abscessus* est reconnu comme l'une des MNT les plus pathogènes, responsable de plusieurs types d'infections chez l'Homme, ce qui en fait une menace sérieuse pour la santé, particulièrement chez les individus atteints de mucoviscidose (Degiacomi *et al.*, 2019).

3.1 Les infections causées par *M. abscessus*

Comme la plupart des MNT qui provoquent des infections chez l'Homme, les infections pulmonaires chroniques représentent la manifestation clinique la plus courante causée par *M. abscessus* (Winthrop *et al.*, 2010). Ces infections chroniques du système respiratoire peuvent être particulièrement graves et poser des défis thérapeutiques, en particulier chez les sujets présentant une pathologie pulmonaire sous-jacente telle que la fibrose pulmonaire bronchiectasie, la mucoviscidose, ou ceux qui ont une primo-infection par *M. tuberculosis* (Griffith *et al.*, 2007) (Lee *et al.*, 2015) (Cowman *et al.*, 2019). *M. abscessus* a été identifiée comme la MNT la plus fréquemment isolée lors d'infections pulmonaires humaines, dépassant ainsi les deux autres espèces, *chelonae* et *fortuitum* et représentant plus de 80% des infections liées à une MCR (Griffith, 2003) (Roux *et al.*, 2009) (Koh *et al.*, 2014) (Abidin *et al.*, 2021). En outre, bien qu'elle soit principalement associée à des infections chez les individus immunodéprimés, des cas d'infections ont également été rapportées chez des patients immunocompétents sans antécédents médicaux prédisposants (Varghese *et al.*, 2012) (Al-Mashdali *et al.*, 2022).

La physiopathologie des infections pulmonaires à *M. abscessus* chez l'Homme reste encore peu connue. Les données actuellement disponibles proviennent principalement d'études réalisées sur différentes lignées cellulaires ou des modèles précliniques (Bernut *et al.*, 2017). Celles-ci ont permis de mettre en évidence un grand nombre de caractéristiques communes partagées par *M. abscessus* et *M. tuberculosis* pendant le processus infectieux (Sohn *et al.*, 2009). Dans certaines situations, l'infection par *M. abscessus* peut rester latente pendant de nombreuses années sans provoquer de symptômes apparents ou d'infection active (Cullen *et al.*, 2000). Chez les patients infectés par *M. abscessus*, deux formes de la maladie peuvent être distinguées par radiologie : la forme nodulaire, caractérisée par l'observation de nodules

parenchymateux pulmonaires et des bronchiectasies, et la forme fibro-cavitaire, dans laquelle des cavités fibreuses se forment dans les lobes supérieurs des poumons. La première forme est moins agressive et moins douloureuse, tandis que la seconde est plus grave et présente des similitudes avec la tuberculose active. Cette forme progresse rapidement en un à deux ans, entraînant la destruction cavitaire du poumon et une défaillance respiratoire si elle est mal traitée (Griffith *et al.*, 2007) (Sohn *et al.*, 2009). Il a été rapporté que la forme nodulaire de l'infection est principalement associée à la présence du morphotype S, tandis que la forme fibro-cavitaire est caractérisée par la présence exclusive du morphotype R (Sohn *et al.*, 2009). En plus de sa tendance à infecter principalement les poumons, *M. abscessus* est également responsable d'infections extra-pulmonaires, appelées infections localisées, qui surviennent souvent à la suite d'un geste thérapeutique ou esthétique (Lee *et al.*, 2015). Ces infections se manifestent généralement sous la forme d'infections cutanées ou des tissus mous. Elles peuvent être contractées par contact direct avec des matériaux contaminés ou de l'eau à la suite de blessures traumatiques, de plaies chirurgicales ou d'expositions environnementales. De plus, les infections cutanées dues à *M. abscessus* peuvent également survenir à la suite de procédures esthétiques, des tatouages ou de l'acupuncture (Kothavade *et al.*, 2013) (Kumar *et al.*, 2021). Sur le plan clinique, ces infections se caractérisent par l'observation de nodules cutanés douloureux, de papules érythémateuses et d'abcès (Kothavade *et al.*, 2013). D'autres formes d'infections à *M. abscessus* ont également été rapportées, telles que des kératites, des conjonctivites et des ostéomyélites (Moorthy *et al.*, 2012).

Finalement, des infections disséminées à *M. abscessus* peuvent survenir chez des patients présentant des blessures graves dans les barrières tissulaires, des individus présentant une immunodéficience mendélienne ou acquise, lors d'un traitement anti-TNF, ou à la suite d'une transplantation (Liao *et al.*, 2004) (Richey *et al.*, 2013) (T.-T. Liu *et al.*, 2016). Différents organes du corps peuvent être atteints lors des formes disséminées de *M. abscessus*, tels que le système nerveux central (dans de rares cas) (Liebeskind *et al.*, 2001), le sang (Mooren *et al.*, 2017), le foie (Morales *et al.*, 2010), et le cœur (Richey *et al.*, 2013).

3.2 *M. abscessus* et la mucoviscidose

La mucoviscidose est une maladie génétique récessive létale liée à des mutations du gène *cftr* découvert en 1989 qui code pour la protéine CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator) (Riordan *et al.*, 1989). La mutation F508del (délétion d'une phénylalanine en position 508) de la protéine CFTR est la plus fréquemment rencontrée chez

les malades (chez environ 80% des malades en France et 85.5% aux États-Unis d'Amérique) (Kerem *et al.*, 1989) (Regard *et al.*, 2022) (Ong and Ramsey, 2023).

Les atteintes respiratoires sont les manifestations cliniques les plus sévères de la mucoviscidose et sont la cause majeure de mortalité et de morbidité (Blanchard and Waters, 2019). L'altération du canal CFTR de la cellule épithéliale entraîne un déséquilibre dans les échanges ioniques du chlore au niveau cellulaire, contribuant ainsi à l'accumulation de mucus de plus en plus visqueux, déshydraté et abondant. L'excès de mucus contribue à une diminution de la mobilité de la barrière ciliée, avec comme conséquence une activité bactéricide amoindrie du fait de sa faible acidité, et une absence de clairance mucociliaire. Ces éléments favorisent les infections bronchiques par des microorganismes pathogènes opportunistes (Shteinberg *et al.*, 2021). Les premiers pathogènes retrouvés et responsables de ces infections engendrent une réponse inflammatoire initiale exacerbée au niveau des voies aériennes. La persistance causée par des infections bactériennes contractées de manière répétées contribuent au maintien de cette réponse inflammatoire et à la destruction progressive des tissus pulmonaires entraînant ainsi une diminution de la fonction respiratoire jusqu'au décès du malade (Blanchard and Waters, 2019).

Selon le rapport annuel du registre français de la mucoviscidose (entre 2019 et 2021), ces infections pulmonaires sont causées principalement par des bactéries et des champignons comme *Staphylococcus aureus*, *P. aeruginosa*, le complexe *B. cepacia*, *Haemophilus influenzae*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Achromobacter xylosoxidans*, *Aspergillus sp*, et les MNT (prévalence de 3.7%) (**Tableau 2**). Les complexes *M. avium* et *M. chelonae-abscessus* sont les MNT les plus fréquemment isolées chez les personnes atteintes de la mucoviscidose (**Figure 11**).

Tableau 2 : Répartition des germes respiratoires isolés à partir des poumons des personnes atteintes de la mucoviscidose. Les chiffres dans chaque colonne représentent le nombre total de patients par classes d'âge. La colonne (%) représente le pourcentage de positivité par rapport à l'effectif total (Rapport annuel 2019 du registre français de la mucoviscidose).

	Classes d'âge (années)									Total	%*
	00-04	05-09	10-14	15-19	20-24	25-29	30-34	35-39	40+		
Effectif total	706	766	955	909	831	750	724	532	987	7160	
Patients ayant eu au moins un examen	687	745	936	882	726	597	538	366	673	6150	85.9 %
Flore normale	291	289	352	206	69	55	42	43	85	1432	20.0 %
<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	13	31	69	85	95	69	62	29	44	497	6.9 %
<i>Aspergillus</i>	41	129	280	337	373	279	238	150	256	2083	29.1 %
<i>Burkholderia cepacia</i> , dont :	2	13	19	20	27	30	18	12	17	158	2.2 %
- <i>B. cepacia</i> chronique	.	4	6	11	17	26	11	6	10	91	1.3 %
<i>Haemophilus influenzae</i>	180	265	186	153	135	93	85	53	67	1217	17.0 %
Mycobactérie atypique	5	13	26	43	37	47	32	16	43	262	3.7 %
Pneumocoque	49	59	22	6	4	6	8	8	12	174	2.4 %
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , dont :	132	176	293	349	385	366	343	244	397	2685	37.5 %
- <i>P. aeruginosa</i> chronique	3	28	101	176	240	236	230	162	256	1432	20.0 %
Staphylocoque, dont :	482	573	777	726	583	441	377	214	356	4529	63.3 %
- <i>Staph. meti S</i>	471	557	760	696	534	404	321	193	307	4243	59.3 %
- <i>Staph. meti R</i>	16	24	40	63	68	55	68	33	54	421	5.9 %
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	64	76	132	127	103	79	64	37	64	746	10.4 %



Figure 11 : Prévalence des espèces mycobactériennes isolées chez les patients atteints de la mucoviscidose aux États-Unis d'Amérique en 2021. La prévalence est déterminée pour un nombre total de 9796 d'individus atteints de la mucoviscidose, chez lesquels une infection mycobactérienne a été identifiée (Rapport annuel de Cystic Fibrosis Foundation).

Plusieurs études épidémiologiques ont montré que la prévalence des infections par les MNT diffère selon la localisation géographique. En Europe, par exemple en France, en Allemagne et aux Pays-Bas, les espèces du complexe *M. abscessus* sont plus fréquemment isolées chez les personnes atteintes de la mucoviscidose, tandis qu'aux États-Unis d'Amérique, le complexe *M. avium* prédomine dans les infections à MNT (Olivier *et al.*, 2003) (Roux *et al.*, 2009) (Máiz *et al.*, 2016) (Adjemian *et al.*, 2018) (Cystic Fibrosis Foundation, 2021) (Wetzstein *et al.*, 2023) (Zomer *et al.*, 2023).

Concernant les infections par le complexe *M. abscessus*, la sous-espèce *M. abscessus* représente la moitié des isolats de MNT chez les personnes atteintes de mucoviscidose (50-60%) en France, suivie par *M. massiliense* (30-40%) et enfin *M. bolletii* (5-10%) (Zelazny *et al.*, 2009) (Aitken *et al.*, 2012) (Roux *et al.*, 2015). Les infections à *M. abscessus* sont détectées chez ces patients à tout âge, avec une prévalence plus importante chez les adolescents présentant une mucoviscidose plus sévère. *M. avium* est davantage retrouvée chez les patients plus âgés avec une mucoviscidose moins sévère (Roux *et al.*, 2009) (Catherinot *et al.*, 2013) (Fernández-Caso *et al.*, 2020).

Du point de vue pathologique, les infections pulmonaires à *M. abscessus* présentent une menace grave pour les patients atteints de la mucoviscidose. Ces infections sont associées à un déclin rapide des fonctions respiratoires par rapport aux autres espèces bactériennes retrouvées dans les poumons de ces patients (Qvist *et al.*, 2016). De plus, *M. abscessus* peut provoquer chez ces individus des infections pulmonaires chroniques persistantes (Medjahed, Gaillard and Reyrat, 2010).

Plusieurs modèles précliniques ont été développés pour étudier les infections à *M. abscessus* dans un contexte de mucoviscidose, notamment un modèle murin (Caverly *et al.*, 2015), poisson-zèbre (Bernut *et al.*, 2019) et plus récemment chez la drosophile (modèle développé dans notre laboratoire). Dans le modèle poisson-zèbre, Bernut et ses collaborateurs (2019) ont montré le rôle crucial du CFTR dans le contrôle immunitaire de *M. abscessus* qui interviendrait dans la mise en place d'une réponse oxydative efficace. L'altération du canal CFTR entraîne une hypersensibilité à l'infection en réduisant la défense oxydative des phagocytes, limitant ainsi la production de ROS (espèces réactives de l'oxygène), et en diminuant la chimiotaxie des neutrophiles (Bernut *et al.*, 2019) (**Figure 12**).

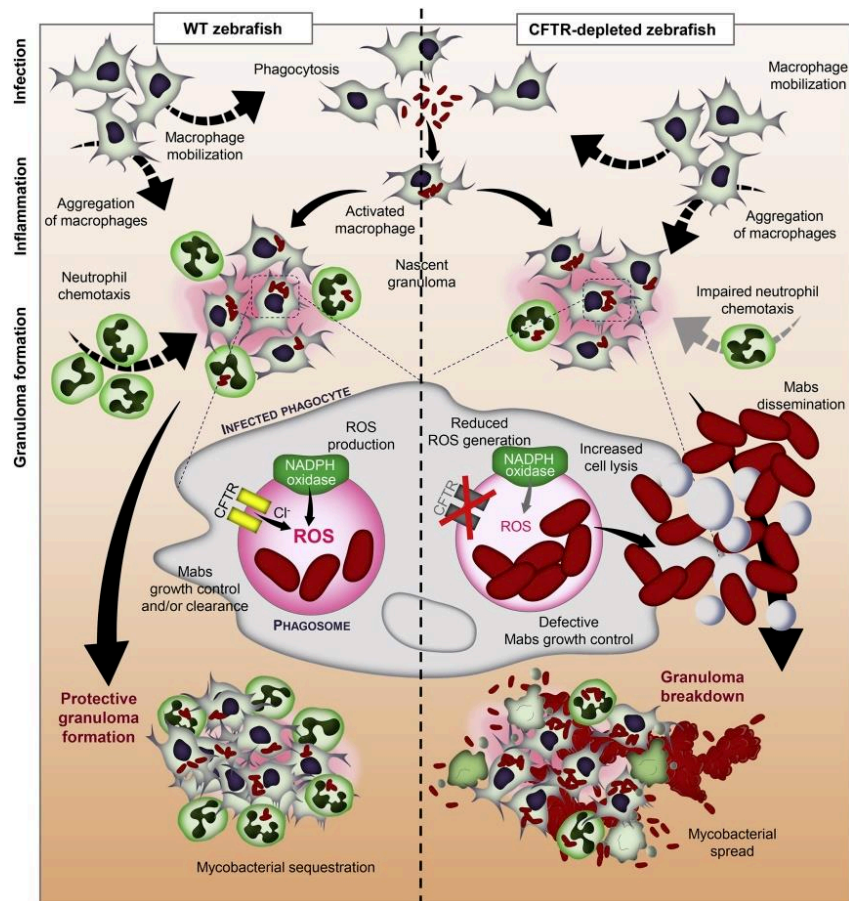


Figure 12 : Rôle du canal CFTR dans le contrôle de l'immunité innée contre l'infection à *M. abscessus* chez le modèle poisson-zèbre. À gauche (contexte sauvage pour CFTR), la présence du CFTR permet une production normale de ROS et le maintien d'une structure granulomateuse protectrice pour la séquestration et le contrôle de la croissance intracellulaire de *M. abscessus*. À droite (contexte mutant pour CFTR), l'altération du CFTR réduit à la fois l'activité bactéricide des macrophages et le recrutement des neutrophiles pour la formation des granulomes protecteurs, ce qui limite le contrôle de la croissance bactérienne et entraîne une multiplication extracellulaire de *M. abscessus* (Bernut *et al.*, 2019).

Enfin, la multirésistance de *M. abscessus* à nombreux antibiotiques rend le traitement de ces patients difficile, avec un taux d'échec des traitements de près de 60%, dû principalement à une résistance inductible aux macrolides (Kwak *et al.*, 2019). Dans l'ensemble, les infections à *M. abscessus* représentent un enjeu important chez les patients atteints de mucoviscidose, d'où le besoin médical de découvrir et de développer de nouveaux médicaments anti-MNT plus efficaces.

3.3 *M. abscessus* et transplantation

Les infections à *M. abscessus* après une transplantation posent de sérieux problèmes car elles peuvent entraîner une évolution infectieuse défavorable, entraînant des défaillances graves du greffon (Malouf and Glanville, 1999). La présence de *M. abscessus* chez les patients atteints de pathologies respiratoires telles que la mucoviscidose nécessite obligatoirement un traitement visant à obtenir une négativation des échantillons pulmonaires avant de procéder à une transplantation pulmonaire. Cependant, cette dernière peut être contre-indiquée en cas de risque élevé d'infection aggravée après la greffe en raison du potentiel de dissémination systémique de la bactérie chez ces patients, qui sont sous immunosuppresseurs à la suite de l'intervention (Taylor and Palmer, 2006) (Smibert *et al.*, 2016). Au cours de ces dernières années, plusieurs études de cas ont rapporté l'apparition d'infections à *M. abscessus* après une transplantation pulmonaire (Richey *et al.*, 2013) (Ose *et al.*, 2019) (Park *et al.*, 2022). De même, cette bactérie a été impliquée dans des infections disséminées à la suite de transplantations d'organes autres que les poumons, tels que le cœur et les reins (Richey *et al.*, 2013) (Nakano *et al.*, 2022). Cela souligne l'importance de mettre en place des mesures préventives rigoureuses pour minimiser le risque d'infection à *M. abscessus* chez les patients transplantés et de surveiller attentivement ces patients pour détecter rapidement toute infection potentielle et agir de manière appropriée.

4. Diagnostic et traitement des infections à *M. abscessus*

4.1 Diagnostic des infections à *M. abscessus*

Selon les recommandations de l'American Thoracic Society (ATS) et de l'Infectious Diseases Society of America (IDSA), le diagnostic des infections à MNT, dont *M. abscessus*, repose sur des critères cliniques, radiologiques et microbiologiques permettant de différencier une simple colonisation d'une véritable maladie (Griffith *et al.*, 2007) (Daley *et al.*, 2020). Le diagnostic clinique repose sur la présence des symptômes pulmonaires ou systémiques. Le diagnostic radiologique nécessite l'apparition des opacités nodulaires ou cavitaires sur la radiographie thoracique. Pour le diagnostic microbiologique, il est recommandé d'avoir un isolement pour *M. abscessus* en culture dans au moins deux expectorations différentes pour au moins un lavage bronchique ou pour une biopsie pulmonaire (Griffith *et al.*, 2007) (Daley *et al.*, 2020). Ces critères microbiologiques sont essentiels pour confirmer l'infection par *M. abscessus* et orienter le traitement adéquat.

4.2 Traitement des infections à *M. abscessus*

Le traitement des infections à *M. abscessus* est particulièrement difficile en raison de sa résistance intrinsèque aux antituberculeux classiques ainsi qu'à la plupart des antibiotiques couramment utilisés (Chopra *et al.*, 2011). Selon l'US Cystic Fibrosis Foundation et l'European Cystic Fibrosis Society (Floto *et al.*, 2016) (Illouz *et al.*, 2021), une trithérapie d'antibiotiques est recommandée, associant une β -lactamine (imipénème ou céfoxitine), un aminoglycoside (amikacine) et un macrolide (clarithromycine ou azithromycine). Afin d'optimiser ce traitement, surtout chez les patients atteints de mucoviscidose, il est maintenant préconisé un traitement en deux phases (**Figure 13**) :

- **La phase intensive** : C'est la première phase du traitement, d'une durée d'au moins un mois, comportant une dose quotidienne d'amikacine injectée par voie intraveineuse, un antibiotique choisi parmi l'imipénème, la tigécycline ou la céfoxitine, ainsi qu'un macrolide tel que l'azithromycine ou la clarithromycine.
- **La phase de prolongation** : C'est la deuxième phase du traitement, d'une durée d'un an, comprenant la prise quotidienne par inhalation d'amikacine (en aérosol), un macrolide tel que l'azithromycine ou la clarithromycine, ainsi que 2 à 3 antibiotiques choisis parmi la clofazimine, le linézolide, la minocycline ou la moxifloxacine en fonction du profil de résistance de chaque isolat clinique à ces antibiotiques.



Figure 13 : L'antibiothérapie en deux phases, intensive et de prolongation pour le traitement des infections à *M. abscessus*. AMK (Amikacine), IPM (Imipénème), CFX (Cefoxitine), TGC (Tigécycline), AZM (Azithromycine), CLA (Clarithromycine), CFZ (Clofazimine), LNZ (Linezolide), MNC (Minocycline), MOX (Moxifloxacine). IV : administration par voie intraveineuse (Illouz *et al.*, 2021).

L'association de plusieurs classes d'antibiotiques dans le traitement des infections à *M. abscessus* permet de cibler différentes voies métaboliques utilisées par la bactérie afin de l'éradiquer. Les principales voies métaboliques altérées chez *M. abscessus* à la suite de l'utilisation de plusieurs molécules provenant de différentes classes d'antibiotiques sont illustrées dans le **tableau 3**.

Tableau 3 : Mode d'action des principales classes d'antibiotiques utilisées dans le traitement clinique de *M. abscessus* (Lavollay *et al.*, 2011) (Wilson, 2014) (Schedlbauer *et al.*, 2015) (Degiacomi *et al.*, 2019) (Illouz *et al.*, 2021) (Griffith and Daley, 2022).

Classes d'antibiotiques	Molécules d'antibiotiques	Mode d'action
β-lactamines	Imipénème, Céfoxitine	Inhibition de la synthèse de la paroi bactérienne
Aminoglycosides	Amikacine	Inhibition de la synthèse protéique bactérienne
Macrolides	Clarithromycine, Azithromycine	
Tétracyclines	Tigécycline, Minocycline	
Oxazolidinone	Linézolide	
Fluoroquinolone	Moxifloxacine	Inhibition des acides nucléiques
Phénazine	Clofazimine	

Malgré l'efficacité de ces antibiotiques dans le traitement des infections à *M. abscessus*, la durée des traitements, dépassant souvent 12 mois, s'accompagne néanmoins d'effets secondaires notoires. Ces effets indésirables peuvent conduire à de nombreuses impasses thérapeutiques en raison de problèmes de toxicité et de tolérance bactérienne (Griffith *et al.*, 2007) (Daley *et al.*, 2020).

Récemment, la phagothérapie a été développée comme une nouvelle voie thérapeutique pour traiter les infections à *M. abscessus* (Dedrick *et al.*, 2019) (Nick *et al.*, 2022) (Dedrick *et al.*, 2023). En 2019, pour la première fois, un patient âgé de 15 ans atteint de mucoviscidose avec une infection disséminée à *M. abscessus* a été traité par un cocktail de trois phages en association avec une multi-antibiothérapie à la suite d'une transplantation pulmonaire bilatérale. Le traitement par phages intraveineux a été bien toléré et associé à une

amélioration clinique objective, sans l'apparition d'effets secondaires, y compris une résolution substantielle des nodules cutanés infectés (Dedrick *et al.*, 2019). Cette approche prometteuse ouvre de nouvelles perspectives pour le traitement des infections à *M. abscessus* et pourrait être une alternative pour les patients qui ont développé des résistances aux antibiotiques traditionnels.

5. Polyrésistance de *M. abscessus* aux antibiotiques

M. abscessus présente une résistance naturelle à la plupart des familles d'antibiotiques couramment utilisées en clinique, y compris à la quasi-totalité des agents antituberculeux. Cette résistance rend le traitement des infections causées par cette bactérie plus difficile et complexe (Chopra *et al.*, 2011). Même si *M. tuberculosis* est généralement considérée comme plus pathogène chez l'Homme que *M. abscessus*, il est crucial de souligner que *M. abscessus* présente une sensibilité réduite à de nombreux antibiotiques fréquemment utilisés en clinique, comparé à *M. tuberculosis* tels que la rifampicine, l'isoniazide, certains aminoglycosides et l'éthambutol (Luthra *et al.*, 2018) (**Tableau 4**).

Tableau 4 : Comparaison des sensibilités aux antibiotiques (CMI) de *M. abscessus* et de *M. tuberculosis* (adapté de Luthra *et al.*, 2018).

Antibiotiques	<i>M. abscessus</i> (µg/mL)	<i>M. tuberculosis</i> (µg/mL)
Rifampicine	128	1.0
Isoniazide	> 512	0.1
Ethambutol	64	5.0
Streptomycine	32	1.0
Capreomycine	> 256	2.5
Amikacine	8	1

CMI : Concentration minimale inhibitrice

L'étude du génome de *M. abscessus* a permis d'identifier plusieurs gènes impliqués dans la multirésistance de cette mycobactérie vis-à-vis des antibiotiques et des agents désinfectants (Ripoll *et al.*, 2009). La résistance de *M. abscessus* aux antibiotiques est due à de nombreux mécanismes de résistance innée :

- La faible perméabilité de la paroi cellulaire mycobactérienne constitue une première barrière naturelle contre de nombreuses molécules antibiotiques (Lambert, 2002).
- L'export actif des antibiotiques à travers la membrane par des pompes à efflux. Un rôle pour certaines protéines MmpL dans l'export d'antibiotiques comme la bédaquiline et la clofazimine a ainsi pu être démontré (Richard *et al.*, 2019).
- Une variété d'enzymes capables de modifier ou inactiver les antibiotiques ont aussi été identifiées. Parmi celles-ci, on trouve la β -lactamase (Bla_{MAB}), qui est codée par le gène *MAB_2875*, et qui cible spécifiquement les β -lactamines telles que les pénicillines et les carbapénèmes (Le Run, Arthur and Mainardi, 2018). Une autre enzyme est la rifampicine ADP-ribosyltransférase (Arr_{MAB}), codée par le gène *MAB_0591*, qui joue un rôle important dans la résistance à la rifampicine (Rominski *et al.*, 2017). De plus, on trouve l'UDP-N-acétylglucosamine 1-carboxyvinyltransférase (MurA), codée par le gène *MAB_1457*, qui confère une résistance à la fosfomycine (Zhu *et al.*, 2012). La résistance de *M. abscessus* aux aminoglycosides peut être expliquée par la présence de deux acétyltransférases (AAC_2 et $Eis2$) codées respectivement par les gènes *MAB_4395* et *MAB_4532c*, ainsi qu'une phosphotransférase (APH_3) codée par le gène *MAB_2385*. Plus précisément, $Eis2$ inactive l'amikacine et la kanamycine en acétylant le premier groupement amine de ces molécules (Rominski *et al.*, 2017) (Ung *et al.*, 2019).
- Les enzymes qui protègent la cible des antibiotiques incluent la méthyltransférase $Erm41$, codée par le gène *MAB_2297* (Nash *et al.*, 2009). Ce gène confère une résistance inductible aux macrolides en méthylant l'adénine en position 2058 de l'ARNr 23S de la sous-unité 50S du ribosome. Cependant, les trois sous-espèces du complexe *M. abscessus* ne présentent pas la même expression de cette résistance. *M. abscessus* et *M. bolletii* possèdent le gène *erm41* dans son intégralité, ce qui les rend résistants de manière inductible aux macrolides. En revanche, *M. massiliense* exprime un gène *erm41* tronqué, le rendant particulièrement sensible aux macrolides. Cette observation représente un argument supplémentaire pour la spécification et l'identification précise des trois sous-espèces (Nash *et al.*, 2009) (Blauwendraat *et al.*, 2012) (Richard *et al.*, 2020).

Les mécanismes de résistance innée chez *M. abscessus* sont complétés par des résistances acquises observées au cours de traitements prolongés chez les patients infectés. Des mutations ont été identifiées dans les gènes *rrs* et *rrl*, qui codent respectivement les ARNr 16S et 23S. Ces mutations sont impliquées dans la résistance aux aminoglycosides et aux macrolides, respectivement. D'autres mutations du gène *rpoB*, qui code pour la sous-unité β

de l'ARN polymérase, sont responsables de la résistance de la bactérie à la rifabutine (Johansen *et al.*, 2020) (Kim *et al.*, 2021).

Ces nombreux mécanismes de résistance de *M. abscessus* conduisent à l'émergence de souches multirésistantes qui limitent considérablement les options thérapeutiques pour le clinicien lorsqu'il doit traiter les infections pulmonaires causées par cette bactérie. Par conséquent, il est fortement recommandé de tester *in vitro*, avant toute antibiothérapie, la susceptibilité des isolats cliniques à l'amikacine et aux macrolides (en particulier la clarithromycine). De plus, le séquençage du gène *erm41* doit être réalisé afin de déterminer la possibilité d'une éventuelle résistance inductible aux macrolides et d'aider à la spéciation (Daley *et al.*, 2020).

Chapitre III : Le chromosome bactérien

1. Organisation générale du nucléoïde bactérien

L'ADN (acide désoxyribonucléique) constitue la base universelle de l'information génétique pour tous les organismes. L'arrangement du matériel génétique à l'intérieur de l'espace confiné de la cellule revêt une importance cruciale. La taille de l'ADN contenu dans un chromosome dépasse largement la taille de la cellule qui le contient, ce qui nécessite une compaction, ainsi qu'une organisation adéquate du chromosome. L'organisation spatiale des gènes, des éléments régulateurs et des éléments structurels au sein du chromosome a un impact significatif sur l'accessibilité des gènes à la machinerie transcriptionnelle ainsi qu'à d'autres processus moléculaires tels que la réplication, la réparation et la ségrégation (Valkenburg and Woldringh, 1984). Bien que la majeure partie du matériel génétique des bactéries soit consacrée au codage de protéines fonctionnelles, il existe également des protéines non fonctionnelles qui jouent un rôle dans le contrôle de l'expression des gènes et la régulation de la structure de l'ADN (Levings *et al.*, 2020). La répartition des gènes est fréquemment organisée en groupes appelés opérons. Les génomes subissent des échanges horizontaux de matériel génétique par différents mécanismes (transduction, conjugaison, transformation et transposition) médiés par divers éléments génétiques mobiles, tels que des phages, des plasmides et des transposons (Rocha, 2008). Dans les bactéries, le génome est généralement encodé dans une unique molécule d'ADN circulaire. Cependant, certaines bactéries, comme *Vibrio cholerae* et *B. cepacia*, peuvent posséder plusieurs chromosomes. D'autres bactéries, telles que les *streptomyces*, se distinguent par leurs génomes linéaires, qui sont sujets à des réarrangements génétiques plus fréquents (Rocha, 2008).

2. Compaction et organisation moléculaire du chromosome bactérien

L'une des caractéristiques distinctives des bactéries est leur absence de membrane nucléaire qui assure la compaction et la protection du matériel génétique (Worcel and Burgi, 1972). Les bactéries possèdent un complexe macromoléculaire appelé nucléoïde, dans lequel l'ADN et les protéines régulatrices associées y sont localisées, formant ainsi la chromatine bactérienne (Worcel and Burgi, 1972). La compaction de l'ADN bactérien est rendue possible grâce à l'intervention de plusieurs éléments, dont le surenroulement de l'ADN, l'encombrement moléculaire, et l'interaction de l'ADN avec des protéines architectes telles que les protéines des complexes SMCs (Structural Maintenance of Chromosomes) et les protéines liées au nucléoïde (NAPs) (de Vries, 2010) (Lioy, Junier and Bocard, 2021).

Les chromosomes bactériens sont des polymères topologiquement contraints qui présentent principalement un surenroulement négatif, résultant de la torsion et de l'enroulement de la double hélice d'ADN sur elle-même (Griffith, 1976). Le surenroulement de l'ADN représente le premier niveau d'organisation du chromosome, entraînant la formation de superhélices et de boucles appelées plectonèmes (**Figure 14**) qui contribuent à sa structure et à sa compaction (Postow *et al.*, 2004). L'état de surenroulement du chromosome est contrôlé par une superfamille de protéines appelées topoisomérases. L'ADN gyrase est la principale topoisomérase capable d'introduire un surenroulement négatif de l'ADN en présence d'adénosine triphosphate (ATP), tandis que la topoisomérase I le détend (Zechiedrich *et al.*, 2000). L'équilibre entre les activités opposées de ces deux enzymes est responsable du maintien d'un niveau stable de superhélicité de l'ADN (Menzel and Gellert, 1983). Le surenroulement est également induit par le déplacement de la machinerie de réplication et de transcription de l'ADN et est largement reconnu comme l'un des régulateurs les plus importants de la régulation des gènes (Blot *et al.*, 2006) (Dorman, 2019).

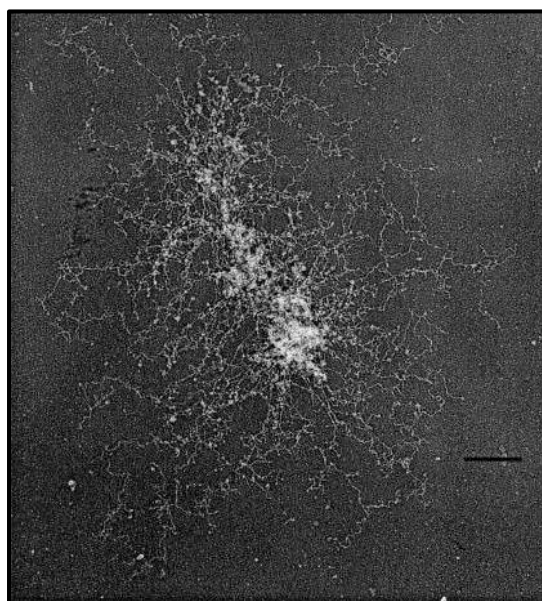


Figure 14 : Le surenroulement de l'ADN. Photographie prise par microscopie électronique représentant un chromosome d'*Escherichia coli*, fortement condensé dans une structure hétérogène avec des extensions semblables à des boucles (grossissement de 12000X), (l'échelle représente 500 nm) (Postow *et al.*, 2004).

L'encombrement moléculaire, qui est un autre phénomène jouant un rôle dans la compaction, se caractérise par la présence abondante d'ARN et de protéines dans le cytoplasme des cellules bactériennes. En raison de leur concentration élevée, ainsi que de leur petite taille par rapport à l'ADN, ces macromolécules génèrent une force de déplétion qui contraint l'ADN génomique à adopter une conformation compacte (de Vries, 2010) (Pelletier *et al.*, 2012).

Les complexes SMCs, appelés également condensines bactériennes, sont essentiels à la compaction et à la ségrégation correcte des chromosomes (Gruber, 2018). Ces complexes se composent de trois sous-familles distinctes (Smc-ScpAB, MukBEF et MksBEF), toutes présentant une structure globalement similaire. Smc-ScpAB est le complexe le plus conservé, répandu dans la majorité des espèces bactériennes (Wang *et al.*, 2015). Il est formé par l'association de trois protéines : une grande protéine Smc (> 125 kDa) et deux plus petites protéines ScpA et ScpB (Gruber, 2014). La protéine Smc forme une structure en anneau lors de la dimérisation par son domaine charnière, dont la fermeture et l'ouverture sont contrôlées par la liaison et l'hydrolyse de l'ATP au niveau du domaine tête. L'hydrolyse est principalement assurée par l'action des petites protéines ScpA et ScpB, assurant ainsi le maintien des doubles hélices d'ADN entrelacées (Lammens, Schele and Hopfner, 2004) (Bürmann *et al.*, 2013). Les complexes SMCs sont capables de relier des segments d'ADN, provenant de domaines chromosomiques distincts, contribuant ainsi à la formation des boucles chromosomiques et facilitant la compaction (Vazquez Nunez *et al.*, 2019).

3. Le génome bactérien en trois dimensions (3D)

L'exploration de l'organisation nucléaire a principalement été réalisée en utilisant des méthodes de microscopie traditionnelle. La microscopie optique est limitée, et fût dans l'incapacité d'observer les structures d'ADN à l'échelle nanométrique. De même la microscopie électronique, qui a fourni des informations précieuses sur l'organisation des chromosomes bactériens, s'est révélée insuffisante pour fournir des détails sur les interactions spécifiques de l'ADN. La méthode d'immunoprécipitation de chromatine couplée au séquençage haut débit (ChIP-seq) demeure limitée à une seule dimension et ne permet pas de conclure quant à la structure tridimensionnelle (3D) d'une région ou d'un chromosome donné, même si elle permet de caractériser la répartition de nombreuses protéines à l'échelle du génome. Le début des années 2000 a vu l'apparition de nouvelles techniques qui ont permis de mieux appréhender la structure et la dynamique des chromosomes. Ces techniques, regroupées sous le nom de "Chromosome Conformation Capture" (3C) nous permettent d'explorer les interactions physiques entre des segments d'ADN proches ou distants au sein d'un chromosome, ouvrant ainsi la voie à une meilleure compréhension de l'architecture

nucléaire (Dekker *et al.*, 2002) (Tolhuis *et al.*, 2002).

Pendant ma thèse, j'ai contribué à la rédaction d'une revue traitant des connaissances acquises sur la conformation du chromosome bactérien grâce aux méthodes de 3C (Annexe 1) : *Shedding light on bacterial chromosome structure: exploring the significance of 3C-based approaches*, acceptée, *Meth Mol Biol- Bacterial Chromatin 2nd edition* (Hoareau, Gerges and Crémazy).

3.1 Les méthodes 3C pour l'étude du chromosome bactérien

Les méthodes 3C, qui incluent le Hi-C (High-throughput Chromosome Conformation capture), le 3C-seq (Chromosome Conformation Capture - sequencing), ainsi que les méthodes dérivées (3C-qPCR, 4C, 5C) impliquent toutes deux étapes principales : la génération de la banque d'interactions et leur détection. La première étape consiste à réticuler la chromatine en utilisant du formaldéhyde, ce qui fixe les interactions entre l'ADN et les protéines, ainsi que les interactions entre les fragments d'ADN rapprochés. Ces interactions sont isolées en fragmentant la chromatine à l'aide d'enzymes de restriction. Les extrémités de ces fragments sont liées ensemble, formant des unités qui récapitulent les interactions entre les segments d'ADN qui étaient initialement en proximité spatiale étroite. Ces unités constituent la banque d'interactions initiale (Dekker *et al.*, 2002) (Lieberman-Aiden *et al.*, 2009).

3C-qPCR: À l'origine, la méthode 3C analyse les interactions potentielles de l'ADN par amplification PCR : si deux séquences d'ADN interagissent, elles sont ligaturées en un fragment chimérique qui peut être spécifiquement amplifié à l'aide d'amorces flanquant les deux côtés de la jonction (**one vs one**). La 3C-qPCR nécessite donc l'identification préalable de la région génomique à étudier ainsi que la localisation des sites de restriction de l'enzyme à utiliser. Une efficacité d'amplification plus élevée indique généralement une fréquence de contact plus élevée (Dekker *et al.*, 2002) (Dekker, 2006) (Hagège *et al.*, 2007). Chez les eucaryotes, cette méthode a permis d'identifier des interactions fonctionnelles impliquées dans la régulation tridimensionnelle de l'expression des gènes. Les premières expériences de 3C-qPCR ont révélé une régulation génique à longue distance impliquant des interactions entre les gènes de la β -globine et la région de contrôle du locus (LCR), des éléments génomiques largement espacés (Tolhuis *et al.*, 2002). Cependant, cette méthode peut rapidement devenir fastidieuse lors de l'étude d'un grand nombre de régions. Par conséquent, plusieurs méthodes utilisant le séquençage de nouvelle génération (NGS) (Hi-C, 3C-seq, 5C)

ont été développées afin d'explorer la conformation de la chromatine de manière plus complète.

Hi-C: Cette méthode permet la détection de toutes les interactions d'ADN qui ont lieu à l'échelle du génome (**all vs all**), contrairement au 3C conventionnel qui utilise des amorces spécifiques pour repérer des interactions discrètes (Lieberman-Aiden *et al.*, 2009). Dans la méthode Hi-C, les extrémités digérées sont remplies par un nucléotide biotinylé avant la ligation. Les fragments ligués sont ensuite fragmentés, suivis d'une étape d'enrichissement basée sur la biotine. Les jonctions de ligation sont finalement préparées pour le séquençage haut débit (Crémazy *et al.*, 2018). Initialement développée pour l'étude des génomes eucaryotes, la méthode Hi-C a été adaptée depuis une décennie pour l'exploration du chromosome bactérien. L'analyse des données NGS génère des matrices bidimensionnelles appelées matrices de contact, dont les axes x et y représentent les coordonnées génomiques. La longueur du chromosome est segmentée en bins, allant de 200 pb à 10 kb, qui définissent finalement la résolution de la matrice. La fréquence relative de l'interaction entre deux loci du génome est ensuite déduite de la quantification des lectures séquencées et visualisée sous la forme d'une "heat map" (**Figure 15**). Une caractéristique commune à toutes les matrices de contact Hi-C est la diagonale principale qui reflète les interactions intra-bras à haute fréquence qui se produisent entre les loci partageant une proximité étroite sur le chromosome. D'autre part, cette fréquence d'interaction diminue à mesure que la distance génomique augmente. Appliqué pour la première fois à *Caulobacter crescentus*, le Hi-C a révélé l'existence de grands domaines topologiques (Le *et al.*, 2013), apparaissant comme des carrés de forte intensité sur les matrices de contact (**Figure 15**). Ces domaines d'interactions chromosomiques (CIDs) correspondent à des régions présentant un niveau élevé d'interactions entre les loci d'un même domaine (**Figure 15**). Les frontières des CIDs se caractérisent par des régions sans interactions, enrichies en gènes hautement exprimés (HEG) (Le *et al.*, 2013) (Marbouty *et al.*, 2015) (Lioy *et al.*, 2018) (**Figure 15**). Chez certaines espèces, une diagonale secondaire apparaît sur les matrices de contact, révélant des interactions inter-bras entre loci génomiques de coordonnées distantes (**Figure 15**).

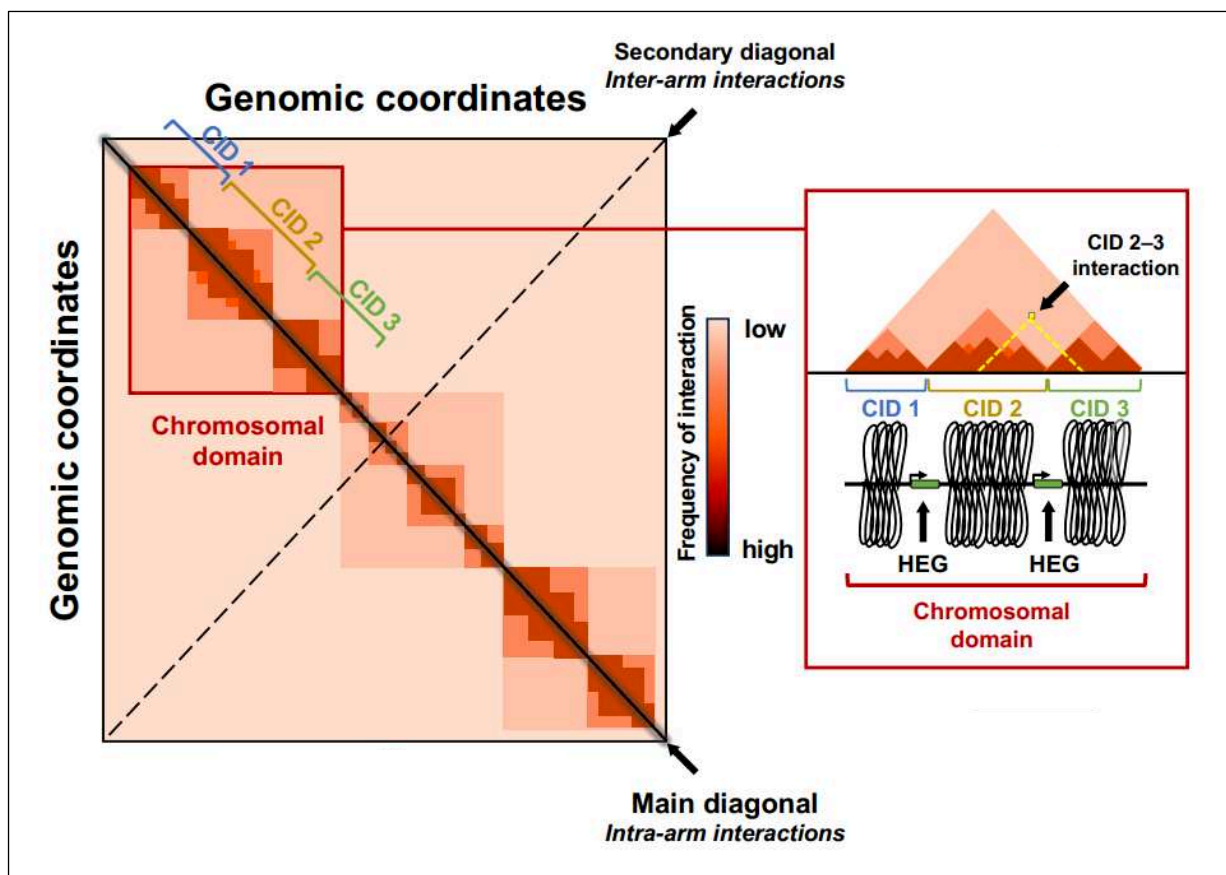


Figure 15 : Matrice de contact Hi-C. Matrice de coordonnées génomiques où la fréquence des interactions est représentée sous forme de carte thermique. La diagonale principale (de haut à gauche à bas à droite) montre les interactions intra-bras du chromosome. La diagonale secondaire (de haut à droite à bas à gauche) montre les interactions entre les bras du chromosome. Les domaines chromosomiques apparaissent sous forme de carrés colorés sur la matrice de contact. Ils peuvent être composés de sous-domaines, tels que les domaines d'interactions chromosomiques (CIDs), où les interactions sont plus fréquentes. Les limites des CIDs sont générées par la transcription, créant des régions sans interactions et enrichies par des gènes hautement exprimés (HEG). Cette figure est tirée de la revue: Shedding light on bacterial chromosome structure: exploring the significance of 3C-based approaches, *Meth Mol Biol- Bacterial Chromatin 2nd edition*, acceptée (Hoareau, Gerges and Crémazy).

3.2 L'organisation spatiale du chromosome bactérien

L'organisation spatiale du chromosome bactérien dans la cellule a été révélée grâce aux techniques de microscopie, ainsi que par les technologies 3C. Tout d'abord, deux grands types d'orientation ont été observés chez les bactéries: transversale ou longitudinale (**Figure 16**). La disposition transversale se distingue par le fait que l'origine de réplication (Ori) et le

terminus (Ter) sont placés au centre de la cellule, tandis que les deux bras chromosomiques occupent chacun une moitié de la cellule. Cette organisation a été observée principalement chez *E. coli* (Nielsen *et al.*, 2006) (Wang and Rudner, 2014). En revanche, d'autres bactéries comme *V. cholerae*, *C. crescentus*, *Myxococcus xanthus* et *P. aeruginosa* présentent une disposition spatiale des chromosomes différente, connue sous le nom de disposition longitudinale. Dans ce cas, l'origine de réplication et le terminus sont situés aux deux extrémités de la cellule, tandis que les deux bras chromosomiques s'étendent le long de l'axe longitudinal de la cellule (Viollier *et al.*, 2004) (Vallet-Gely and Boccard, 2013) (Harms *et al.*, 2013) (David *et al.*, 2014). Il est important de noter qu'une disposition longitudinale est observable sur une matrice de contact Hi-C sous la forme d'une deuxième diagonale, comme cela a été observé pour la plupart des bactéries (Le *et al.*, 2013) (Marbouty *et al.*, 2015). En revanche, pour la disposition transversale, telle que celle que l'on observe chez *E. coli*, seule la diagonale principale est présente (Lioy *et al.*, 2018). Ceci est directement lié à la disposition des régions Ori et Ter.

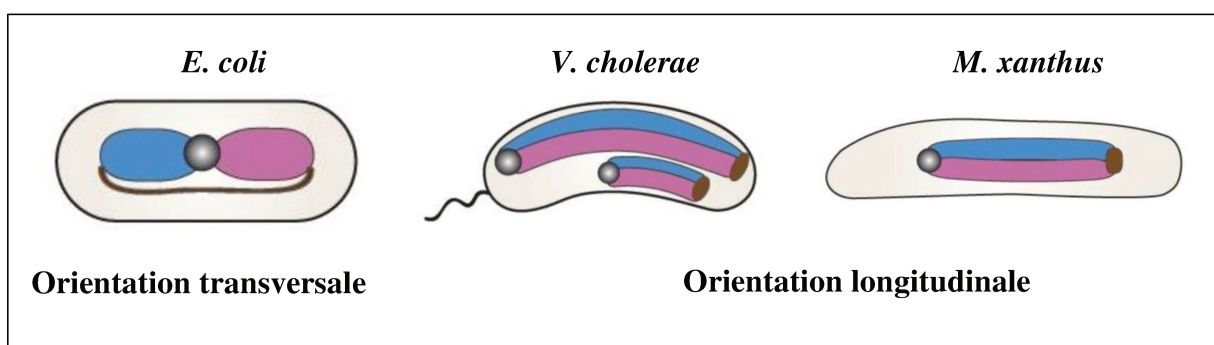


Figure 16 : Organisation spatiale des chromosomes bactériens. Schéma représentatif de l'organisation transversale du chromosome d'*E. coli* et de l'organisation longitudinale des deux chromosomes de *V. cholerae* et du chromosome de *M. xanthus*. Les origines de réplication sont en noirs, les terminus sont sous forme d'une ligne brune (*E. coli*) ou d'un ovale brun (*V. cholerae* et *M. xanthus*), les bras droits des chromosomes en bleu et les bras gauches en rose (adapté de Wang and Rudner, 2014).

Un autre niveau hiérarchique d'organisation des chromosomes a été identifié grâce à la description de grands domaines chromosomiques appelés macrodomaines (MD) (Mercier, Espéli and Boccard, 2009). Le chromosome d'*E. coli* présente quatre MD différents, appelés Ori, Ter, Left et Right, ainsi que deux régions non structurées (Non Structured-Right ou NSR et Non-structured Left ou NSL). Identifiés initialement par la technique FISH (Fluorescent In Situ Hybridization) (Niki *et al.*, 2000) et par des essais de recombinaison site-spécifique (Valens *et al.*, 2004), ces domaines font chacun 1 Mb. Ils sont définis comme des régions

structurées dans lesquelles les séquences interagissent à une fréquence élevée, tandis qu'elles n'interagissent pas avec les séquences d'autres MD. Les séquences situées dans les régions NS établissent des interactions avec les séquences MD adjacentes (Mercier, Espéli and Boccard, 2009). La formation de macrodomaines pourrait résulter de l'interaction avec des protéines particulières. Par exemple, MatP (macrodomain Ter protein) joue un rôle essentiel en tant que facteur protéique majeur dans la mise en place de la structure du macrodomaine Ter, interagissant avec le motif *matS* (macrodomain Ter site) (Mercier *et al.*, 2008). L'absence de MatP dans le macrodomaine Ter confère à ce dernier les caractéristiques des régions NS, ainsi qu'un effet considérable sur la ségrégation des chromosomes (Mercier, Espéli and Boccard, 2009). Des expériences récentes de Hi-C ont révélé que la suppression de MatP entraîne une légère augmentation de la taille des macrodomaines et du chromosome entier, ainsi qu'une augmentation des contacts entre les macrodomaines Right-Ter et Left-Ter (Wasim, Gupta and Mondal, 2021).

À une échelle plus réduite, les expériences de Hi-C menées chez différentes bactéries ont permis de décrire les CIDs, dont le nombre et la taille varient selon les espèces, allant de 30 à 700 kb (**Tableau 5**). Il est intéressant de noter que le nombre et la taille des CIDs ne semblent pas être corrélés à la taille du génome. Par exemple, le chromosome de *Streptomyces ambofaciens* est trois fois plus grand que celui de *Mycoplasma pneumoniae*, alors que ce dernier présente environ 4,4 fois plus de CIDs.

Tableau 5 : Organisation spatiale des chromosomes bactériens

Bactérie	Nombre de CID	Taille (kb)	Moyenne (kb)	Référence
<i>C. crescentus</i>	23	30 à 420	120	(Le <i>et al.</i> , 2013)
<i>Bacillus subtilis</i>	20	50 à 120	175	(Marbouty <i>et al.</i> , 2015)
<i>E. coli</i>	31	40 à 300	150	(Lioy <i>et al.</i> , 2018)
<i>M. pneumoniae</i>	44	15 à 33	ND	(Trussart <i>et al.</i> , 2017)
<i>S. ambofaciens</i>	10	240 à 700	ND	(Lioy, Junier and Boccard, 2021)
<i>Brucella melitensis</i>	79	12 à 106	ND	(Huang <i>et al.</i> , 2023)

(ND : non déterminé)

D'ailleurs, des études plus approfondies ont exploré la nature des frontières des CIDs et les mécanismes de leur formation. Chez de nombreuses bactéries, les limites des CIDs semblent directement liées à la transcription. Plusieurs publications de Hi-C ont rapporté que les frontières sont enrichies en gènes hautement exprimés (HEG) (Le *et al.*, 2013) (Marbouty *et al.*, 2015) (Lioy *et al.*, 2018). Les auteurs ont proposé que si les interactions physiques entre les loci génomiques au sein du CID résultent d'une combinaison de boucles plectonémiques, leurs frontières se caractérisent par des zones dépourvues de plectonèmes qui limitent ces interactions. Ces zones se forment en raison d'une activité transcriptionnelle élevée, où les ARN polymérase active provoquent une déformation locale de la double hélice de l'ADN, limitant la formation de plectonèmes (Le and Laub, 2016). Chez *C. crescentus*, l'utilisation d'inhibiteurs de la transcription, tels que la rifampicine, a entraîné une désorganisation des frontières, se traduisant par une organisation presque dépourvue de CIDs (**Figure 17**). En outre, l'insertion ectopique de gènes exprimés dans des loci faiblement exprimés a conduit à la formation de nouvelles frontières (Le *et al.*, 2013).

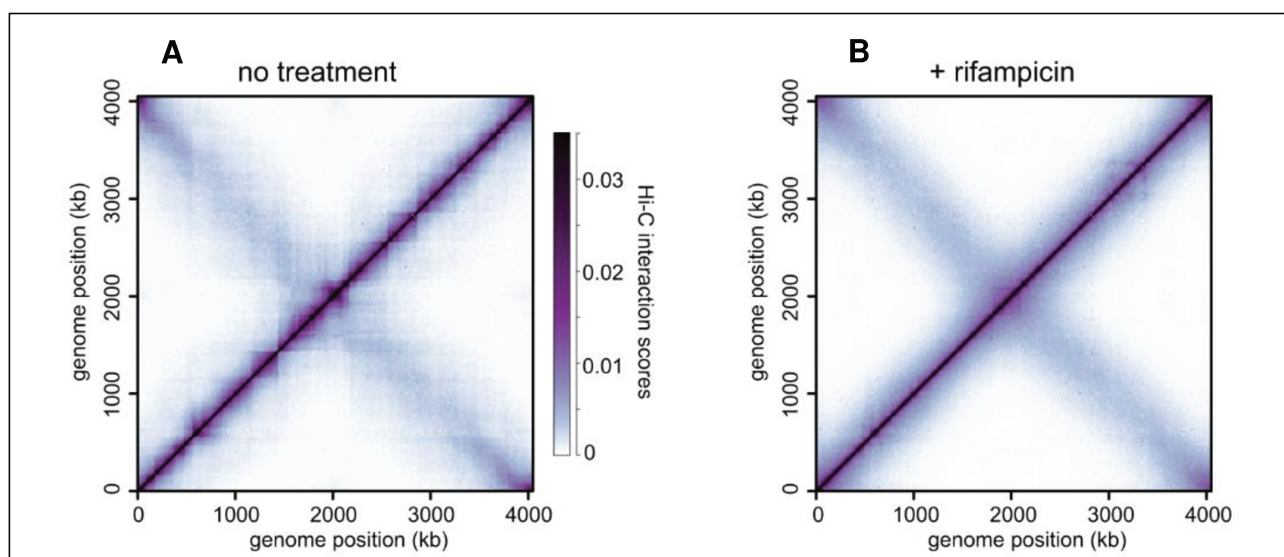


Figure 17 : Matrices de contact Hi-C pour *C. crescentus*. (A) : Matrice de contact Hi-C pour les cellules en conditions de culture normale (sans traitement), illustrant les CIDs délimités le long de la diagonale principale, ainsi que la deuxième diagonale. (B) : Matrice de contacts Hi-C pour les cellules traitées avec la rifampicine, montrant une élimination presque complète des limites des domaines (Le *et al.*, 2013).

Enfin, les plus petites unités structurales dans l'organisation hiérarchique du nucléoïde bactérien sont les microdomaines, qui sont composés de plectonèmes. Ces microdomaines jouent un rôle essentiel dans l'organisation spatiale de l'ADN et la régulation de l'expression génique chez les bactéries. Chez *E. coli* et *Salmonella enterica Typhimurium*, la taille des microdomaines est estimée à environ 10 kb (Postow *et al.*, 2004) (Stein *et al.*, 2005). Les recherches menées sur *C. crescentus* ont suggéré que les régions délimitées les CIDs semblent être composées d'environ 300 plectonèmes (Le *et al.*, 2013).

Chapitre IV : La superfamille des Protéines Associées au Nucléoïde (NAPs)

1. Généralités sur les NAPs

La structure extrêmement compacte du nucléoïde est maintenue grâce à l'interaction entre l'ADN et des protéines faisant partie de la famille des protéines associées au nucléoïde (NAPs) (Dillon and Dorman, 2010), en plus des autres facteurs cités dans le chapitre III. Les NAPs sont généralement des polypeptides de faible masse moléculaire (< 20 kilodaltons (kDa)), chargés positivement qui se lient à l'ADN et jouent un rôle dans la structuration, la compaction et la régulation génique au sein des cellules bactériennes (Dame, Rashid and Grainger, 2020). Ces protéines ont été initialement décrites comme étant des "histone-like proteins" en raison de leurs similitudes fonctionnelles avec les histones qui sont des protéines responsables de la condensation de l'ADN, de sa stabilisation et de la régulation génique dans le noyau des cellules eucaryotes (Drlica and Rouviere-Yaniv, 1987) (Dorman and Deighan, 2003).

Ces protéines sont abondantes chez les bactéries et présentent des variations en termes de taille, de structure et de fonction (Dame, Rashid and Grainger, 2020). Parmi celles-ci, on peut citer H-NS (Heat-stable nucleoid-structuring protein), Lsr2, Fis (Factor for inversion stimulation), IHF (Integration Host Factor), HU (Heat Unstable protein), Dps (DNA-binding protein from starved cells), Hha (High haemolysin activity), Hlp (Histone-like protein), CbpA (Curved DNA-binding protein A), Hfq (Host factor for phage Q_β) et Rok (Regulator of k) (Dillon and Dorman, 2010). L'importance des NAPs réside dans leur contribution essentielle au maintien de l'organisation et de la fonctionnalité de la structure du nucléoïde, participant ainsi à divers processus biologiques. Cette dualité les positionne en tant qu'acteurs majeurs, donnant ainsi un intérêt pour leur caractérisation et l'étude de leurs rôles (Dame, Rashid and Grainger, 2020). La liste des NAPs ne cesse de s'allonger, et le nombre d'études consacrées à ces protéines a augmenté de manière constante au fil des dernières années (**Figure 18**).

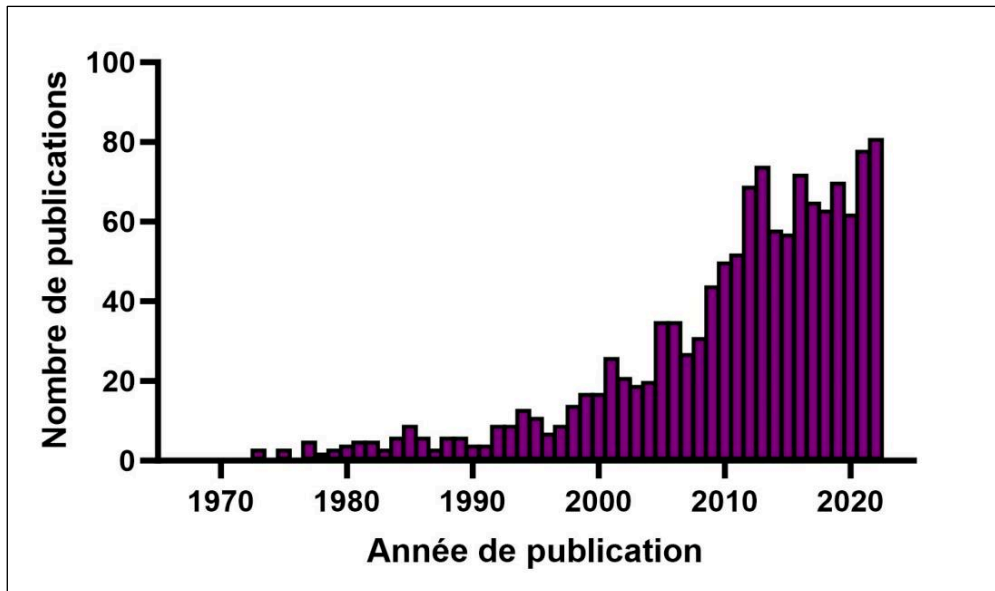


Figure 18 : Nombre de publications concernant les NAPs de 1968 à 2022 (PUBMED).

Étant donné la diversité des processus cellulaires dans lesquels les NAPs sont impliquées, il n'est pas surprenant que leur profil d'expression diffère au cours des phases de croissance de la bactérie (Azam and Ishihama, 1999) (Amemiya, Schroeder and Freddolino *et al.*, 2021). Par exemple, chez *E. coli*, les NAPs telles que Fis, Hfq, et Hu sont les plus abondantes pendant la phase de croissance exponentielle, atteignant plus de 50 000 copies par cellule (Azam and Ishihama, 1999) (**Figure 19**). Cependant, la protéine Fis n'est plus détectable en phase stationnaire. Il a été suggéré que la régulation d'expression de Fis est due à la sensibilité du promoteur du gène *fis* aux niveaux de cytidine triphosphate (CTP) (Walker *et al.*, 2004). Parmi les NAPs exprimées en phase stationnaire, la protéine Dps devient la plus prédominante, atteignant plus de 180 000 molécules par cellule (**Figure 19**). Dps joue un rôle important dans la condensation et la protection du nucléoïde pendant la phase stationnaire, en particulier face aux contraintes environnementales telles que les dommages oxydatifs (Sato *et al.*, 2013). Certaines NAPs, comme H-NS, maintiennent généralement une expression modeste tout au long des phases de croissance (**Figure 19**).

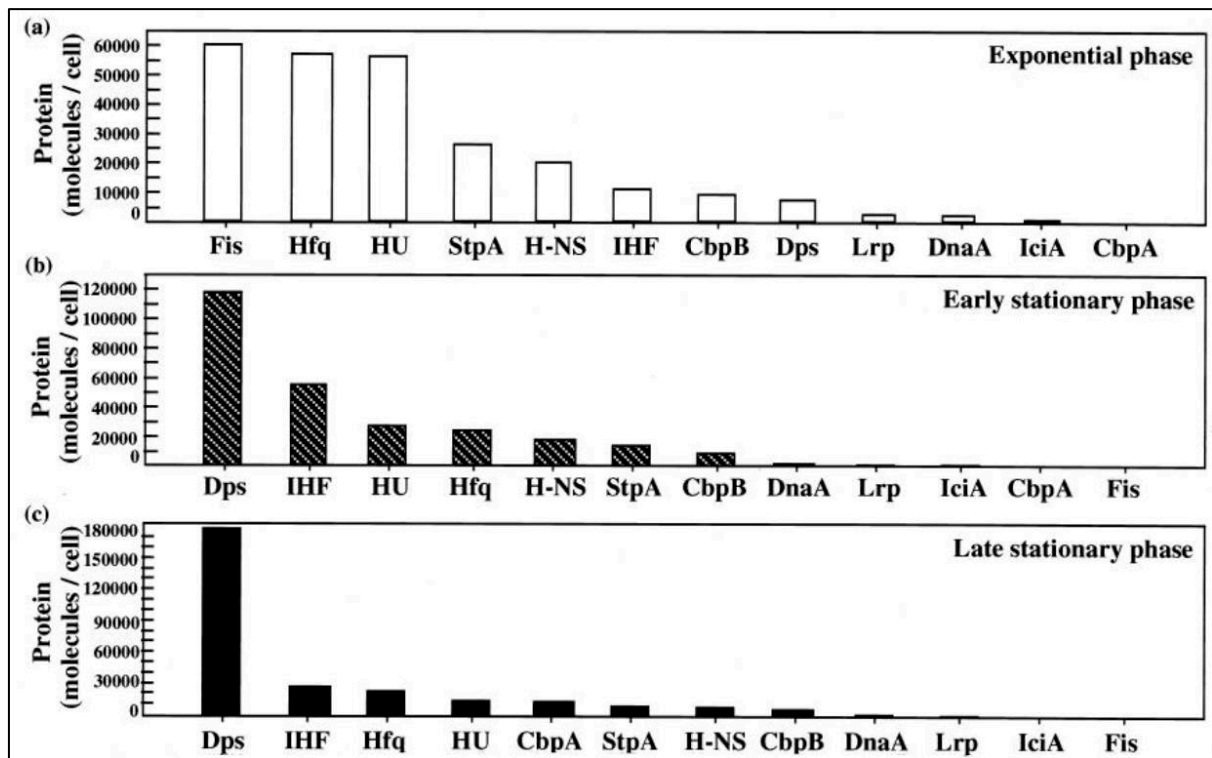


Figure 19 : Variation des niveaux intracellulaires de 12 NAPs étudiées chez *E. coli* W3110 au cours des phases de croissance. (a) : Classement des 12 NAPs étudiées chez *E. coli* W3110 en fonction de leurs profils d'expression pendant la phase exponentielle (2 à 3 heures). (b) : Classement des 12 NAPs étudiées chez *E. coli* W3110 en fonction de leurs profils d'expression pendant la phase stationnaire précoce (5 heures). (c) : Classement des 12 NAPs étudiées chez *E. coli* W3110 en fonction de leurs profils d'expression pendant la phase stationnaire tardive (48 heures). CbpA, CbpB (curved DNA-binding protein B), DnaA (DNA-binding protein A), Dps, Fis, Hfq, H-NS, HU, IciA (inhibitor of chromosome initiation A), IHF, Lrp (leucine-responsive regulatory protein) et StpA (suppressor of *td* mutant phenotype A) (Azam and Ishihama, 1999).

2. Le rôle des NAPs dans la topologie du chromosome bactérien

2.1 Diversité des interactions NAPs-ADN pour l'architecture du chromosome

Les NAPs se lient à l'ADN avec différentes spécificités et affinités, généralement sous forme d'homodimères ou parfois d'hétérodimères, dans le but de modifier sa trajectoire dans l'espace tridimensionnel. On considère souvent qu'elles possèdent une double propriété de liaison à l'ADN, qui peut varier du mode non spécifique au mode spécifique selon leur abondance (Dame, Rashid and Grainger, 2020). Ces protéines présentent différentes activités de liaison à l'ADN, telles que la courbure (bending), le pontage (bridging), l'enroulement (wrapping), le revêtement (coating) et le regroupement (bunching) (Luijsterburg *et al.*, 2008) (Verma *et al.*, 2019) (**Figure 20**).

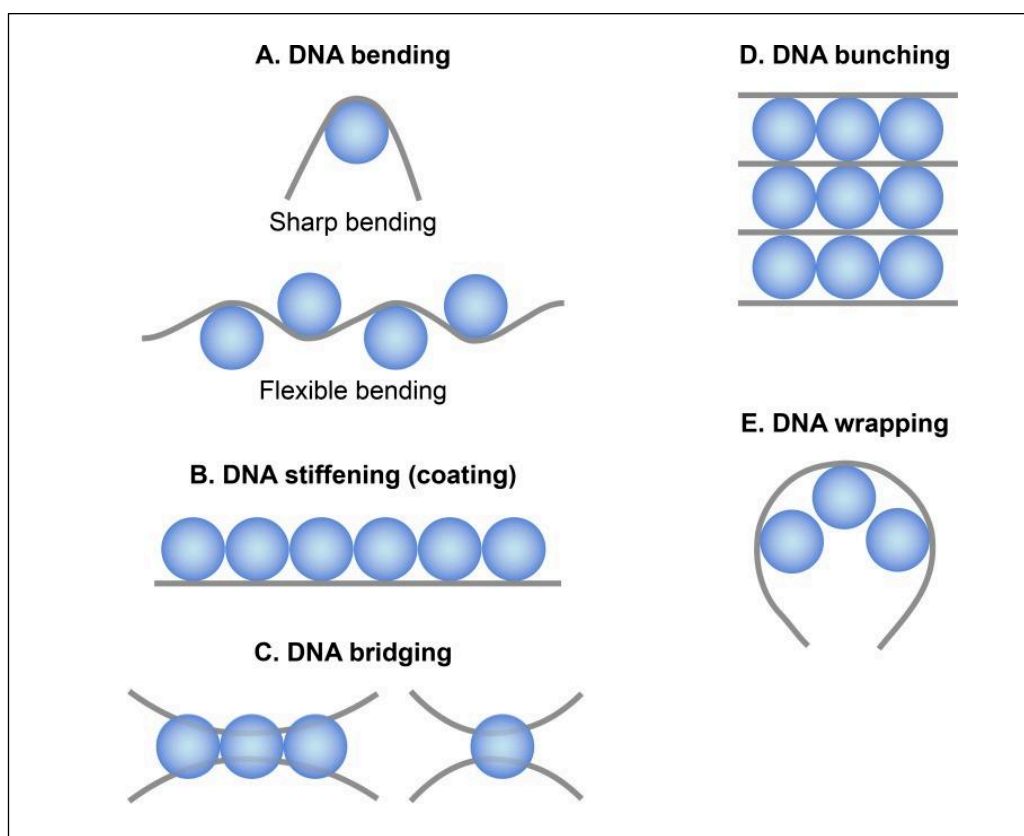


Figure 20 : L'organisation de l'ADN par les NAPs. La ligne grise droite ou courbée représente l'ADN, et la sphère bleue représente une NAP. (A) : courbure de l'ADN assurée par HU, IHF et Fis (B) : revêtement de l'ADN assuré par HU, (C) : pontage de l'ADN assuré par H-NS, (D) : regroupement de l'ADN assuré par HU et (E) : enroulement de l'ADN assuré par Fis (Verma *et al.*, 2019).

Dans cette partie, nous présenterons les principales NAPs décrites dans la littérature pour leur rôle dans l'organisation de l'ADN et discuterons de leurs modes de liaison, ainsi que de leur mode d'action.

H-NS

H-NS est une protéine d'environ 15 kDa, conservée chez toutes les bactéries à Gram négatif (Dillon and Dorman, 2010). Cette protéine présente une préférence pour un ADN courbé, en particulier pour les séquences riches en AT (Navarre *et al.*, 2007). H-NS se lie de manière spécifique au sillon mineur de l'ADN, à la séquence TCGATAAATT, à l'aide d'un motif composé de trois résidus consécutifs QGR (glutamine-glycine-arginine) (Dame *et al.*, 2006) (Gordon *et al.*, 2011). C'est l'une des NAPs qui présente différents modes de liaison à l'ADN, soit en formant des ponts soit en provoquant un revêtement de l'ADN selon les conditions osmotiques de la cellule (Luijsterburg *et al.*, 2006). À des concentrations relativement faibles ($<10^{-5}$ M), H-NS se trouve sous forme homodimérique, tandis qu'à des concentrations plus élevées, elle passe à un état oligomérique. La propriété d'oligomérisation, associée à son domaine N-terminal lui permet de se propager latéralement le long de l'ADN (Gulvady *et al.*, 2018). Suite à la formation de filaments nucléoprotéiques par oligomérisation, dans des conditions spécifiques, ces oligomères d'H-NS peuvent interagir avec un autre duplex d'ADN pour établir un pont connectant deux régions d'ADN normalement distantes dans le génome, propriété aussi connue sous le nom de « bridging » (van der Valk *et al.*, 2017). Cette propriété suggère fortement que H-NS joue un rôle important dans l'organisation globale du chromosome bactérien par la formation des boucles d'ADN (Dame *et al.*, 2005). Les expériences 3C-seq réalisées chez *E. coli* ont révélées que la mutation du gène *hns* n'entraîne aucune modification des limites des CIDs ou des macrodomaines, mais augmente plutôt les interactions à courte distance au sein de ces domaines (<100 kb). Ceci suggère que H-NS agit en réprimant les contacts entre les régions à longue distance (Lioy *et al.*, 2018). Cela contredit fortement l'hypothèse initiale selon laquelle H-NS pourrait contribuer à l'organisation des chromosomes à plus grande échelle par la formation de boucles.

HU

HU est une petite protéine d'environ 9 kDa, qui existe chez *E. coli* sous forme d'homodimères et d'hétérodimères de deux sous-unités, HU α et HU β . En revanche, certaines bactéries, telles que les mycobactéries, ne possèdent qu'une seule copie du gène *hu* (Gupta *et al.*, 2014). Cette protéine montre une préférence pour les séquences riches en AT, ainsi qu'une affinité plus élevée envers l'ADN surenroulé et les structures déformées de l'ADN. (Swinger and Rice, 2007) (Prieto *et al.*, 2012). HU contribue principalement à la courbure de l'ADN. La courbure

induite par cette protéine facilite la formation des boucles d'ADN nécessaires pour l'architecture du chromosome (van Noort *et al.*, 2004). Le rôle de HU dans l'organisation des chromosomes est démontré par des expériences où des cellules dépourvues du gène *hu* présentaient un nucléoïde décondensé (Kar *et al.*, 2005). HU contrôle les niveaux de surenroulement de l'ADN en stimulant l'activité de la gyrase tout en réduisant celle de la topoisomérase I (Malik *et al.*, 1996). Des recherches ont mis en lumière le rôle crucial de l'interaction entre la protéine HU et l'ADN dans la restructuration du nucléoïde bactérien, favorisant ainsi la formation d'un nucléoïde dense et condensé. Cette restructuration par HU se produit au cours de la croissance cellulaire et de l'adaptation aux changements environnementaux, ce qui pourrait, par conséquent, influencer de manière globale l'expression génique, probablement via un super-enroulement de l'ADN contraint (Remesh *et al.*, 2020). Les expériences de Hi-C menées chez *C. crescentus* ont montré que la mutation du gène *hu* n'a pas perturbé les limites des CIDs, mais a néanmoins entraîné une réduction significative des contacts chromosomiques à courte distance (jusqu'à 100 kb) (Le *et al.*, 2013). En revanche, l'absence de la protéine HU chez *E. coli* a montré une diminution des contacts à longue distance (>280 kb) et une augmentation des contacts jusqu'à environ 280 kb le long du chromosome en dehors de la région Ter (Lioy *et al.*, 2018). En plus de son rôle initial dans la compaction de l'ADN, il est également essentiel de noter l'existence d'autres fonctions spécialisées de HU, telles que la recombinaison site spécifique, la réparation de l'ADN, l'initiation de la réplication de l'ADN et la régulation des gènes (Ogura *et al.*, 1990) (Luijsterburg *et al.*, 2006).

Fis

Fis est une protéine d'environ 11 kDa, décrite chez les bactéries entériques (Dillon and Dorman, 2010). Elle se lie de manière spécifique à l'ADN en reconnaissant des séquences nucléotidiques spécifiques (GNTYAAAWTTTRANC), induisant une courbure dans la structure de l'ADN d'un angle de 50 à 90 degrés. Cette reconnaissance se fait généralement dans le sillon majeur de l'ADN (Stella *et al.*, 2010) (Hancock *et al.*, 2016). À des concentrations très élevées, la liaison Fis à l'ADN semble être non spécifique, contribuant ainsi à la condensation et à l'organisation de l'ADN par le maintien des boucles et des plectonèmes de l'ADN (Skoko *et al.*, 2006). La mutation du gène *fis* chez *E. coli* a montré une augmentation des contacts à courte distance (<100 kb) et une diminution des contacts au-dessus de 100 à 400 kb, notamment dans la région Ter (Lioy *et al.*, 2018).

IHF

IHF est une protéine d'environ 11 kDa, constituée de deux sous-unités, IHF α et IHF β . Cette protéine se lie à une séquence nucléotidique spécifique (TCGATAAATT). Lors de cette liaison, IHF induit une courbure significative de l'ADN, avec un angle de courbure de plus de 160 degrés, contribuant ainsi à sa condensation (Craig and Nash, 1984) (Rice *et al.*, 1996). IHF peut se lier également à l'ADN de manière non spécifique en termes de séquence, et cette liaison non spécifique semble être cruciale pour la condensation de l'ADN, en particulier en phase stationnaire (Murtin *et al.*, 1998). *In vitro*, la liaison de l'IHF à l'ADN peut entraîner une réduction, pouvant atteindre 30%, de sa longueur (Ali *et al.*, 2001).

Rok

Rok est une protéine d'environ 20 kDa, principalement présente chez *B. subtilis*. Cette protéine est l'orthologue fonctionnelle de la protéine H-NS, qui a une préférence pour les régions riches en AT du génome. Même si le mécanisme de liaison de Rok à l'ADN n'est pas encore complètement élucidé, il a été proposé sa participation à l'architecture chromosomique en favorisant la formation de boucles (Erkelens *et al.*, 2022). De manière particulièrement intéressante, les expériences de Hi-C chez *B. subtilis* ont rapporté une présence préférentielle de Rok aux frontières des CIDs, suggérant un rôle potentiel de cette protéine dans l'organisation de ces domaines (Marbouty *et al.*, 2015). La délétion du gène codant pour la protéine Rok a entraîné des perturbations au niveau des limites des CIDs, tandis que le déplacement des sites de liaison de Rok a engendré de nouvelles limites de domaines (Dugar *et al.*, 2022).

2.2 Effets des facteurs environnementaux sur les interactions NAPs-ADN

La contribution des NAPs à l'organisation de la chromatine bactérienne dépend fortement des facteurs environnementaux tels que le pH, la température et la concentration de sels (Qin *et al.*, 2019). Des expériences *in vitro* ont démontré que la rigidité des nucléofilaments H-NS-ADN est sensible aux changements de pH. Une réduction de cette rigidité est observée lorsque le pH augmente de 6.5 à 8. Cependant, le pontage de l'ADN par H-NS n'est pas altéré en réponse à cette augmentation du pH (Liu *et al.*, 2010). En ce qui concerne les fluctuations de température, H-NS se détache plus facilement de l'ADN à des températures élevées ($\geq 37^\circ\text{C}$), ce qui réduit sa propension à s'oligomériser et à former des assemblages avec d'autres protéines ou molécules d'ADN, diminuant ainsi son influence sur la transcription des gènes (Amit *et al.*, 2003). De plus, le mode de liaison d'H-NS à l'ADN est directement influencé par la présence ou l'absence de magnésium (Mg^{2+}). À faible concentration de Mg^{2+} ($< 2 \text{ mM}$),

H-NS forme des filaments nucléoprotéiques rigides (oligomérisation), ce qui entraîne le revêtement de l'ADN sans condensation. En revanche, à des concentrations de Mg^{2+} plus élevées (> 5 mM), il forme des ponts, créant ainsi des complexes composés d'ADN-protéine-ADN, favorisant la condensation de l'ADN (Liu *et al.*, 2010) (van der Valk *et al.*, 2017). Pour IHF, il a été montré que la concentration en chlorure de potassium (KCl) contrôle le degré de courbure dans les complexes IHF-ADN. IHF induit des conformations d'ADN plus compactes à faible concentration de KCl. En revanche, en présence de magnésium, IHF condense l'ADN en structures de plus haut ordre. Cela s'avérait également crucial pour la condensation chromosomique et la réparation de l'ADN (Lin *et al.*, 2012).

2.3 Le rôle des NAPs dans la régulation transcriptionnelle

En plus de leur rôle dans l'organisation chromosomique, les NAPs sont décrites comme étant des facteurs de transcription régulant l'expression des gènes de manière positive ou négative (Dillon and Dorman, 2010) (Eijkelkamp *et al.*, 2013). Elles sont retrouvées liées au niveau des promoteurs, des régions codantes, des séquences d'insertion et des éléments génétiques transférés horizontalement (Dame, Rashid and Grainger, 2020). Chez *E. coli*, H-NS se lie abondamment (458 sites) le long du chromosome, créant de longs domaines de liaison couvrant des régions génomiques de plus de 1 kb (Kahramanoglou *et al.*, 2011). De même, les expériences de ChIP-seq ont montré que HU lie 10 % du chromosome d'*E. coli* (Prieto *et al.*, 2012). Fis est particulièrement abondante dans les phases de croissance exponentielle avec 1464 sites de liaison sur le génome d'*E. coli* (Kahramanoglou *et al.*, 2011). Cette vaste répartition des NAPs influence de manière significative la régulation génique à grande échelle. Certaines NAPs sont connues pour être des répresseurs xénogéniques, reconnaissant des séquences d'ADN étrangères, réprimant leur transcription, afin d'éviter les effets délétères résultant de l'expression non régulée de gènes nouvellement acquis (Navarre *et al.*, 2007). Les silenceurs xénogéniques connus sont classés en quatre familles en fonction des homologies de séquence et des spécificités de leurs domaines de liaison à l'ADN. Ces familles sont représentées par la protéine H-NS d'*E. coli*, Lsr2 de *M. tuberculosis*, MvaT de *P. aeruginosa* et Rok de *B. subtilis* (Perez-Rueda and Ibarra, 2015). La suppression de Rok induit diverses modifications dans la physiologie de *B. subtilis*, incluant une augmentation de l'expression des gènes associés à la compétence génétique, la régulation à la hausse des gènes impliqués dans la synthèse d'antibiotiques sécrétés et des altérations de la morphologie des colonies (Amemiya, Schroeder and Freddolino *et al.*, 2021).

Parmi les NAPs, le rôle de H-NS dans la régulation de la transcription a été le plus étudié. Cette protéine est principalement connue comme un répresseur de l'expression génique.

Elle exerce sa répression transcriptionnelle de diverses manières, étroitement liées à ses modes de liaison à l'ADN : rigidification et pontage (**Figure 21**). Son principal mode de répression s'observe au moment de l'initiation de la transcription, où les promoteurs liés par H-NS sont ainsi rendus silencieux. Cela pourrait être dû au piégeage de l'ARN polymérase, inhibant le démarrage de l'élongation. En outre, la présence d'oligomères de H-NS, couvrant un nombre important des séquences codant ses gènes cibles, perturberait l'élongation des transcrits *in vitro* en réduisant la processivité ainsi qu'en augmentant les pauses de l'ARN polymérase. Il a été proposé que l'activité de pontage observée *in vitro* pour H-NS pourrait fortement renforcer ce mécanisme, suggérant que le déplacement de l'ARN polymérase lors de l'élongation des transcrits suffirait à déplacer les dimères d'H-NS et ainsi désorganiser les oligomères qui pourraient cependant se reformer après son passage (Kotlajich *et al.*, 2015) (Wade and Grainger, 2018). En revanche, ces oligomères empêcheraient la fixation de l'ARN polymérase sur des promoteurs cryptiques responsables de la production de transcrits parasites qui impacterait la régulation génique chez la bactérie (Singh *et al.*, 2014) (**Figure 21**). La liaison de H-NS sous forme d'oligomères peut aussi être corrélée aux sites de terminaison de la transcription dépendante de Rho. Les interactions génétiques entre H-NS et Rho laissent entrevoir que H-NS assisterait Rho dans la terminaison de la transcription (Peters *et al.*, 2012) (Kotlajich *et al.*, 2015).

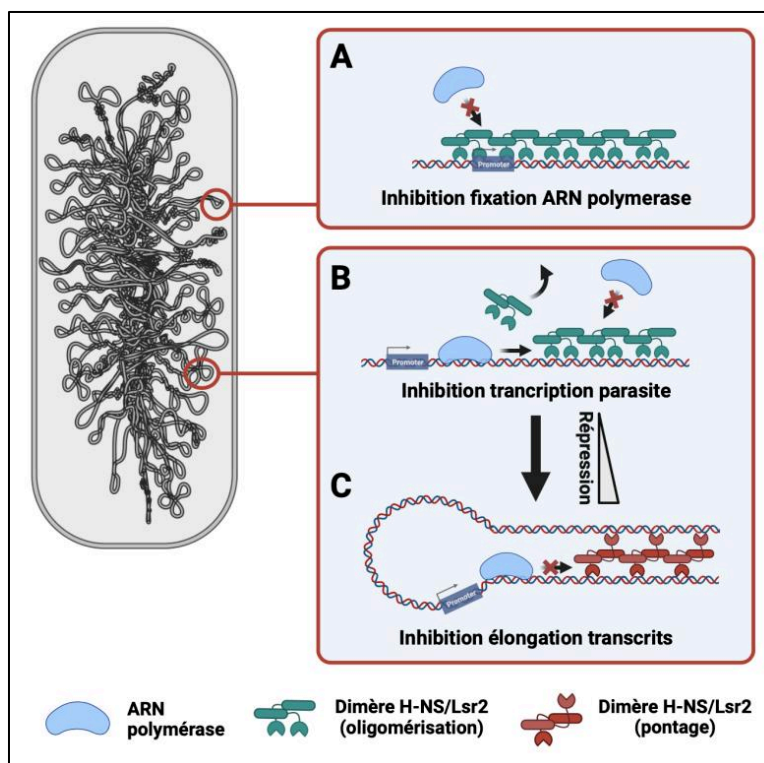


Figure 21 : Mécanisme de répression des NAPs de type H-NS (H-NS, Lsr2) dépendant de l'oligomérisation et du pontage d'ADN. Différents mécanismes ont été proposés pour

expliquer le rôle de ces protéines dans la répression de l'expression des gènes. Le premier passe par la formation d'oligomères sur le promoteur, bloquant sa liaison par l'ARN polymérase (**A**). Le second dépend de la formation d'oligomères sur la région codante du gène cible, pouvant soit bloquer la production d'ARN parasites en empêchant la fixation d'ARN polymérase sur le corps du gène (**B**), soit bloquer l'élongation des transcrits du gène cible lors de la formation de ponts entre oligomères, se traduisant par un renforcement de leur liaison à l'ADN (**C**). Cette figure est tirée de la revue: Lsr2: Protéine Associée au Nucléoïde (NAP) et facteur transcriptionnel chez les mycobactéries, *Médecines/Sciences*, acceptée (Gerges, Herrmann et Crémazy).

2.4 Le rôle des NAPs dans les réponses aux stress

Pour garantir leur survie, les bactéries doivent constamment faire face à divers stress dans leurs environnements hôtes, notamment le stress lié à la réplication, le stress oxydatif, le stress thermique, le manque de nutriments, les défenses immunitaires de l'hôte durant l'infection, l'exposition aux antibiotiques, ou toute autre forme de stress susceptible d'endommager leur ADN (Rustad *et al.*, 2009) (Singh, 2017). Cette capacité à résister à ces divers types de stress repose sur une série de mécanismes de défense et d'adaptation visant à préserver l'intégrité de leur ADN et à maintenir leur viabilité (Meyer and Grainger, 2013). De nombreuses recherches ont suggéré que les NAPs jouent un rôle essentiel dans la capacité d'une bactérie à s'ajuster à des conditions adverses. Certaines NAPs peuvent agir comme des "forces de réaction rapide" en altérant la topologie de l'ADN, ce qui a pour effet de préserver son intégrité ou de modifier le profil de transcription des gènes, notamment ceux essentiels à la survie de la bactérie (**Tableau 6**) (Wang *et al.*, 2012) (Duprey, Reverchon and Nasser, 2014) (Chen *et al.*, 2022). Les études ont montré que le niveau de synthèse de nombreux NAPs augmente dans plusieurs conditions de stress (Bartek *et al.*, 2014) (Stojkova *et al.*, 2019). Dans la suite, nous présentons des exemples de NAPs et expliquons leur rôle dans la réponse aux situations de stress.

Tableau 6 : Exemples de NAPs impliquées dans la réponse cellulaire déclenchée lors de la détection de conditions de stress chez différentes espèces bactériennes. Drd : *Deinococcus radiodurans*, Hpy : *Helicobacter pylori*, Mtb : *Mycobacterium tuberculosis*, Sar : *Staphylococcus aureus*, Sco : *Streptomyces coelicolor*, Ftn : *Francisella tularensis*, Sm : *Salmonella*, Ddn : *Dickeya dadantii*, Sven : *Streptomyces venezuelae* (Hołówka and Zakrzewska-Czerwińska, 2020)

Protein	Stress type	Response
Drd HU	radiation	DNA-coating protective mechanism
Hpy HU	oxidative/acidic stress	
Mtb NaM	host defences mechanisms	
Sar MgrA	oxidative stress	
Sco IHF	nutrient exhaustion	
Sco HupS		
Ftn HU	oxidative stress	
Sm HU	host defences mechanisms	Influencing genes expression
Mtb HupB		
Mtb IHF		
Mtb Lsr2	host defences mechanisms	
Mtb NapA		
Ddn H-NS		
Ddn Fis	environmental conditions	
Sm H-NS		
Sven Lsr2		

La protéine Dps se lie à l'ADN de manière non spécifique. Elle a la capacité de protéger l'ADN lors de l'exposition aux rayonnements ultraviolets (UV) et dans les cellules en phase stationnaire en régulant l'initiation de la réplication (Karas *et al.*, 2015) (Chen *et al.*, 2022). En outre, en raison de son activité de ferroxidase, la protéine Dps est considérée comme l'un des principaux facteurs contribuant à la résistance au stress oxydatif chez *E. coli* (Chiancone and Ceci, 2010), *B. cereus* (Shu *et al.*, 2013), *B. anthracis* (Tu *et al.*, 2012), *M. massiliense* (de Alcântara *et al.*, 2020) et *P. aeruginosa* (Rajapaksha *et al.*, 2023). D'ailleurs, MrgA, une protéine homologue de Dps, est exprimée dans des conditions de stress oxydatif chez *S. aureus* et contribue à compacter le nucléoïde pour le protéger de la dégradation (Ushijima *et al.*, 2017).

Chez *S. enterica*, la protéine Fis joue un rôle dans la résistance aux défenses de l'hôte et dans l'adaptation à l'environnement intracellulaire. Dans l'environnement intestinal, les bactéries sont confrontées à des conditions anaérobies et à une forte osmolarité, ce qui entraîne une augmentation de la superhélicité de l'ADN. Fis, en stabilisant cette structure de l'ADN au début de l'infection, active l'expression des îlots de pathogénicité de *Salmonella* de type 1 (SPI-1), responsables de l'invasion de l'intestin, par le biais d'une cascade d'événements

impliquant des activateurs tels que HilA, HilC et HilD. En revanche, lorsque les bactéries pénètrent dans les macrophages, elles sont confrontées à un stress oxydatif qui provoque une détente de l'ADN dépendante de Fis. Cela stimule la production d'un régulateur appelé SsrB, suivi de l'activation du SPI-2, qui codent des facteurs essentiels à la survie des bactéries à l'intérieur des cellules hôtes (Dorman, 2009) (Duprey, Reverchon and Nasser, 2014) (**Figure 22**). De même, après l'exposition d'*E. coli* à H₂O₂, il a été rapporté que Fis active l'expression de la protéine TopA (topoisomérase de type I) en liant son promoteur. L'activation de cette enzyme induit la relaxation de la superhélicité de l'ADN, facilitant ainsi l'accès à l'ARN polymérase, ce qui favorise l'expression des gènes impliqués dans la réponse au stress oxydatif et permet l'accès des protéines de réparation aux sites d'ADN endommagés (Dages *et al.*, 2020).

D'autres rôles des NAPs dans les réponses au stress ont été démontrés, notamment le rôle de la protéine HU dans la protection de l'ADN chromosomique contre l'acidité rencontrée par *H. pylori* dans l'estomac (Wang *et al.*, 2012), le rôle d'IHF dans la formation des spores chez *Streptomyces* en cas de limitation des nutriments et de variation de température (Swiercz *et al.*, 2013), ainsi que le rôle d'H-NS et d'IHF dans la régulation de la cascade de résistance au stress acide (Krin *et al.*, 2010) (Bi and Zhang, 2014).

Enfin, il est important de noter que l'exposition aux antibiotiques constitue également l'un des facteurs de stress auxquels les bactéries sont confrontées et avec lesquels les NAPs peuvent interagir. Des démonstrations de cette interaction incluent la protéine H-NS chez *Acinetobacter baumannii* après exposition aux carbapénèmes (Huang *et al.*, 2020), Fis chez *P. aeruginosa* après exposition à la ciprofloxacine (Long *et al.*, 2020), IHF chez *N. meningitidis* après exposition à la rifampicine (Lee *et al.*, 2006) et Lsr2 chez *M. smegmatis* suite à l'exposition à la vancomycine (Kołodziej, Łebkowski, *et al.*, 2021).

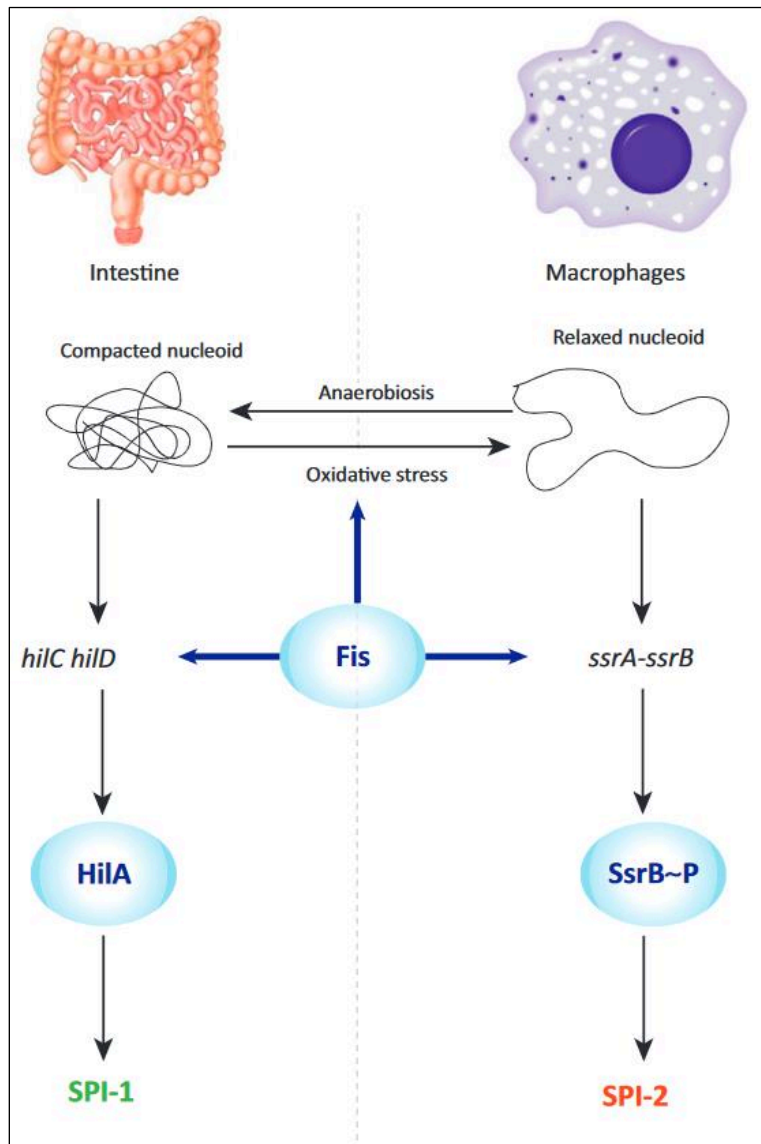


Figure 22 : L'effet de la protéine Fis dans l'adaptation de *S. enterica* aux environnements hostiles (Duprey, Reverchon and Nasser, 2014).

2.5 Le rôle des NAPs dans la virulence bactérienne

La fonction des NAPs en tant que facteur de liaison à l'ADN indique leur influence dans la régulation génique et la coordination des processus cellulaires et moléculaires essentiels chez les bactéries. Chez les bactéries pathogènes, ces protéines participent notamment à la régulation de l'expression des gènes de virulence, tels que la formation de biofilms (Devaraj *et al.*, 2015), l'invasion des cellules hôtes et l'échappement au système immunitaire (Finke *et al.*, 2019).

H-NS

La protéine H-NS est connue comme un répresseur transcriptionnel pléiotropique régulant plusieurs gènes de virulence chez de nombreuses entérobactéries. H-NS joue un rôle dans la thermomodulation de l'expression des facteurs de virulence (Madrid *et al.*, 2002), la résistance aux antimicrobiens, la formation de biofilms, l'adhésion, l'invasion des cellules hôtes et la biosynthèse des polysaccharides (Ares *et al.*, 2016) (Rodgers *et al.*, 2021) (Xue *et al.*, 2022).

Il est important de noter que l'effet de H-NS sur la virulence est complexe et peut différer d'une espèce bactérienne à l'autre, ainsi que selon le contexte environnemental dans lequel se retrouve la bactérie. Dans certains cas, H-NS peut agir comme un régulateur négatif de la virulence en réprimant l'expression de gènes de virulence. Par exemple, une étude comparative des transcriptomes chez *A. baumannii*, entre les souches sauvages et les souches mutantes pour le gène *hns* (Δhns) a révélé une augmentation particulièrement significative de l'expression des gènes associés au système de sécrétion de type VI, aux pili de type I. Elle a également montré une augmentation de l'expression des gènes impliqués dans l'adhérence aux cellules hôtes chez les souches Δhns (Eijkelkamp *et al.*, 2013) (**Figure 23**). La délétion du gène *hns* transforme cette bactérie en une forme hypermotile, dotée d'une virulence accrue. Au contraire, la mutation de ce gène chez les souches d'*E. coli* entérohémorragiques entraîne une diminution du taux de survie au sein des phagocytes, ainsi qu'une capacité moindre à coloniser le tractus digestif des souris, conduisant à un taux de survie supérieur par rapport aux souches sauvages (Wan *et al.*, 2016).

D'autres rôles pour H-NS dans la virulence ont été mis en évidence chez *Klebsiella pneumoniae*, notamment dans la régulation de l'expression des pili de type III et du polysaccharide de la capsule (Ares *et al.*, 2016). Chez *V. cholerae*, H-NS joue un rôle dans la régulation des gènes impliqués dans l'attachement aux cellules hôtes et le développement de biofilms (Ayala *et al.*, 2015). De plus, dans le complexe *B. cepacia*, H-NS est impliquée dans

la régulation de la motilité, la synthèse des pili et le système de sécrétion de type VI (Gomes *et al.*, 2021).

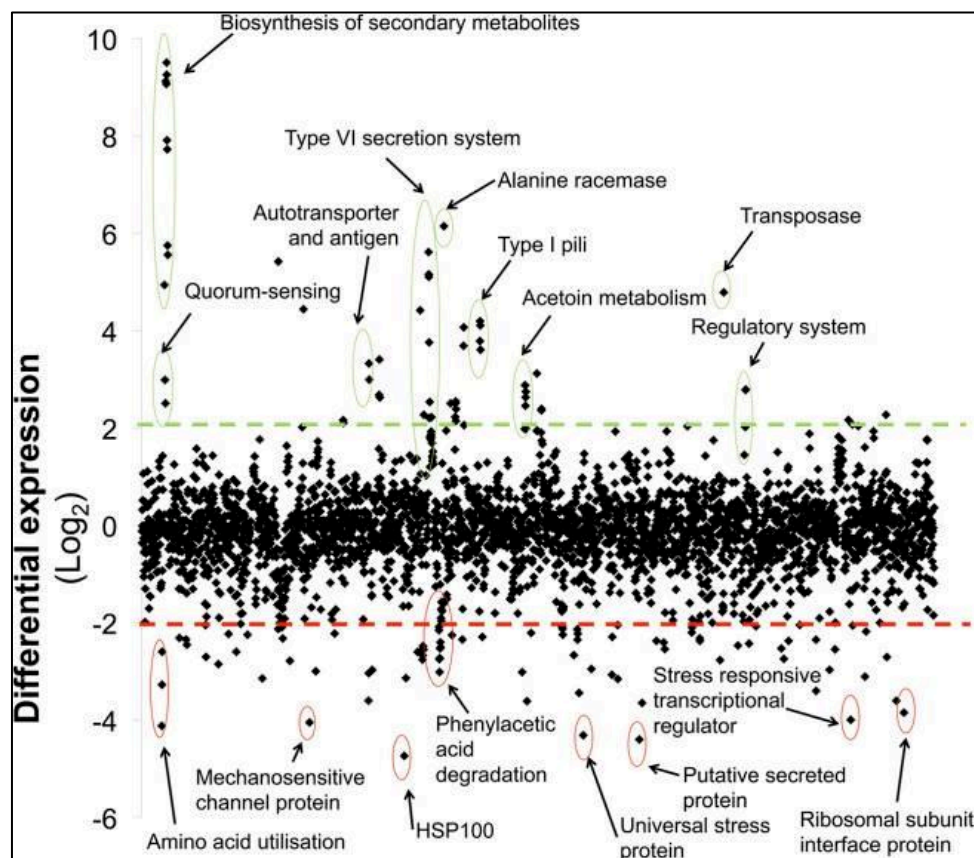


Figure 23 : Volcano plot montrant les gènes différentiellement régulés par H-NS dans *A. baumannii* en comparant les transcriptomes des souches sauvages (WT) et mutantes pour *hns* (Δhns). Les gènes présentant une variation d'expression supérieure à 4 ($\text{Log}_2\text{FoldChange} \leq -2$ ou ≥ 2) entre les deux conditions sont considérés comme significativement régulés par H-NS. Les gènes surexprimés dans les mutants sont situés au-dessus de la ligne verte, tandis que les gènes sous-exprimés se trouvent en dessous de la ligne rouge. Des exemples de gènes régulés de manière significative sont indiqués (Eijkelkamp *et al.*, 2013).

Hha

Hha est une petite protéine (8.79 kDa) qui a été initialement identifiée comme un régulateur négatif de l'expression de la toxine α -hémolysine au sein des souches uropathogènes d'*E. coli* (Nieto *et al.*, 1991). Bien que cette protéine soit classée parmi les NAPs (Dillon and Dorman, 2010), elle ne peut interagir avec l'ADN par elle-même. En interagissant avec le domaine de dimérisation de la protéine H-NS, Hha forme un complexe nucléoprotéique qui se lie à

l'ADN, régulant ainsi l'expression de nombreux gènes nécessaires à l'infection par les entérobactéries (de Alba *et al.*, 2011) (Vishwakarma *et al.*, 2014). Cette protéine réprime le locus de pathogénicité de l'effacement des entérocytes (LEE), réduit la formation initiale de biofilms et altère la transcription des gènes codant pour des fimbriae chez les souches pathogènes d'*E. coli* (Ren *et al.*, 2004) (Sharma *et al.*, 2005).

Le rôle de régulation de la protéine Hha est particulièrement étudié dans la virulence de *S. enterica Typhimurium*. Elle agit comme un régulateur négatif des SPI-1 et SPI-2. En interagissant avec la protéine H-NS, Hha module l'invasion de *Salmonella* dans les cellules M en régulant les gènes d'invasion tels que *invF*, *prgH*, *sipC*, *rtsA*, ainsi que l'expression de *hilA*, un activateur transcriptionnel du système de sécrétion de type III (Fahlen *et al.*, 2001) (Olekhovich and Kadner, 2007). De plus, Hha joue un rôle de toxine par l'intermédiaire du système Hha-TomB, un système de toxine-antitoxine, qui régule des aspects clés de la pathogénèse de *S. enterica Typhimurium* (Jaiswal *et al.*, 2016) (Paul *et al.*, 2022).

HU

Depuis sa découverte en 1975 chez *E. coli* (Rouvière-Yaniv and Gros, 1975), la protéine HU a été reconnue comme jouant un rôle majeur chez de nombreuses bactéries pathogènes, dont *S. enterica*, *S. pneumoniae*, *Francisella tularensis* et *V. cholerae* (Stojkova *et al.*, 2019). Les recherches ont démontré que la protéine HU pourrait être sécrétée par les bactéries à Gram négatif et à Gram positif dans l'espace extracellulaire (Stojkova and Spidlova, 2022) (**Tableau 7**). Cette libération pourrait influencer leur interaction avec l'environnement, y compris les réactions de l'hôte et les processus infectieux. La sécrétion de la protéine HU par le système de sécrétion de type IV a été décrite chez *Haemophilus* (Jurcisek *et al.*, 2017). De même, la protéine HU fait partie des protéines excrétées dans le milieu de culture par *H. pylori*, ce qui laisse supposer qu'elle participe au déclenchement de l'inflammation gastrique (Kim *et al.*, 2002). En outre, la protéine HU de *V. cholerae* est cruciale pour la réplication du phage CTX ϕ , qui est à l'origine de sa virulence (Martínez *et al.*, 2016). Des interactions entre la protéine HU et les protéines hôtes ont également été observées chez *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Paino *et al.*, 2012). La protéine HU se lie à l'IL-1 β de l'hôte, suggérant ainsi qu'elle pourrait jouer un rôle dans la modulation de la réponse inflammatoire lors d'une infection (Paino *et al.*, 2012).

De manière parallèle, la protéine HU exerce une influence sur la régulation de l'expression génique. HU coordonne la régulation des gènes liés au métabolisme, la réponse au stress, la virulence et la physiologie de *S. enterica Typhimurium* (Mangan *et al.*, 2011). Les souches délétères de *hu* présentent une altération de l'expression des gènes impliqués dans la

formation des flagelles, ce qui a un impact sur la motilité de *Salmonella*. Dans le cas de *S. pneumoniae*, la protéine HU joue également un rôle essentiel dans la viabilité cellulaire (Ferrándiz *et al.*, 2018). Chez *E. coli*, la protéine HU régule approximativement 8 % des gènes de l'ensemble du génome, ces gènes étant impliqués dans l'adaptation de la bactérie à l'environnement hostile de la cellule hôte et dans sa réaction au stress (Oberto *et al.*, 2009).

Tableau 7 : Les espèces bactériennes sécrétant la protéine HU (d'après Stojkova and Spidlova, 2022).

Bactéries	Sécrétion (localisation extracellulaire)
<i>E. coli</i>	biofilms
<i>F. tularensis</i>	vésicules extracellulaires
<i>P. aeruginosa</i>	biofilms
<i>B. cenocepacia</i>	biofilms
<i>H. pylori</i>	surnageant de culture
<i>Streptococcus</i> groupe A	interaction avec l'héparine et l'acide lipotéichoïque de l'hôte
<i>H. influenzae</i>	biofilms

Fis

Dans les souches d'*E. coli* entéropathogènes, Fis active la transcription de trois gènes, à savoir *espA*, *espB* et *espD*, qui codent des protéines sécrétées, ainsi que du gène régulateur de virulence *ler* (Saldaña-Ahuactzi *et al.*, 2022). L'implication de la protéine Fis dans la virulence a également été décrite chez *V. cholerae*, où elle participe à la modulation de la production de HapR, un régulateur principal dans le mécanisme de communication cellulaire (quorum sensing) (Lenz and Bassler, 2007). De même, la protéine Fis est essentielle à l'expression de la capsule chez *Pasteurella sp.* Les gènes *pfhB_2* et *plpE*, codant respectivement une hémagglutinine filamenteuse et un antigène immunodominant, deux facteurs de virulence bien connus chez cette bactérie, sont notamment régulés par cette protéine (Steen *et al.*, 2010). Fis, en collaboration avec d'autres régulateurs incluant les NAPs telles que HU, H-NS et IHF, joue un rôle dans la régulation des gènes de virulence de *S. enterica*. Des études ont montré que Fis coopère avec le régulateur primaire de réponse au

stress OmpR pour réguler conjointement l'expression de SPI-1 et SPI-2 (Schechter *et al.*, 2003) (Cameron and Dorman, 2012).

CbpA

CbpA est un autre exemple de NAP conservée dans la plupart des γ -protéobactéries et décrite pour son rôle dans la virulence chez de nombreuses espèces bactériennes (Ueguchi *et al.*, 1994) (Tulli *et al.*, 2013). CbpA interagit avec le sillon mineur de l'ADN (Dillon and Dorman, 2010). Elle est connue aujourd'hui sous le nom de protéine de liaison au collagène A en raison de ses propriétés adhésives envers le collagène (Chintakayala *et al.*, 2015) (Finke *et al.*, 2019). Chez les souches du groupe *Bacillus cereus*, CbpA est impliquée dans les processus d'adhésion lors de l'infection, dont l'expression est contrôlée par le cyclic diguanylate monophosphate (c-di-GMP) (Finke *et al.*, 2019). De même, CbpA améliore la capacité de *Clostridium difficile* à se lier à la matrice extracellulaire, avec une affinité élevée de la protéine recombinante pour l'adhérence au collagène de type I et V (Tulli *et al.*, 2013).

CbpA est désormais considérée comme une protéine de surface cible pour le développement d'un vaccin pneumococcique (Rafi *et al.*, 2023). De nombreuses études antérieures ont prouvé que la protéine CbpA est un déterminant important de la virulence pour *S. pneumoniae*. Elle est essentielle pour initier l'adhésion de la bactérie aux cellules épithéliales des surfaces muqueuses de l'hôte et pour la colonisation du nasopharynx (Zhang *et al.*, 2000) (Orihuela *et al.*, 2009). De même, CbpA permet aux pneumocoques d'établir un contact initial avec l'endothélium cérébral, ce qui pourrait entraîner l'invasion des méninges via le passage de la barrière hémato-encéphalique (Al-Obaidi and Desa, 2018). Le rôle de CbpA dans l'immunopathophysiologie de *S. pneumoniae* peut également être résumé par l'induction de la libération de l'interleukine-6 et des chimiokines CCL2, CXCL1 et CXCL8 à partir des cellules épithéliales bronchiques humaines, ainsi que par la liaison au composant sécrétoire de l'immunoglobuline A (IgA), à la protéine du complément C3 et au facteur H humain (Hammerschmidt *et al.*, 1997) (Janulczyk *et al.*, 2000) (Robson, Reed and Horvat, 2006) (Bernatoniene *et al.*, 2008) (Cao *et al.*, 2011).

IHF

IHF joue un rôle important dans la régulation de divers processus biologiques au sein des protéobactéries. Bien que cette protéine contribue à la virulence des bactéries provoquant des infections chez les humains, telles que *Salmonella spp.* (Leite *et al.*, 2017), *E. coli* (Prieto *et al.*, 2012) et *V. cholerae* (Stonehouse *et al.*, 2008), elle participe également à la virulence des

bactéries causant des infections chez les plantes, telles qu'*Erwinia amylovora* (Lee and Zhao, 2016) et *Dickeya dadantii* (Reverchon *et al.*, 2020).

De manière intéressante, cette protéine influence l'expression des gènes nécessaires à *Salmonella* pour répondre aux changements physiologiques liés à la transition entre la croissance exponentielle et la phase stationnaire. Elle joue également un rôle dans la régulation des principaux gènes de virulence et d'invasion des cellules épithéliales (Mangan *et al.*, 2006). IHF joue un rôle central dans la biogenèse du biofilm de *S. enterica* Enteritidis et active la production des pili chez *S. enterica* Typhimurium (Gerstel *et al.*, 2003) (Leite *et al.*, 2017). De plus, IHF est indispensable pour l'expression adéquate de l'opéron *virB* de *Brucella abortus*, lequel code le système de sécrétion de type IV (Sieira *et al.*, 2004). Dans le cas de *Shigella flexneri*, IHF exerce une régulation positive sur l'expression des gènes de virulence en se liant à plusieurs promoteurs, notamment les promoteurs *virF*, *virB* et *icsA* (Porter and Dorman, 1997). Chez les souches d'*E. coli* entéropathogènes et entérohémorragiques, IHF est considérée comme un répresseur des gènes des flagelles (Martínez-Santos *et al.*, 2012). Cependant, elle est un activateur de l'expression des gènes codant la capsule (antigène K) chez les souches d'*E. coli* responsables d'infections extra-intestinales (Aldawood and Roberts, 2022).

2.6 Les NAPs chez les mycobactéries

Le nombre de NAPs proposées jusqu'à présent chez les mycobactéries est nettement inférieur à celui observé dans d'autres bactéries. Leur rôle complet dans la structuration de l'ADN reste mal élucidé et nécessite davantage d'études. À ce jour, six NAPs ont été décrites : EspR, HupB, mIHF, NapM, MDP2 et Lsr2 (Kriel *et al.*, 2018).

EspR

EspR (Enhanced intracellular survival protein R) est une petite protéine de 14.7 kDa, hautement conservée chez les mycobactéries et les autres actinomycètes. Sa concentration intracellulaire augmente tout au long du cycle cellulaire, atteignant environ 100 000 molécules par cellule en phase stationnaire. EspR agit principalement en tant que protéine de liaison à l'ADN facilitant son pontage. Elle présente une affinité plus importante pour le sillon majeur de l'ADN et se lie de manière spécifique à celui-ci (Blasco *et al.*, 2012). L'étude de sa distribution sur le génome de *M. tuberculosis* a identifié 165 sites de liaison, dont 55% sont intragéniques (Blasco *et al.*, 2011). Des recherches ont suggéré que 77 % des gènes liés par EspR sont également ciblés par la protéine Lsr2 chez *M. tuberculosis*, suggérant une interaction physique entre ces deux protéines (Gordon *et al.*, 2010). Du côté

virulence, EspR joue un rôle dans la régulation de l'ESX1, le système de sécrétion de type VII chez *M. tuberculosis*. En outre, une étude très récente a démontré le rôle de cette protéine dans l'augmentation de la persistance de *M. tuberculosis* et la propagation du VIH lors d'une co-infection. Cette protéine, en tant que facteur de transcription, se lie à la région promotrice du gène codant la cytokine interleukine 4 (IL-4) tout en activant son expression. Cela favorise l'activation des cellules T helper de type 2 (Th2) et conduit à une polarisation des macrophages vers un état inflammatoire caractérisé par une réponse anti-inflammatoire et une capacité réduite à éliminer les bactéries intracellulaires (Yandrapally *et al.*, 2023).

HupB

HupB (Histone-like protein HU-beta) (MBP-1/Hlp/MtHU) est une protéine de 22 kDa, initialement identifiée chez *M. tuberculosis*. Cette protéine présente une similarité de 43% avec la protéine HU codée par le génome d'*E. coli* (Datta *et al.*, 2019). Contrairement à d'autres homologues de HU, HupB est présente à des niveaux faibles dans la cellule durant la croissance exponentielle (~117 molécules/cellule) (Kriel *et al.*, 2018). Elle présente une affinité plus marquée au sillon mineur de l'ADN avec une préférence de liaison pour les séquences d'ADN spécifiques riches en AT (Bhowmick *et al.*, 2014). HupB contribue à la courbure de l'ADN, en favorisant sa compaction (Gupta *et al.*, 2014). Des recherches ont montré que cette protéine est un acteur clé de la croissance de *M. tuberculosis in vitro* et au sein des macrophages alvéolaires (Pandey *et al.*, 2014). Par son effet régulateur, HupB affecte l'expression de gènes impliqués dans plusieurs fonctions biologiques importantes chez l'agent tuberculeux, notamment la modulation immunitaire, l'adhésion aux macrophages alvéolaires, l'assemblage de la couche d'acide mycolique, l'acquisition du fer et la formation de biofilms (Kriel *et al.*, 2018) (Singh *et al.*, 2022).

mIHF

mIHF (mycobacterial Integration Host Factor) est une protéine cytosolique de 20 kDa, initialement identifiée chez *M. smegmatis* (Pedulla *et al.*, 1996). Elle est considérée comme la troisième protéine la plus abondante chez *M. tuberculosis*, après Lsr2 et HupB (Schubert *et al.*, 2013). mIHF joue un rôle essentiel dans la croissance et la viabilité de *M. smegmatis*, ainsi que dans la croissance *in vitro* de *M. tuberculosis* (Pedulla *et al.*, 1996) (Hołowka *et al.*, 2023). Cette protéine agit en tant que régulateur transcriptionnel, exerçant à la fois un contrôle direct et indirect sur les gènes nécessaires à la pathogenèse de *M. tuberculosis*. Les analyses par RNA-seq ont révélé que l'expression de 209 gènes chez *M. tuberculosis* était significativement modulée par mIHF. Parmi ces gènes, on retrouve ceux impliqués dans le métabolisme des lipides, la virulence et la régulation de la transcription. De plus, les études

par ChIP-seq ont identifié 153 sites de fixation pour cette protéine le long du chromosome de *M. tuberculosis* (Odermatt *et al.*, 2018). mIHF se lie à l'ADN de manière non spécifique et contribue à sa compaction grâce à un mécanisme de courbure (Mishra *et al.*, 2013).

NapM

NapM (Nucleoid-associated protein in mycobacteria) est une protéine de 13 kDa présente dans tous les génomes mycobactériens séquencés. Elle se lie à l'ADN de manière non spécifique avec une affinité pour le sillon majeur de l'ADN et les séquences riches en AT. NapM participe au pontage de l'ADN et peut le protéger de la digestion par la DNase I (Y. Liu *et al.*, 2016). L'expression du gène codant la protéine NapM connaît une augmentation significative en réponse à divers signaux de stress, tels que l'exposition aux antibiotiques, le stress oxydatif et les lésions de la membrane cellulaire. NapM contribue à la survie de *M. tuberculosis* en période de stress et à l'intérieur des macrophages lors d'une infection (Liu *et al.*, 2019). Chez *M. smegmatis*, NapM régule l'expression de 156 gènes avec un effet répressur plus marqué. A la fois, chez *M. tuberculosis* et *M. smegmatis*, cette protéine joue un rôle dans la régulation des gènes de résistance à la rifampicine et l'éthambutol (Y. Liu *et al.*, 2016).

MDBP2

MDBP2 (Mycobacterial DNA binding protein 2) est une protéine de 13.8 kDa, qui prédomine principalement pendant la phase exponentielle de croissance. Cette protéine a été initialement annotée comme un orthologue de H-NS dans le génome de *M. tuberculosis*; cependant, les études de complémentation fonctionnelle n'ont pas confirmé un fonctionnement similaire à celui de l'H-NS d'*E. coli* (Werlang *et al.*, 2009). Les informations concernant son mode de liaison à l'ADN ainsi que son rôle au sein des mycobactéries restent limitées. À ce jour, les études menées sur cette protéine suggèrent qu'elle ne semble jouer aucun rôle dans la compaction de l'ADN ni dans la virulence de *M. tuberculosis* (Odermatt *et al.*, 2017). De même, la suppression de MDP2 n'a pas entraîné de modifications de la forme ou de la taille du nucléoïde chez *M. tuberculosis*. Cependant, sa surexpression dans *M. smegmatis* a provoqué des altérations au niveau de la morphologie des colonies, de la formation de biofilms et de la motilité (Ghosh, Indi and Nagaraja, 2013). Des recherches supplémentaires seront nécessaires pour permettre une compréhension plus approfondie du rôle de cette protéine dans la physiologie des mycobactéries.

Le prochain chapitre sera consacré à une explication détaillée des fonctions de **Lsr2**, de ses modalités d'interaction avec l'ADN, ainsi que de son impact sur la physiologie des mycobactéries.

Chapitre V : La protéine Lsr2

1. Lsr2 : une protéine conservée chez les mycobactéries et les actinomycètes

Lsr2 est une petite protéine de 12 à 15 kDa, identifiée pour la première fois en 1991 chez *M. leprae* (Laal *et al.*, 1991) (Sela *et al.*, 1991). Au cours des trois dernières décennies, cette protéine a été caractérisée chez de très nombreuses actinobactéries, y compris les mycobactéries (Oftung *et al.*, 2000) (Chen *et al.*, 2006) (Le Moigne *et al.*, 2019), les streptomycètes (Gehrke *et al.*, 2019), les corynébactéries (Wiechert *et al.*, 2020), ainsi que les actinobactériophages (Pfeifer *et al.*, 2019). Une étude récente a révélé que parmi les 2951 génomes complets d'actinobactériophages analysés, la protéine Lsr2 était présente dans plus de 10 % de ces génomes, ce qui suggère que le gène *lsr2* a été acquis par les phages à partir de leur espèce hôte bactérienne (Sharma *et al.*, 2021). Le séquençage des génomes des mycobactéries a révélé que Lsr2 est une protéine hautement conservée, avec une identité de séquences d'acides aminés de plus de 85%, suggérant une fonction similaire pour la protéine (Chen *et al.*, 2006) (**Figure 24**). Chez les streptomycètes, leurs génomes codent deux paralogues de *lsr2*, contrairement aux mycobactéries qui ne possèdent qu'un seul gène *lsr2* (Gehrke *et al.*, 2019).

M. abscessus	MAKKVTVTLVDDVDGEAPADETVFEGVDGVTYEIDLSSKNAEKL RNQLSTWVEHARRVSG	60
M. smegmatis	MAKKVTVTLVDDDEDGEATADETVFGLDGVTYEIDLSAKNAAKLRNDLKOWVEAGRRVGG	60
M. avium	MAKKVTVTLVDDDEDGAGAADETVFGLDGVTYEIDLSSKNATKLRGDLKQWVAAGRRVGG	60
M. marinum	MAKKVTVTLVDDDEDGAGAADETVFGLDGVTYEIDLSSKNATKLRGDLKQWVAAGRRVGG	60
M. tuberculosis	MAKKVTVTLVDDDEDGSGAADETVFGLDGVTYEIDLSTKNATKLRGDLKQWVAAGRRVGG	60
M. leprae	MAKKVTVTLVDDDEDGAGAADETVFGLDGVTYEIDLTKNAAKLRGDLRQWVSAGRRVGG	60
	***** * * . *****:*****: *** **.:* ** .***.*	
M. abscessus	RRRGRGSSGSGRGRASIDREQSAAIREWARRNGHNVSSRGRIPAEVVDAFNAAN	114
M. smegmatis	RKRGRAATTTTRGRGAI DREQSAAIREWARRNGHNVSTRGRIPADVIDAFHAAT	114
M. avium	RRRGRSG--SGRGRGAI DREQSAAIREWARRNGHNVSTRGRIPADVIDAFHAAT	112
M. marinum	RRRGRSG--SGRGRGAI DREQSAAIREWARRNGHNVSTRGRIPADVIDAFHAAT	112
M. tuberculosis	RRRGRSG--SGRGRGAI DREQSAAIREWARRNGHNVSTRGRIPADVIDAYHAAT	112
M. leprae	RRRGRSN--SGRGRGAI DREQSAAIREWARRNGHNVSTRGRIPADVIDAFHAAT	112
	*.***. : **.:*****:*****:*****:***:***	

Figure 24 : Alignement de séquences de Lsr2 à partir d'espèces mycobactériennes. La comparaison des séquences de Lsr2 révèle une homologie significative entre les différentes espèces de mycobactéries étudiées (CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment).

2. Lsr2 : un déterminant physiologique important chez les mycobactéries

2.1 Lsr2 : un acteur majeur de la virulence des mycobactéries

Lsr2 est identifiée comme un antigène immunodominant chez *M. leprae* (Laal *et al.*, 1991). Plusieurs études ont mis en évidence une réponse cellulaire T dirigée contre cette protéine, caractérisée par une lymphoprolifération en réponse à de nombreux peptides de Lsr2 chez les patients souffrant de lèpre, ainsi que par la présence d'anticorps spécifiques ciblant ces peptides Lsr2 (Laal *et al.*, 1991) (Singh *et al.*, 1994) (Saini *et al.*, 2013). Parallèlement, une forte induction et sécrétion d'IFN- γ (Interferon- γ) par les cellules T CD3⁺ CD4⁺ a été mesurée dans des cultures de cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC) de patients atteints de lèpre lépromateuse stimulées avec les différents peptides de Lsr2 (Saini *et al.*, 2013).

Le rôle de Lsr2 dans la progression et la chronicité de l'infection a été démontré dans un modèle murin de tuberculose. Une absence de symptômes de la maladie et de lésions inflammatoires a été constatée dans le tissu pulmonaire des souris infectées par une souche dans laquelle Lsr2 avait été tronqué de son domaine C-terminal, même après quatre semaines post-infection (Bartek *et al.*, 2014). Chez *M. abscessus*, notre équipe a pu démontrer que l'expression accrue de *lsr2* dans le morphotype rugueux contribue significativement à sa virulence (Le Moigne *et al.*, 2019) (**Figure 25**). Lsr2 joue un rôle physiologique essentiel tant dans les morphotypes S que R de *M. abscessus*, influençant la croissance intracellulaire au sein des macrophages et des amibes (**Figure 25 et 25C**). Lsr2 contribue également à la virulence dans le modèle du poisson-zèbre et joue un rôle significatif dans la persistance de l'infection dans les poumons de souris infectées (**Figure 25D et 25E**). À la fois chez *M. abscessus* (Le Moigne *et al.*, 2019) et *M. tuberculosis* (Bartek *et al.*, 2014), Lsr2 joue un rôle crucial dans la défense de la bactérie contre les intermédiaires réactifs de l'oxygène (ROI) (**Figure 25F**), qui font partie des molécules anti-mycobactériennes les plus puissantes produites par l'hôte lors de l'infection intracellulaire des macrophages.

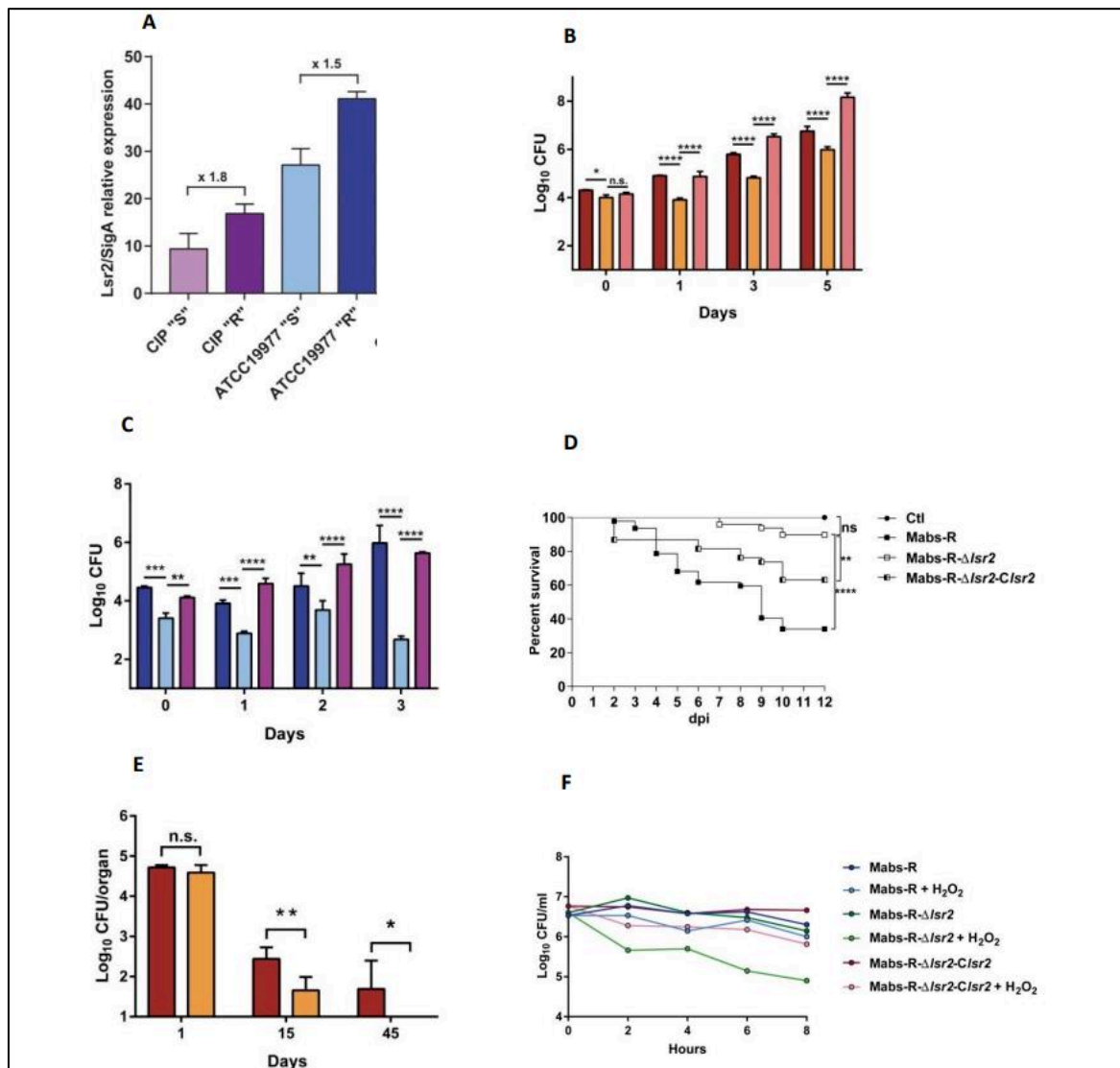


Figure 25 : *Lsr2* un déterminant physiologique important pour la virulence de *M. abscessus*. (A) : Étude comparative des niveaux d'expression de *lsr2* par RT-qPCR entre les deux morphotypes S et R de *M. abscessus* pour deux souches : CIP (Collection de l'Institut Pasteur) et ATCC19977 (American Type Culture Collection). (B) : Croissance intracellulaire du morphotype S sauvage de *M. abscessus* (Mabs-S : rouge), mutant pour *lsr2* (Mabs-S- Δ *lsr2* : orange) et complémenté pour *lsr2* (Mabs-S- Δ *lsr2*-C*lsr2* : rose) dans les macrophages évaluée au cours du temps. (C) : Croissance intracellulaire du morphotype R sauvage de *M. abscessus* (Mabs-R : bleu foncé), mutant pour *lsr2* (Mabs-R- Δ *lsr2* : bleu clair) et complémenté pour *lsr2* (Mabs-R- Δ *lsr2*-C*lsr2* : mauve) dans les amibes, évaluée au cours du temps. (D) : Courbe de survie des embryons de poissons-zèbres infectés par les souches Mabs-R, Mabs-R- Δ *lsr2* et Mabs-R- Δ *lsr2*-C*lsr2* et par de l'H₂O₂ (contrôle). (E) : Analyse comparative de la charge bactérienne au cours du temps des souches Mabs-S (rouge) et Mabs-S- Δ *lsr2* (orange) dans les poumons des souris infectées par voie intraveineuse. (F) : Profil de susceptibilité des souches Mabs-R, Mabs-R- Δ *lsr2* et Mabs-R- Δ *lsr2*-C*lsr2* aux dérivés oxydatifs (H₂O₂) (Le Moigne *et al.*, 2019).

2.2 Mutation de *lsr2* : impact sur la morphologie, la composition et la dynamique cellulaire des mycobactéries

L'absence de viabilité *in vitro* des mutants *lsr2* de *M. tuberculosis* a permis de montrer le caractère essentiel du gène *lsr2* chez ce pathogène (Sasseti *et al.*, 2003) (Colangeli *et al.*, 2007). Comparativement, chez *M. smegmatis* (Arora *et al.*, 2008) et *M. abscessus* (Le Moigne *et al.*, 2019), les mutants de *lsr2* restent viables *in vitro*. De manière tout aussi intéressante, Lsr2 joue un rôle majeur dans la morphologie et la composition de la membrane des mycobactéries. L'absence du gène *lsr2* chez *M. smegmatis* impacte fortement la morphologie et la taille des cellules bactériennes (**Figure 26**), inhibe la formation de biofilm, altère la biosynthèse de certains acides mycoliques tels que les mycolyl-diacylglycérols qui forment la membrane mycobactérienne, et confère un phénotype hypermotile à cette bactérie (Chen *et al.*, 2006) (Arora *et al.*, 2008) (Kołodziej, Łebkowski, *et al.*, 2021) (Kołodziej, Trojanowski, *et al.*, 2021). Ces observations peuvent probablement être attribuées à un effet indirect de Lsr2, en intervenant dans la régulation de l'expression de certains gènes codant des enzymes liées au métabolisme des lipides de la paroi cellulaire.

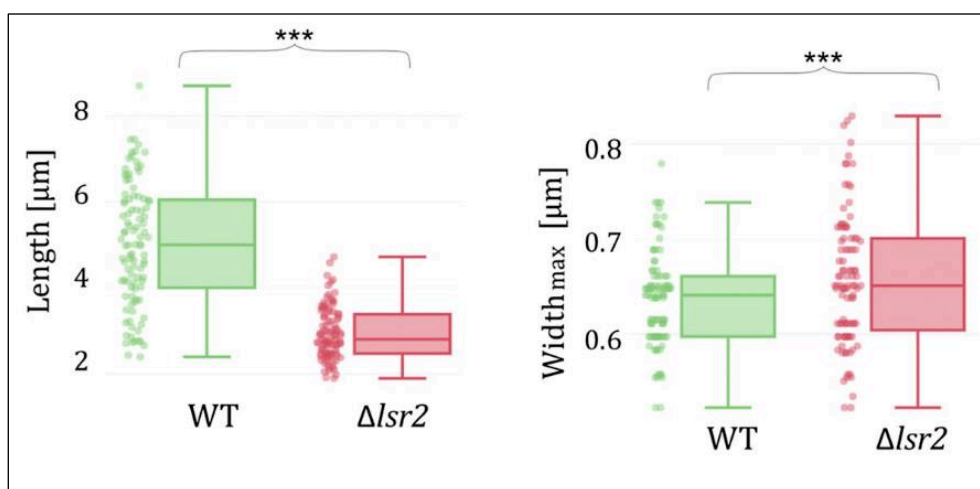


Figure 26 : Influence de la mutation de *lsr2* sur la morphologie de *M. smegmatis*. Comparaison de la longueur cellulaire (à gauche) et de la largeur cellulaire (à droite) entre la souche de *M. smegmatis* MC2 155 de type sauvage (WT) et la souche mutante pour *lsr2* (Δ *lsr2*) par microscopie en fluorescence suite à une coloration TMR-Tre (fluorescent trehalose). Les cellules de la souche Δ *lsr2* sont environ 42% plus courtes que les celles de la souche WT ($2,9 \pm 0,6 \mu\text{m}$ contre $5,0 \pm 1,4 \mu\text{m}$) et 30% plus larges ($0,94 \pm 0,09 \mu\text{m}$ contre $0,71 \pm 0,07 \mu\text{m}$) (Kołodziej, Trojanowski, *et al.*, 2021).

Plusieurs études ont aussi mis en évidence le rôle de Lsr2 dans la régulation des gènes nécessaires à la synthèse et le transport de lipides pariétaux complexes principalement retrouvés chez les MNT : les GPLs. La délétion de *lsr2* a conduit à une augmentation de la production des GPLs chez *M. smegmatis* (Kocíncová *et al.*, 2008). Cependant, il est intéressant de noter que l'absence de *lsr2* n'a eu aucun effet sur la production de GPLs chez les deux morphotypes de *M. abscessus* (Le Moigne *et al.*, 2019). En effet, la souche Mabs-R- Δ *lsr2* n'a pas adopté un morphotype lisse. Cependant, les souches Mabs-S- Δ *lsr2* et Mabs-R- Δ *lsr2* ont subi des changements morphologiques drastiques, se traduisant par une forte réduction de la taille des colonies (Le Moigne *et al.*, 2019) (**Figure 27**).

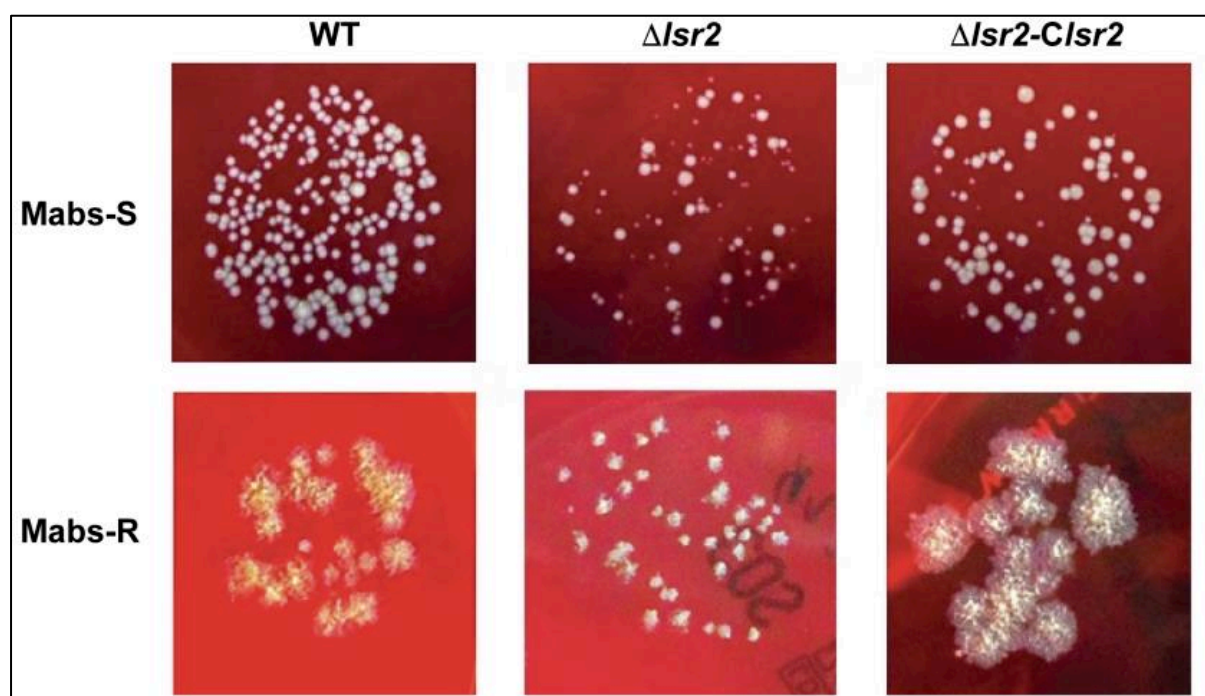


Figure 27 : Effet de la mutation de *lsr2* sur la taille des colonies des morphotypes S et R de *M. abscessus*. Photographies des colonies des souches sauvages (WT), des souches mutantes (Δ *lsr2*) et des souches complémentées (Δ *lsr2-Clsr2*) des deux morphotypes S (Mabs-S) et R (Mabs-R) de *M. abscessus* (Le Moigne *et al.*, 2019).

Finalement, les observations rapportées par Kołodziej et ses collaborateurs (2021) concernant la localisation de Lsr2 au cours du cycle cellulaire chez *M. smegmatis* suggèrent que cette protéine est impliquée dans des processus de régulation de la réplication de l'ADN et de ségrégation des chromosomes. Au début du cycle cellulaire, sa localisation sous forme d'un unique complexe, proche de la région *oriC*, indique un rôle potentiel dans la régulation de la réplication de l'ADN. Pendant la phase de réplication de l'ADN, le complexe Lsr2 est en

étroite proximité des réplisomes, suggérant son implication dans le bon déroulement de la réplication. Par la suite, le complexe majeur de Lsr2 se divise en complexes, qui se dirigent vers les pôles cellulaires opposés où se trouvent déjà les ségrosomes, montrant une coordination entre Lsr2 et le processus de ségrégation des chromosomes (Kołodziej, Trojanowski, *et al.*, 2021). Cette même étude a également signalé que l'absence de *lsr2* impacte à la fois le temps de réplication et la dynamique du réplisome.

3. Lsr2 comme une protéine associée au nucléoïde (NAP)

Lsr2 est composée de 110 à 120 acides aminés et est riche en arginine, ce qui en fait une protéine hautement basique (pI = 10,69), comme la majorité des autres membres de cette famille de NAP. Lsr2 est principalement présente dans le cytosol des cellules mycobactériennes sous forme d'homodimères (Chen *et al.*, 2006) (Summers *et al.*, 2012) (Qu *et al.*, 2013). En effet, Lsr2 combine les deux propriétés : celle d'une protéine associée au nucléoïde qui participe à l'organisation topologique du chromosome bactérien (Kriel *et al.*, 2018) et celle d'un régulateur transcriptionnel agissant principalement comme un répresseur de la transcription (Bartek *et al.*, 2014).

3.1 Lsr2 comme une protéine architecturante de l'ADN

Lsr2 représente l'orthologue fonctionnelle de la protéine H-NS (Dorman, 2004). Des expériences de complémentation génétique ont ainsi pu montrer que *lsr2* restaure le phénotype lié à la délétion du gène *hns* chez *E. coli*. De même manière, la complémentation de *lsr2* par le gène *hns* chez *M. smegmatis* permet de rétablir la morphologie rugueuse des colonies, qui avait été altérée suite à la délétion de *lsr2* (Gordon *et al.*, 2008). Bien que leurs séquences diffèrent fortement, ces protéines partagent d'importantes homologues dans leur liaison à l'ADN, à la fois sur le plan structurel et fonctionnel. Lsr2 et H-NS lient tous deux préférentiellement les séquences riches en AT. Cette caractéristique a conduit à l'hypothèse d'un rôle de ces protéines comme répresseurs xénogéniques de régions acquises par transfert horizontal, très souvent riches en AT (Navarre *et al.*, 2007) (Qin *et al.*, 2019) (Duan *et al.*, 2021).

Lsr2 se structure en deux domaines fonctionnels distincts (**Figure 28**), séparés par une région flexible : un domaine C-terminal (CTD), composé principalement de deux hélices α , responsable de sa liaison à l'ADN, et un domaine N-terminal (NTD) composé de deux sites qui lui permettent de s'oligomériser (Summers *et al.*, 2012). L'analyse structurale de Lsr2 a révélé une affinité plus marquée pour le sillon mineur de l'ADN, impliquant un motif RGR présent dans son domaine de liaison à l'ADN (Arginine-Glycine-Arginine) (Gordon *et al.*,

2011) (**Figure 28**). La substitution de ces deux résidus arginine par de l'alanine abolit presque complètement la capacité de liaison à l'ADN de Lsr2. Un autre résidu arginine (R84) conservé stabilise la liaison en interagissant avec les groupes phosphate de l'ADN (Gordon *et al.*, 2011). Une fois liée à l'ADN, Lsr2 peut recruter de nouveaux dimères à travers son domaine N-terminal, conduisant à la formation de filaments nucléoprotéiques rigides grâce à un mécanisme d'oligomérisation. Il a été montré que l'arginine en position 45 et l'aspartate en position 28 du NTD sont identifiés comme étant responsables de l'oligomérisation (Chen *et al.*, 2008).

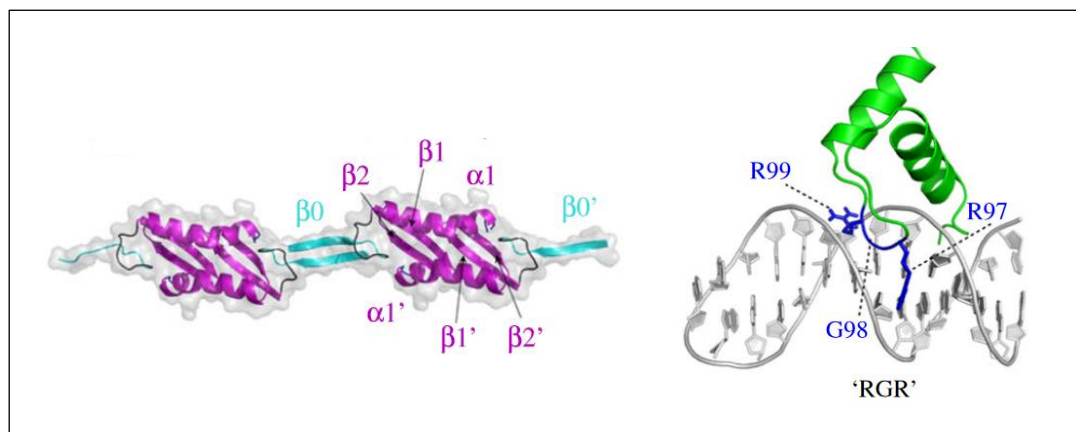


Figure 28 : Structure 3D de la protéine Lsr2. À gauche : modèle de structure du domaine d'oligomérisation (N-terminal) de Lsr2 tel que déterminé par cristallographie. Le site 1 de dimérisation est représenté en rose (feuillets $\beta 1$ et $\beta 2$ et hélice α) et le site 2 d'oligomérisation est représenté en bleu (feuillet $\beta 0$). Lors de la formation de dimères, les deux feuilles β des monomères s'alignent pour former une feuille β antiparallèle à quatre brins, avec une disposition antiparallèle des α -hélices de part et d'autre de la feuille. À droite : modèle de structure du domaine de liaison à l'ADN (C-terminal) de Lsr2 tel que montré par RMN (Résonance Magnétique Nucléaire). La boucle du motif de liaison (R97-G98-R99) au sillon mineur de l'ADN est représentée en bleu (Qin *et al.*, 2019).

L'oligomérisation de Lsr2 a été démontrée de plusieurs manières. Tout d'abord, elle a été confirmée *in vitro* par le biais d'expériences de retard sur gel (electrophoretic mobility shift assay) (Chen *et al.*, 2008). De plus, des structures filamenteuses ont été observées en microscopie électronique après l'ajout de l'ADN génomique d'*E. coli* à la protéine Lsr2, comme illustré dans la **Figure 29A** (Colangeli *et al.*, 2009). En outre, les expériences de ChIP-seq menées chez *M. tuberculosis* ont révélé la présence de longs domaines de liaison,

principalement au niveau des régions codantes pour les systèmes de sécrétion, suggérant ainsi un effet d'oligomérisation au niveau de ces régions (Gordon *et al.*, 2010) (**Figure 29B**).

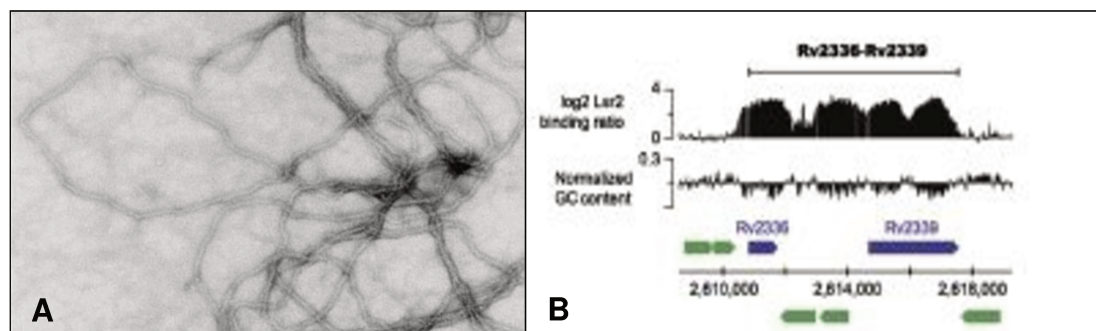


Figure 29 : Les complexes Lsr2/ADN observés *in vitro* et *in vivo*. (A) : Micrographie de Lsr2 recombinante purifiée intégrée dans de l'acétate d'uranyle (UA, coloration négative) observée par microscopie électronique, montrant une structure filamenteuse suite à l'ajout de l'ADN génomique d'*E. coli* (Colangeli *et al.*, 2009). (B) : Enrichissement de Lsr2 sous forme de longs domaines de liaison (8 kb) au niveau d'une région riche en AT, acquise par transfert horizontal (*Rv2236- Rv2339*), observé par ChIP-seq chez *M. tuberculosis* (Gordon *et al.*, 2010).

Si les conditions locales sont favorables, deux filaments nucléoprotéiques peuvent interagir ensemble et former un pont (**Figure 30**). Ce mécanisme de pontage peut non seulement connecter des fragments d'ADN proches, mais contribuerait également à établir des connexions entre des régions plus distantes dans le chromosome et ainsi au repliement tridimensionnel du génome, notamment en facilitant la formation de boucles chromosomiques (Gordon *et al.*, 2011). L'utilisation de la technique de microscopie à force atomique (AFM) a permis à Chen et ses collaborateurs (2008) de démontrer la capacité de la protéine Lsr2 à ponter l'ADN. Cette capacité a été mise en évidence par l'observation directe de la formation de boucles résultant de l'interaction entre les complexes Lsr2-ADN, dépendante de la concentration de protéines, que ce soit à partir de matrices linéaires ou circulaires. (Chen *et al.*, 2008). Il s'agit d'une caractéristique partagée avec la protéine H-NS (Dame *et al.*, 2005) (**Figure 30**), suggérant ainsi que Lsr2 est fonctionnellement similaire à H-NS. Cependant l'existence de boucles dépendantes de Lsr2 dans le chromosome bactérien *in vivo* reste encore à démontrer.

La formation des complexes Lsr2-ADN est sensible aux variations de conditions environnementales *in vitro*. La rigidité de ces complexes Lsr2-ADN semble être plus faible à 37°C qu'à 23°C (Qu *et al.*, 2013). Cette variation pourrait résulter d'une altération de la

capacité de Lsr2 à former des oligomères le long de l'ADN ou d'une modification de l'affinité de liaison entre Lsr2 et l'ADN à 37°C par rapport à 23°C. De même, cette rigidité est sensible aux variations de la concentration en sel. Des concentrations élevées de KCl entrave la formation de structures nucléoprotéiques rigides. Bien que les complexes H-NS-ADN aient été montrés comme sensibles aux variations de pH, il a été démontré que les nucléofilaments Lsr2-ADN restent insensibles aux variations de pH de 6.8 à 8.8 (Qu *et al.*, 2013).

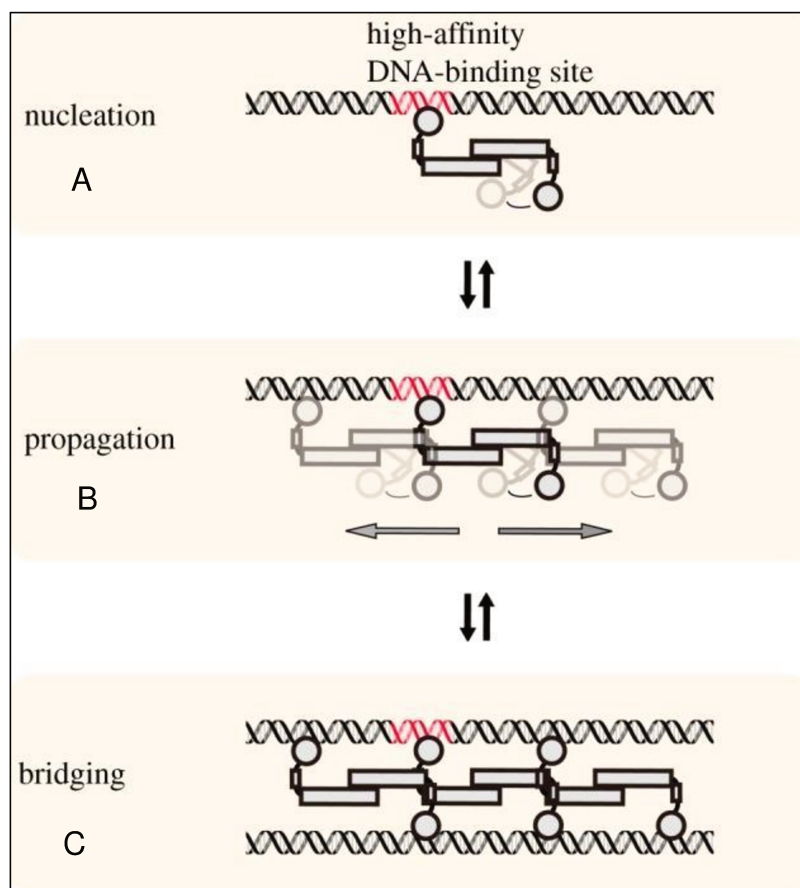


Figure 30 : Assemblage des complexes protéine-ADN fonctionnels par les NAPs de type H-NS (H-NS, Lsr2, MvAT et Rok). (A) : La liaison de Lsr2 à l'ADN commence sur un site de liaison de haute affinité dite site de nucléation (Rouge). (B) : Lsr2 se propage par la suite tout au long de l'ADN de manière coopérative grâce aux interactions protéine-protéine (oligomérisation). (C) : Dans certaines conditions favorables, un complexe de pontage ADN-protéine-ADN peut être formé, rapprochant des fragments d'ADN éloignés. Les flèches dans les sens inverses signifient que toutes ces étapes peuvent être réversibles (Qin *et al.*, 2019).

3.2 Lsr2 comme un facteur de transcription

Lsr2 est connue comme un régulateur transcriptionnel pléiotropique. Chez *M. tuberculosis*, Lsr2 module l'expression des protéines antigéniques et influence leurs interactions avec l'hôte, lui conférant ainsi un rôle dans la coordination des phases d'infection latente et persistante (Bartek *et al.*, 2014). Par ailleurs, Lsr2 joue un rôle crucial dans la modulation de l'expression d'une multitude de gènes liés à l'adaptation aux fluctuations des niveaux d'oxygène en se liant directement sur leur promoteur chez *M. smegmatis* (Kołodziej, Łebkowski, *et al.*, 2021) et chez *M. tuberculosis* (Bartek *et al.*, 2014). L'expression du gène *lsr2* connaît une augmentation significative en réponse à divers types de stress, favorisant ainsi l'adaptation aux changements environnementaux tels que la limitation des nutriments, les changements de température, ainsi que l'augmentation du fer et l'hypoxie (Wong *et al.*, 1999) (Betts *et al.*, 2002) (Stewart *et al.*, 2002) (Bartek *et al.*, 2014) (Kołodziej, Łebkowski, *et al.*, 2021). Il a également été observé que la surexpression du gène *lsr2* chez *M. tuberculosis* entraîne une répression très significative des gènes de virulence et induit des effets néfastes sur la capacité de la bactérie à déclencher une infection ou une maladie (Liu and Gordon, 2012). Ce rôle régulateur est également observé chez les streptomyces tels que *S. venezuelae*, une bactérie reconnue pour sa production d'antibiotiques et d'autres composés bioactifs (Gehrke *et al.*, 2019).

L'une des propriétés les plus intéressantes mises en évidence pour Lsr2 est son rôle en tant que modulateur de la résistance aux antibiotiques (Colangeli *et al.*, 2007). Chez *M. smegmatis*, l'absence du gène *lsr2* induit une sensibilité accrue des cellules à l'acide nalidixique et à la rifampicine, ainsi qu'une perméabilité augmentée de la vancomycine à travers la paroi cellulaire (Kołodziej, Łebkowski, *et al.*, 2021). Alternativement, la contribution de Lsr2 à la résistance aux antibiotiques chez *M. tuberculosis* a été expliquée par la répression d'une pompe d'efflux pour l'isoniazide suite à sa surexpression (Colangeli *et al.*, 2007).

En plus du rôle de Lsr2 démontré dans l'infection des hôtes eucaryotes, les récentes recherches menées par Dulberger et ses collaborateurs (2023) ont mis en évidence le rôle de Lsr2 dans la régulation de l'interaction entre les mycobactéries et les mycobactériophages. Cette étude a révélé que Lsr2 joue un rôle crucial dans l'infection virale en régulant la réplication des mycobactériophages dans les cellules hôtes et en établissant des zones de réplication de l'ADN viral. Cependant, bien que les mycobactériophages codent également pour une protéine similaire à Lsr2, celle-ci ne semble pas jouer de rôle dans ce processus (Dulberger *et al.*, 2023).

La distribution pan-génomique de Lsr2 le long du chromosome des mycobactéries tend à confirmer son rôle en tant que facteur de transcription à effet pléiotropique. La technique de ChIP-seq a permis de montrer que Lsr2 se lie à 21% des gènes de *M. tuberculosis* (Gordon *et al.*, 2010) et à 13% des gènes de *M. smegmatis* (Kołodziej, Łebkowski, *et al.*, 2021). Chez l'agent tuberculeux, Lsr2 présente un enrichissement significatif sur environ 840 gènes. Ces gènes comprennent ceux codant les systèmes de sécrétion de type VII de la famille ESX, ceux impliqués dans la synthèse des lipides de la paroi cellulaire, ceux codant les protéines des familles PE/PPE, ainsi que plusieurs facteurs de transcription (Gordon *et al.*, 2010). Le mécanisme de répression de Lsr2 chez les mycobactéries est encore loin d'être complètement élucidé. Cependant, étant donné que le rôle dans la transcription de son orthologue H-NS a été plus largement étudié, ce dernier peut donc servir de modèle pour comprendre le mécanisme d'action de Lsr2 (Kotlajich *et al.*, 2015). Comme nous l'avons précédemment abordé (**Chapitre 4, partie 2.3, Figure 21**), le mécanisme de répression d'H-NS est étroitement lié à ses modes de liaison à l'ADN : rigidification et pontage, en plus de sa fixation sur les régions promotrices de ces gènes cibles (Chen *et al.*, 2008) (Kotlajich *et al.*, 2015) (Dame, Rashid and Grainger, 2020). Les similitudes très importantes entre les modes de liaison de H-NS et Lsr2 suggèrent fortement que les mécanismes de régulation exercés par ces deux protéines soient aussi analogues. De prochains résultats viendront certainement éclaircir cette hypothèse.

4. Modifications post-traductionnelles et interactions avec d'autres NAPs

Une seule étude a signalé une modification post-traductionnelle de Lsr2 chez *M. tuberculosis*, à savoir la phosphorylation de la thréonine 112 du domaine C-terminal par la protéine kinase B (Alqaseer *et al.*, 2019). La délétion du gène codant la protéine kinase B réduit significativement la phosphorylation de Lsr2 (Turapov *et al.*, 2018) et l'absence de phosphorylation entraîne une augmentation de la liaison de Lsr2 à l'ADN, conduisant à une perturbation de l'expression de nombreux gènes dont les produits participent à la croissance bactérienne, ainsi que des gènes impliqués dans l'adaptation de la bactérie à des conditions environnementales changeantes et défavorables.

L'interaction directe de la protéine Lsr2 avec d'autres NAPs ainsi que les effets de ces interactions sur sa liaison à l'ADN et sur la régulation de l'expression des gènes ont été principalement étudiés dans le cas de la protéine HU chez *M. tuberculosis* (Datta *et al.*, 2019). HU, grâce à son domaine C-terminal, interagit avec le domaine N-terminal de Lsr2 pour former des complexes nucléoprotéiques denses, observés lors d'expériences d'AFM.

Le travail de synthèse des données bibliographiques disponibles à propos de Lsr2 présenté ici a servi de base pour la rédaction d'une revue dans le journal Médecine/Sciences sous le titre : **Lsr2: Protéine Associée au Nucléotide (NAP) et facteur transcriptionnel chez les mycobactéries, acceptée** (Gerges, Herrmann et Crémazy).

Lsr2 : Protéine Associée au Nucléoïde (NAP) et facteur transcriptionnel chez les mycobactéries

Elias Gerges¹, Jean-Louis Herrmann^{1,2}, Frédéric Crémazy^{1*}

¹ UMR 1173, université Paris-Saclay, UVSQ, Inserm, Infection et inflammation, Montigny-Le-Bretonneux, France.

² APHP, GHU Paris-Saclay, Hôpital Raymond Poincaré, Service de microbiologie, Garches, France.

[*frederic.cremazy@uvsq.fr](mailto:frederic.cremazy@uvsq.fr)

Résumé

Lsr2, une petite protéine conservée chez les actinobactéries, joue un rôle crucial dans la virulence et l'adaptation des mycobactéries aux conditions environnementales. Membre de la superfamille des protéines associées au nucléoïde (NAP), Lsr2 influence l'organisation de l'ADN en facilitant la formation de boucle chromosomique *in vitro*, ce qui suggère qu'il pourrait être un acteur majeur du repliement tridimensionnel du génome. Lsr2 agit également comme un facteur de transcription, régulant l'expression de nombreux gènes responsables de la coordination d'une multitude de processus cellulaires et moléculaires essentiels chez les actinobactéries. Tout comme la protéine H-NS, son orthologue chez les entérobactéries, son rôle de répresseur transcriptionnel repose probablement sur son oligomérisation conduisant à la rigidification de l'ADN et, dans certaines situations, sur le pontage de fragments génomiques distants. Ces mécanismes pourraient perturber le recrutement de l'ARN polymérase sur les promoteurs ainsi que l'élongation des transcrits.

Lsr2 : une protéine conservée chez les mycobactéries et les actinomycètes

Lsr2 (*leprosy serum reactive clone 2*) est une petite protéine de 12 à 15 kDa, identifiée pour la première fois en 1991 chez *Mycobacterium leprae* [1, 2]. Au cours des trois dernières décennies, cette protéine a été caractérisée chez de très nombreuses autres actinobactéries, y compris les mycobactéries [3–5], les streptomycètes [6], les corynébactéries [7], ainsi que les actinobactériophages [8]. Une étude récente a ainsi révélé que, parmi les 2 951 génomes complets d'actinobactériophages analysés, la protéine Lsr2 était présente dans plus de 10 % de ces génomes, ce qui suggère l'implication de phages dans l'acquisition du gène *lsr2* par leur espèce hôte bactérienne [9]. Le séquençage des génomes des mycobactéries a révélé que Lsr2 est une protéine hautement conservée, avec une identité de séquences d'acides aminés de plus de 85 %, suggérant une conservation importante de sa fonction à travers ce genre [4]. Contrairement aux mycobactéries qui ne possèdent qu'un gène, le génome des streptomycètes codent deux paralogues de *lsr2* [6].

Lsr2 : un acteur majeur de la virulence des mycobactéries

Jouant un rôle crucial dans la virulence (**Figure 1**), Lsr2 a été identifiée comme un antigène immunodominant chez *M. leprae* [1]. Plusieurs études ont en effet mis en évidence une réponse lymphocytaire T dirigée contre cette protéine, caractérisée par une lymphoprolifération en réponse à de nombreux peptides de Lsr2 chez les patients souffrant de lèpre, ainsi que par la présence d'anticorps spécifiques ciblant ces peptides [1, 10, 11]. Parallèlement, une forte induction et sécrétion de l'IFN- γ (interféron- γ) par les lymphocytes T CD3⁺ CD4⁺ a été observée dans des cultures de cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC) isolées de patients atteints de lèpre lépromateuse et stimulées par différents peptides de Lsr2 [11].

Lsr2 joue un rôle majeur dans la morphologie et la composition de la membrane des mycobactéries. L'absence de *lsr2* chez *M. smegmatis* altère fortement la morphologie et la taille des colonies en milieux solides. Elle inhibe également la formation de biofilms, altère la biosynthèse de certains acides mycoliques, tels que les mycolyl-diacylglycérols qui forment la membrane mycobactérienne, et confère à la bactérie un phénotype hypermotile [12, 13]. Ces observations peuvent probablement être attribuées à un effet indirect de Lsr2, qui semble jouer un rôle dans la régulation de certaines enzymes liées au métabolisme des lipides de la paroi cellulaire [4]. Plusieurs études ont aussi révélé le rôle de Lsr2 dans la régulation des gènes

msc230255

responsables de la synthèse et du transport des glycopeptidolipides (GPL), des lipides pariétaux complexes principalement retrouvés chez les mycobactéries non tuberculeuses (MNT). Ces composés lipidiques, en quantité importante chez les MNT, jouent un rôle majeur dans la structuration de leur paroi. La présence ou l'absence de GPL, qui conditionne respectivement l'existence de formes lisses ou rugueuses, affecte la motilité, la capacité de formation de biofilm, ainsi que la virulence des bactéries [14]. La délétion de *lsr2* conduit à une augmentation de la production des GPL chez *M. smegmatis* [15].

Le rôle de Lsr2 dans la progression et la chronicité de l'infection a été démontré dans un modèle murin de tuberculose. Une absence de symptômes de la maladie et de lésions inflammatoires a été constatée dans le tissu pulmonaire de souris infectées par une souche dans laquelle Lsr2 avait été tronqué de son domaine C-terminal, même après quatre semaines après l'infection [16]. Chez *M. abscessus*, un agent infectieux émergent dans la mucoviscidose, nous avons précédemment montré que l'expression accrue de *lsr2* dans le morphotype rugueux, joue un rôle significatif dans sa virulence. Lsr2 joue un rôle physiologique important, tant dans les morphotypes lisses que rugueux de *M. abscessus*, et influence aussi la croissance intracellulaire au sein des macrophages et des amibes. Lsr2 contribue également à la virulence dans le modèle du poisson-zèbre et joue un rôle significatif dans la persistance de la bactérie dans les poumons de souris infectées [5]. Chez *M. abscessus* et chez *M. tuberculosis*, Lsr2 occupe un rôle crucial dans la défense des bactéries contre les espèces réactives de l'oxygène (ERO), qui font partie des molécules anti-mycobactériennes les plus puissantes produites par l'hôte lors de l'infection intracellulaire des macrophages [5,16].

L'absence de viabilité *in vitro* des mutants de *M. tuberculosis* délétés de *lsr2* a permis de montrer le caractère essentiel du gène *lsr2* chez cette bactérie [17,18]. Comparativement, chez *M. smegmatis* [12] et *M. abscessus* [5], les souches dans lesquelles *lsr2* est absent restent viables en culture planctonique¹. Un aspect tout aussi significatif du rôle de Lsr2 dans le contrôle du cycle cellulaire a également été rapporté [13] : pendant la phase de réplication de l'ADN, Lsr2 est localisée à proximité des réplisomes, suggérant son implication dans le bon déroulement de ce processus. Par la suite, Lsr2 migre vers les pôles cellulaires opposés de manière coordonnée avec les ségrosomes, démontrant un lien entre Lsr2 et le processus de ségrégation des chromosomes. L'absence de *lsr2* a un impact à la fois le temps de réplication et la dynamique du réplisome.

¹ Bactéries sous forme individualisée, en colonie.

msc230255

L'expression de *lsr2* connaît une augmentation significative en réponse à divers types de stress, favorisant ainsi l'adaptation aux changements environnementaux, tels que la limitation des nutriments, les changements de température, ainsi que l'augmentation du fer et l'hypoxie [16, 19–22].

L'une des propriétés les plus intéressantes de Lsr2 est sa capacité à moduler la résistance aux antibiotiques [18]. Chez *M. smegmatis*, l'absence de *lsr2* induit une sensibilité accrue à l'acide nalidixique et à la rifampicine, ainsi qu'une perméabilité augmentée de la vancomycine à travers la paroi bactérienne [22]. Récemment, notre équipe a observé une sensibilité plus marquée à l'amikacine liposomale et à la clarithromycine chez les souches de *M. abscessus* mutantes pour *lsr2* lors d'infections de macrophages suivies de traitements à base de ces deux antibiotiques.

Finalement, outre l'implication de Lsr2 démontrée dans l'infection des cellules hôtes eucaryotes, Dulberger *et al.* [23] ont récemment mis en évidence le rôle de Lsr2 dans l'interaction entre mycobactéries et mycobactériophages. Cette étude a en effet révélé que Lsr2 joue un rôle crucial dans l'infection virale, en régulant la réplication des mycobactériophages dans les bactéries hôtes et en établissant des zones de réplication de l'ADN viral. Cependant, bien que les mycobactériophages codent une protéine similaire à Lsr2, celle-ci ne semble pas jouer de rôle dans ce processus.

Lsr2 : un facteur de transcription pléiotropique et un organisateur chromosomique

Lsr2 est classée dans la superfamille des protéines associées au nucléoïde (NAP) [24]. Les NAP jouent un rôle essentiel dans la structure et la compaction des chromosomes, mais aussi dans la régulation génique au sein des cellules bactériennes [25, 26]. Parmi les protéines de cette superfamille, on peut citer H-NS (*heat-stable nucleoid-structuring protein*), Fis (*factor for inversion stimulation*), IHF (*integration host factor*), HU (*heat unstable protein*) et Dps (*DNA-binding protein from starved cells*) [27].

De nombreuses études ont mis en évidence le rôle des NAP dans la capacité de la bactérie à s'adapter à des conditions défavorables, en particulier en réponse au stress qu'elle rencontre lors de l'infection de son hôte. Ces protéines seraient ainsi responsables de l'induction de changements topologiques de l'ADN afin de moduler le degré de condensation du chromosome ou de modifier le profil de transcription global de la bactérie [28, 29] (**Tableau I**).

msc230255

Lsr2 est composée de 110 à 120 acides aminés. Elle est riche en arginine, ce qui en fait une protéine hautement basique (pI : 10,69)². Elle est principalement présente dans le cytosol des cellules mycobactériennes sous forme de dimères [4, 30–32]. Lsr2 se structure en deux domaines fonctionnels distincts, séparés par une région flexible : un domaine C-terminal, responsable de sa liaison à l'ADN, et un domaine N-terminal composé de deux sites de dimérisation qui lui permettent de s'oligomériser [31, 33]. Lsr2 est l'orthologue fonctionnel de la protéine H-NS, certainement une des NAP les plus étudiées que l'on retrouve exclusivement chez les entérobactéries [34, 35] (**Figure 2**). Des expériences de complémentation génétique ont montré que l'expression de *lsr2* est capable de restaurer le phénotype lié à la mutation de *hns* chez *E. coli*. De même, chez les mutants de *M. smegmatis* dépourvus de *lsr2*, la complémentation de *lsr2* par *hns* permet de rétablir la morphologie rugueuse des colonies altérée suite à la délétion du gène [35]. Bien que leurs séquences diffèrent fortement, ces protéines partagent d'importantes similitudes en ce qui concerne leur liaison à l'ADN, à la fois sur le plan structural et fonctionnel. Lsr2 et H-NS lient toutes deux préférentiellement les séquences riches en adénine et thymine (AT). Cette caractéristique suggère un rôle de ces protéines comme répresseurs xénogéniques de régions acquises par transfert horizontal, très souvent riches en AT [6, 7, 36, 37]. L'analyse structurale de Lsr2 a révélé une affinité plus marquée pour le sillon mineur de l'ADN³, impliquant un motif RGR (arginine-glycine-arginine) présent dans son domaine de liaison à l'ADN [37,38]. Une fois liée à l'ADN, Lsr2 peut recruter de nouveaux dimères *via* son domaine N-terminal, conduisant à la formation de filaments nucléoprotéiques rigides grâce à un mécanisme d'oligomérisation (**Figure 3**). L'oligomérisation de Lsr2 a été démontrée à la fois *in vitro*, par des expériences de retard sur gel (*electrophoretic mobility shift assay*) [33], et *in vivo* par des expériences de ChIP-seq (*chromatin immunoprecipitation with sequencing*), réalisées chez *M. tuberculosis* [24] et, plus récemment, chez *M. abscessus* (résultats personnels). Si les conditions environnantes sont favorables, deux filaments nucléoprotéiques peuvent interagir ensemble et former un pont. Ce mécanisme de pontage peut non seulement connecter des fragments d'ADN proches, mais il pourrait également établir des connexions entre des régions plus distantes dans le chromosome et contribuerait ainsi au repliement tridimensionnel du génome, notamment en facilitant la formation de boucles chromosomiques [37]. L'utilisation de

² Le pI d'une protéine est le pH pour lequel les charges positives compensent les charges négatives.

³ La torsion de la double hélice d'ADN et la géométrie des bases créent un écart plus large (appelé sillon majeur) et un plus étroit (appelé sillon mineur) sur toute la longueur de la molécule.

la technique de microscopie à force atomique (AFM) a permis à Chen *et al.* de visualiser directement la formation de boucles résultant de l'interaction entre complexes Lsr2-ADN, tant à partir de matrices linéaires que de matrices circulaires [33]. Cependant l'existence de boucles dépendantes de Lsr2 dans le chromosome bactérien *in vivo* reste encore à démontrer.

En plus de leur rôle dans la conformation des chromosomes, les NAP sont également des facteurs de transcription intervenant dans la régulation des gènes impliqués dans divers processus cellulaires et moléculaires majeurs chez les bactéries [39, 40]. Lsr2 combine ces deux propriétés : celle d'une protéine associée au nucléoïde qui participe à l'organisation topologique du chromosome bactérien [41], et celle d'un régulateur pléiotrope agissant principalement comme un répresseur de la transcription [16]. Chez *M. tuberculosis*, Lsr2 module l'expression des protéines antigéniques et influence leurs interactions avec l'hôte, lui conférant ainsi un rôle dans la coordination des phases précoces d'infection latente et persistante [16]. Par ailleurs, Lsr2 joue un rôle crucial dans la modulation de l'expression d'une multitude de gènes liés à l'adaptation aux fluctuations des niveaux d'oxygène en se liant directement sur leur promoteur [22]. Récemment, nous avons montré, par une étude transcriptomique, le rôle régulateur de Lsr2 chez les deux morphotypes de *M. abscessus*, influençant la virulence, l'immunogénicité, le métabolisme énergétique et la résistance aux antibiotiques. Il a également été observé que la surexpression de Lsr2 chez *M. tuberculosis* entraîne une répression très significative des gènes de virulence et induit des effets néfastes sur la capacité de la bactérie à déclencher une infection ou une maladie [42]. Ce rôle régulateur est également observé chez les streptomyces, tels que *Streptomyces venezuelae*, une bactérie reconnue pour sa production d'antibiotiques et d'autres composés bioactifs [6].

La distribution pangénomique de Lsr2 sur le chromosome des mycobactéries tend à confirmer son rôle en tant que facteur de transcription à effet pléiotropique. La technique de ChIP-seq a permis de montrer que Lsr2 se lie à 21% des gènes de *M. tuberculosis* et à 13% des gènes de *M. smegmatis* [22, 24]. Chez *M. tuberculosis*, un enrichissement significatif de Lsr2 est observé pour environ 840 gènes. Ces gènes comprennent ceux codant les systèmes de sécrétion de type VII de la famille ESX (*early antigenic secretion system*), ceux impliqués dans la synthèse des lipides de la paroi cellulaire, ceux codant les protéines des familles PE/PPE⁴, ainsi que plusieurs facteurs de transcription [24]. Chez *M. abscessus*, Lsr2 se lie au niveau de la région promotrice

⁴ Protéines dont la portion N-terminale contient les motifs Pro-Glu (Proline-Glutamine, PE) ou Pro-Pro-Glu (PPE).

msc230255

du locus *GPL*, le locus rassemblant les gènes responsables de la synthèse et le transport des glycopeptidolipides [5].

Le mécanisme de répression de *Lsr2* chez les mycobactéries est encore loin d'être complètement élucidé. En revanche, le rôle de son orthologue H-NS dans la transcription a été plus largement étudié, il peut donc être utilisé comme de modèle pour comprendre le mécanisme d'action de *Lsr2* (**Figure 3**) [43].

Ce mécanisme repose sur la capacité d'oligomérisation de H-NS, en plus de sa fixation sur les régions promotrices de ces gènes cibles [26, 38]. H-NS exerce sa répression transcriptionnelle de diverses manières, étroitement liées à ses modes de liaison à l'ADN : rigidification et pontage. Son principal mode de répression intervient en agissant principalement au moment de l'initiation de la transcription, les promoteurs liés par H-NS étant alors généralement rendus silencieux. Les oligomères présents sur ces séquences pourraient ainsi, soit perturber la fixation de l'ARN polymérase, soit, au contraire, la piéger, et ainsi inhiber l'initiation de la transcription. La présence d'oligomères de H-NS couvrant un nombre important des séquences codant ses gènes cibles pourrait perturber l'élongation des transcrits *in vitro* en réduisant la processivité ainsi qu'en augmentant les pauses de l'ARN polymérase. Il a été proposé que l'activité de pontage observée *in vitro* pour H-NS pourrait fortement renforcer ce mécanisme, suggérant que le mouvement de l'ARN polymérase lors de l'élongation des transcrits suffirait à déplacer les dimères d'H-NS et ainsi désorganiser les oligomères qui pourraient cependant se reformer après son passage [43–45]. Ces oligomères empêcheraient en revanche la fixation de l'ARN polymérase sur des promoteurs cryptiques responsables de la production de transcrits parasites qui auraient un impact sur la croissance de la bactérie [46] (**Figure 3**). La liaison d'H-NS sous forme d'oligomères peut être aussi concerner les sites de terminaison de la transcription dépendante de Rho. Les interactions génétiques entre H-NS et Rho supposent que H-NS assisterait Rho dans la terminaison de la transcription [43, 47]. Les similitudes très importantes entre les modes de liaison de H-NS et de *Lsr2* suggèrent fortement que les mécanismes de régulation exercés par ces deux protéines seraient analogues. De prochains résultats viendront certainement éclaircir cette hypothèse.

Modifications post-traductionnelles de Lsr2 et interactions avec d'autres NAP

Une seule étude a signalé une modification post-traductionnelle de Lsr2 chez *M. tuberculosis* : la phosphorylation de la thréonine 112 de son domaine C-terminal par la protéine kinase B [48]. La délétion du gène codant la protéine kinase B réduit significativement la phosphorylation de Lsr2 [49] et l'absence de phosphorylation entraîne une augmentation de la liaison de Lsr2 à l'ADN, conduisant à une perturbation de l'expression de nombreux gènes dont les produits participent à la croissance bactérienne, ainsi que des gènes impliqués dans l'adaptation de la bactérie à des conditions environnementales changeantes et défavorables.

L'interaction directe de la protéine Lsr2 avec d'autres NAP ainsi que les effets de ces interactions sur sa liaison à l'ADN et sur la régulation de l'expression des gènes ont été principalement étudiés dans le cas de la protéine HU chez *M. tuberculosis* [50]. HU, grâce à son domaine C-terminal, interagit avec le domaine N-terminal de Lsr2 pour former des complexes nucléoprotéiques denses, observés lors d'expériences d'AFM.

Conclusion et perspectives

Lsr2 joue un rôle central dans la régulation de l'expression des gènes impliqués dans plusieurs processus cellulaires clés chez les mycobactéries, notamment la virulence, la réponse au stress, le métabolisme, la composition lipidique des membranes cellulaires et la résistance aux antibiotiques. En plus de son rôle de régulateur, la contribution possible de Lsr2 à la maintenance et à l'organisation hiérarchique des chromosomes en fait une cible prometteuse pour le développement de nouveaux agents antimicrobiens. À ce jour, seul le zafirlukast semble cibler directement Lsr2 [51]. Cette molécule thérapeutique, utilisée comme traitement prophylactique de l'asthme, perturbe l'interaction de Lsr2 avec l'ADN, ce qui impacte à la fois la transcription génique et la croissance de *M. tuberculosis*. Toutefois, d'autres études *in vitro* et *in vivo* seront nécessaires pour évaluer l'effet de ce médicament sur la protéine Lsr2 chez d'autres espèces de mycobactéries ainsi que pour révéler son potentiel thérapeutique dans la lutte contre les infections bactériennes. Des recherches supplémentaires visant à élucider le mécanisme par lequel Lsr2 agit en tant que répresseur transcriptionnel et à approfondir notre compréhension de ses interactions avec d'autres protéines régulatrices seront essentielles pour obtenir une vision complète de son impact sur la régulation génique chez les mycobactéries.

msc230255

Summary

Lsr2 : a Nucleoid Associated Protein (NAP) and a transcription factor in mycobacteria

Lsr2, a small protein mainly found in actinobacteria, plays a crucial role in the virulence and adaptation of mycobacteria to environmental conditions. As a member of the nucleoid-associated protein (NAPs) superfamily, Lsr2 influences DNA organization by facilitating the formation of chromosomal loops *in vitro* and, therefore, may be a major player in the three-dimensional folding of the genome. Additionally, Lsr2 also acts as a transcription factor, regulating the expression of numerous genes responsible for coordinating a myriad of cellular and molecular processes essential for the actinobacteria. Similar to the H-NS protein, its ortholog in enterobacteria, its role in transcriptional repression likely relies on oligomerization, rigidifying and bridging of DNA, thereby disrupting RNA polymerase recruitment as well as the elongation of RNA transcripts.

Remerciements

Elias Gerges est bénéficiaire d'une bourse de thèse de Vaincre la Mucoviscidose et de l'Association Grégory Lemarchal (RF20200502727/2/1/53).

Liens d'intérêt

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

Références

1. Laal S, Sharma YD, Prasad HK, *et al.* Recombinant fusion protein identified by lepromatous sera mimics native *Mycobacterium leprae* in T-cell responses across the leprosy spectrum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991 ; 88 : 1054-8.
2. Sela S, Thole JE, Ottenhoff TH, *et al.* Identification of *Mycobacterium leprae* antigens from a cosmid library: characterization of a 15-kilodalton antigen that is recognized by both the humoral and cellular immune systems in leprosy patients. *Infect Immun* 1991 ; 59 : 4117-24.
3. Oftung F, Mustafa AS, Wiker HG. Extensive sequence homology between the *Mycobacterium leprae* LSR (12 kDa) antigen and its *Mycobacterium tuberculosis* counterpart. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2000 ; 27 : 87-9.
4. Chen JM, German GJ, Alexander DC, *et al.* Roles of Lsr2 in colony morphology and biofilm formation of *Mycobacterium smegmatis*. *J Bacteriol* 2006 ; 188 : 633-41.
5. Le Moigne V, Bernut A, Cortès M, *et al.* Lsr2 Is an Important Determinant of Intracellular Growth and Virulence in *Mycobacterium abscessus*. *Front Microbiol* 2019 ; 10 : 905.
6. Gehrke EJ, Zhang X, Pimentel-Elardo SM, *et al.* Silencing cryptic specialized metabolism in *Streptomyces* by the nucleoid-associated protein Lsr2. *Elife* 2019 ; 8 : e47691.
7. Wiechert J, Filipchuk A, Hünnefeld M, *et al.* Deciphering the Rules Underlying Xenogeneic Silencing and Counter-Silencing of Lsr2-like Proteins Using CgpS of *Corynebacterium glutamicum* as a Model. *mBio* 2020 ; 11 : e02273-19.
8. Pfeifer E, Hünnefeld M, Popa O, *et al.* Impact of Xenogeneic Silencing on Phage-Host Interactions. *J Mol Biol* 2019 ; 431 : 4670-83.
9. Sharma V, Hardy A, Luthe T, *et al.* Phylogenetic Distribution of WhiB- and Lsr2-Type Regulators in Actinobacteriophage Genomes. *Microbiol Spectr* 2021 ; 9 : e0072721.
10. Singh S, Jenner PJ, Narayan NP, *et al.* Critical residues of the *Mycobacterium leprae* LSR recombinant protein discriminate clinical activity in erythema nodosum leprosum reactions. *Infect Immun* 1994 ; 62 : 5702-5.
11. Saini C, Prasad HK, Rani R, *et al.* Lsr2 of *Mycobacterium leprae* and its synthetic peptides elicit restitution of T cell responses in erythema nodosum leprosum and reversal reactions in patients with lepromatous leprosy. *Clin Vaccine Immunol* 2013 ; 20 : 673-82.
12. Arora K, Whiteford DC, Lau-Bonilla D, *et al.* Inactivation of *lsr2* results in a hypermotile phenotype in *Mycobacterium smegmatis*. *J Bacteriol* 2008 ; 190 : 4291-300.
13. Kołodziej M, Trojanowski D, Bury K, *et al.* Lsr2, a nucleoid-associated protein influencing mycobacterial cell cycle. *Sci Rep* 2021 ; 11 : 2910.
14. Gutiérrez AV, Viljoen A, Ghigo E, *et al.* Glycopeptidolipids, a Double-Edged Sword of the *Mycobacterium abscessus* Complex. *Front Microbiol* 2018 ; 9 : 1145.
15. Kocíncová D, Singh AK, Beretti J-L, *et al.* Spontaneous transposition of IS1096 or ISMsm3 leads to glycopeptidolipid overproduction and affects surface properties in *Mycobacterium smegmatis*. *Tuberculosis (Edinb)* 2008 ; 88 : 390-8.

16. Bartek IL, Woolhiser LK, Baughn AD, *et al.* Mycobacterium tuberculosis Lsr2 is a global transcriptional regulator required for adaptation to changing oxygen levels and virulence. *mBio* 2014 ; 5 : e01106-01114.
17. Sassetti CM, Boyd DH, Rubin EJ. Genes required for mycobacterial growth defined by high density mutagenesis. *Mol Microbiol* 2003 ; 48 : 77-84.
18. Colangeli R, Helb D, Vilchèze C, *et al.* Transcriptional regulation of multi-drug tolerance and antibiotic-induced responses by the histone-like protein Lsr2 in *M. tuberculosis*. *PLoS Pathog* 2007 ; 3 : e87.
19. Wong DK, Lee BY, Horwitz MA, *et al.* Identification of fur, aconitase, and other proteins expressed by Mycobacterium tuberculosis under conditions of low and high concentrations of iron by combined two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Infect Immun* 1999 ; 67 : 327-36.
20. Betts JC, Lukey PT, Robb LC, *et al.* Evaluation of a nutrient starvation model of Mycobacterium tuberculosis persistence by gene and protein expression profiling. *Mol Microbiol* 2002 ; 43 : 717-31.
21. Stewart GR, Wernisch L, Stabler R, *et al.* Dissection of the heat-shock response in Mycobacterium tuberculosis using mutants and microarrays. *Microbiology (Reading)* 2002 ; 148 : 3129-38.
22. Kołodziej M, Łebkowski T, Płociński P, *et al.* Lsr2 and Its Novel Parologue Mediate the Adjustment of Mycobacterium smegmatis to Unfavorable Environmental Conditions. *mSphere* 2021 ; 6 : e00290-21.
23. Dulberger CL, Guerrero-Bustamante CA, Owen SV, *et al.* Mycobacterial nucleoid-associated protein Lsr2 is required for productive mycobacteriophage infection. *Nat Microbiol* 2023 ; 8 : 695-710.
24. Gordon BRG, Li Y, Wang L, *et al.* Lsr2 is a nucleoid-associated protein that targets AT-rich sequences and virulence genes in Mycobacterium tuberculosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010 ; 107 : 5154-9.
25. Dame RT. The role of nucleoid-associated proteins in the organization and compaction of bacterial chromatin. *Mol Microbiol* 2005 ; 56 : 858-70.
26. Dame RT, Rashid F-ZM, Grainger DC. Chromosome organization in bacteria: mechanistic insights into genome structure and function. *Nat Rev Genet* 2020 ; 21 : 227-42.
27. Dillon SC, Dorman CJ. Bacterial nucleoid-associated proteins, nucleoid structure and gene expression. *Nat Rev Microbiol* 2010 ; 8 : 185-95.
28. Hołówka J, Zakrzewska-Czerwińska J. Nucleoid Associated Proteins: The Small Organizers That Help to Cope With Stress. *Front Microbiol* 2020 ; 11 : 590.
29. Rajapaksha N, Soldano A, Yao H, *et al.* Pseudomonas aeruginosa Dps (PA0962) Functions in H₂O₂ Mediated Oxidative Stress Defense and Exhibits In Vitro DNA Cleaving Activity. *Int J Mol Sci* 2023 ; 24 : 4669.

30. Marques MAM, Espinosa BJ, Xavier da Silveira EK, *et al.* Continued proteomic analysis of *Mycobacterium leprae* subcellular fractions. *Proteomics* 2004 ; 4 : 2942-53.
31. Summers EL, Meindl K, Usón I, *et al.* The structure of the oligomerization domain of Lsr2 from *Mycobacterium tuberculosis* reveals a mechanism for chromosome organization and protection. *PLoS One* 2012 ; 7 : e38542.
32. Qu Y, Lim CJ, Whang YR, *et al.* Mechanism of DNA organization by *Mycobacterium tuberculosis* protein Lsr2. *Nucleic Acids Res* 2013 ; 41 : 5263-72.
33. Chen JM, Ren H, Shaw JE, *et al.* Lsr2 of *Mycobacterium tuberculosis* is a DNA-bridging protein. *Nucleic Acids Res* 2008 ; 36 : 2123-35.
34. Dorman CJ. H-NS: a universal regulator for a dynamic genome. *Nat Rev Microbiol* 2004 ; 2 : 391-400.
35. Gordon BRG, Imperial R, Wang L, *et al.* Lsr2 of *Mycobacterium* represents a novel class of H-NS-like proteins. *J Bacteriol* 2008 ; 190 : 7052-9.
36. Navarre WW, McClelland M, Libby SJ, *et al.* Silencing of xenogeneic DNA by H-NS-facilitation of lateral gene transfer in bacteria by a defense system that recognizes foreign DNA. *Genes Dev* 2007 ; 21 : 1456-71.
37. Gordon BRG, Li Y, Cote A, *et al.* Structural basis for recognition of AT-rich DNA by unrelated xenogeneic silencing proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011 ; 108 : 10690-5.
38. Qin L, Erkelens AM, Ben Bdira F, *et al.* The architects of bacterial DNA bridges: a structurally and functionally conserved family of proteins. *Open Biol* 2019 ; 9 : 190223.
39. Dorman CJ. Function of nucleoid-associated proteins in chromosome structuring and transcriptional regulation. *J Mol Microbiol Biotechnol* 2014 ; 24 : 316-31.
40. Amemiya HM, Schroeder J, Freddolino PL. Nucleoid-associated proteins shape chromatin structure and transcriptional regulation across the bacterial kingdom. *Transcription* 2021 ; 12 : 182-218.
41. Kriel NL, Gallant J, Wyk N van, *et al.* Mycobacterial nucleoid associated proteins: An added dimension in gene regulation. *Tuberculosis (Edinb)* 2018 ; 108 : 169-77.
42. Liu J, Gordon BRG. Targeting the global regulator Lsr2 as a novel approach for anti-tuberculosis drug development. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2012 ; 10 : 1049-53.
43. Kotlajich MV, Hron DR, Boudreau BA, *et al.* Bridged filaments of histone-like nucleoid structuring protein pause RNA polymerase and aid termination in bacteria. *Elife* 2015 ; 4 : e04970.
44. Boudreau BA, Hron DR, Qin L, *et al.* StpA and Hha stimulate pausing by RNA polymerase by promoting DNA-DNA bridging of H-NS filaments. *Nucleic Acids Res* 2018 ; 46 : 5525-46.
45. Wade JT, Grainger DC. Waking the neighbours: disruption of H-NS repression by overlapping transcription. *Mol Microbiol* 2018 ; 108 : 221-5.

46. Singh SS, Singh N, Bonocora RP, *et al.* Widespread suppression of intragenic transcription initiation by H-NS. *Genes Dev* 2014 ; 28 : 214-9.
47. Peters JM, Mooney RA, Grass JA, *et al.* Rho and NusG suppress pervasive antisense transcription in Escherichia coli. *Genes Dev* 2012 ; 26 : 2621-33.
48. Alqaseer K, Turapov O, Barthe P, *et al.* Protein kinase B controls Mycobacterium tuberculosis growth via phosphorylation of the transcriptional regulator Lsr2 at threonine 112. *Mol Microbiol* 2019 ; 112 : 1847-62.
49. Turapov O, Forti F, Kadhim B, *et al.* Two Faces of CwlM, an Essential PknB Substrate, in Mycobacterium tuberculosis. *Cell Reports* 2018 ; 25 : 57.
50. Datta C, Jha RK, Ahmed W, *et al.* Physical and functional interaction between nucleoid-associated proteins HU and Lsr2 of Mycobacterium tuberculosis: altered DNA binding and gene regulation. *Mol Microbiol* 2019 ; 111 : 981-94.
51. Pinault L, Han J-S, Kang C-M, *et al.* Zafirlukast inhibits complexation of Lsr2 with DNA and growth of Mycobacterium tuberculosis. *Antimicrob Agents Chemother* 2013 ; 57 : 2134-40.
52. Ares MA, Fernández-Vázquez JL, Rosales-Reyes R, *et al.* H-NS Nucleoid Protein Controls Virulence Features of Klebsiella pneumoniae by Regulating the Expression of Type 3 Pili and the Capsule Polysaccharide. *Front Cell Infect Microbiol* 2016 ; 6 : 13.
53. Deng X, Li M, Pan X, *et al.* Fis Regulates Type III Secretion System by Influencing the Transcription of exsA in Pseudomonas aeruginosa Strain PA14. *Front Microbiol* 2017 ; 8 : 669.
54. Leite B, Werle CH, Carmo CP do, *et al.* Integration host factor is important for biofilm formation by Salmonella enterica Enteritidis. *Pathog Dis* 2017 ; 75. doi: 10.1093/femspd/ftx074.
55. Jurcisek JA, Brockman KL, Novotny LA, *et al.* Nontypeable Haemophilus influenzae releases DNA and DNABII proteins via a T4SS-like complex and ComE of the type IV pilus machinery. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2017 ; 114 : E6632-41.

Tableau

Tableau I. Les protéines associées au nucléoïde (NAP), facteurs de transcription impliqués dans la virulence des bactéries. Lsr2 (*leprosy serum reactive clone 2*), H-NS (*heat-stable nucleoid-structuring protein*), Fis (*factor for inversion stimulation*), IHF (*integration host factor*) et HU (*heat unstable protein*).

NAP	Rôle dans la virulence	Références
Lsr2	Régulation de l'expression des gènes impliqués dans la croissance intracellulaire de <i>Mycobacterium abscessus</i>	Résultats personnels
H-NS	Régulation de l'expression des pili de type 3 et du polysaccharide de la capsule chez <i>Klebsiella pneumoniae</i>	[52]
Fis	Régulation de l'expression des gènes du système de sécrétion de type III (T3SS) chez <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	[53]
IHF	Régulation de l'expression des gènes impliqués dans la biogénèse de biofilms de <i>Salmonella enterica</i>	[54]
HU	Régulation de l'expression du système de sécrétion de type IV (T4SS) chez <i>Haemophilus influenzae</i>	[55]

Légende des figures

Figure 1. Lsr2, déterminant physiologique important chez les mycobactéries. Illustration des principaux rôles décrits pour Lsr2 en tant que protéine associée au nucléoïde chez trois groupes de mycobactéries : mycobactéries pathogènes strictes (*Mycobacterium leprae* et *Mycobacterium tuberculosis*), mycobactéries opportunistes (*Mycobacterium abscessus*), et mycobactéries saprophytes (*Mycobacterium smegmatis*).

Figure 2. Modèles structuraux des homodimères de H-NS et de Lsr2. Les surfaces de potentiels électriques sont représentées sur chaque model structural de protomère à l'aide d'un gradient allant du rouge (charge négative) au bleu (charge positive). Les charges neutres sont représentées en blanc. Les « linkers », manquant dans le model de Lsr2, sont indiqués en bleu (chargés positivement). (Figure adaptée de [38]).

Figure 3 : Mécanisme de répression des NAP de type H-NS (H-NS, Lsr2) dépendant de l'oligomérisation et du pontage d'ADN. Différents mécanismes ont été proposés pour expliquer le rôle de ces protéines dans la répression de l'expression des gènes. Le premier passe par la formation d'oligomères sur le promoteur, bloquant sa liaison à l'ARN polymérase (A). Le second dépend de la formation d'oligomères sur la région codante du gène cible, pouvant soit bloquer la production d'ARN parasites en empêchant la fixation d'ARN polymérases sur le corps du gène (B), soit bloquer l'élongation des transcrits du gène cible lors de la formation de ponts entre oligomères, se traduisant par un renforcement de leur liaison à l'ADN (C).

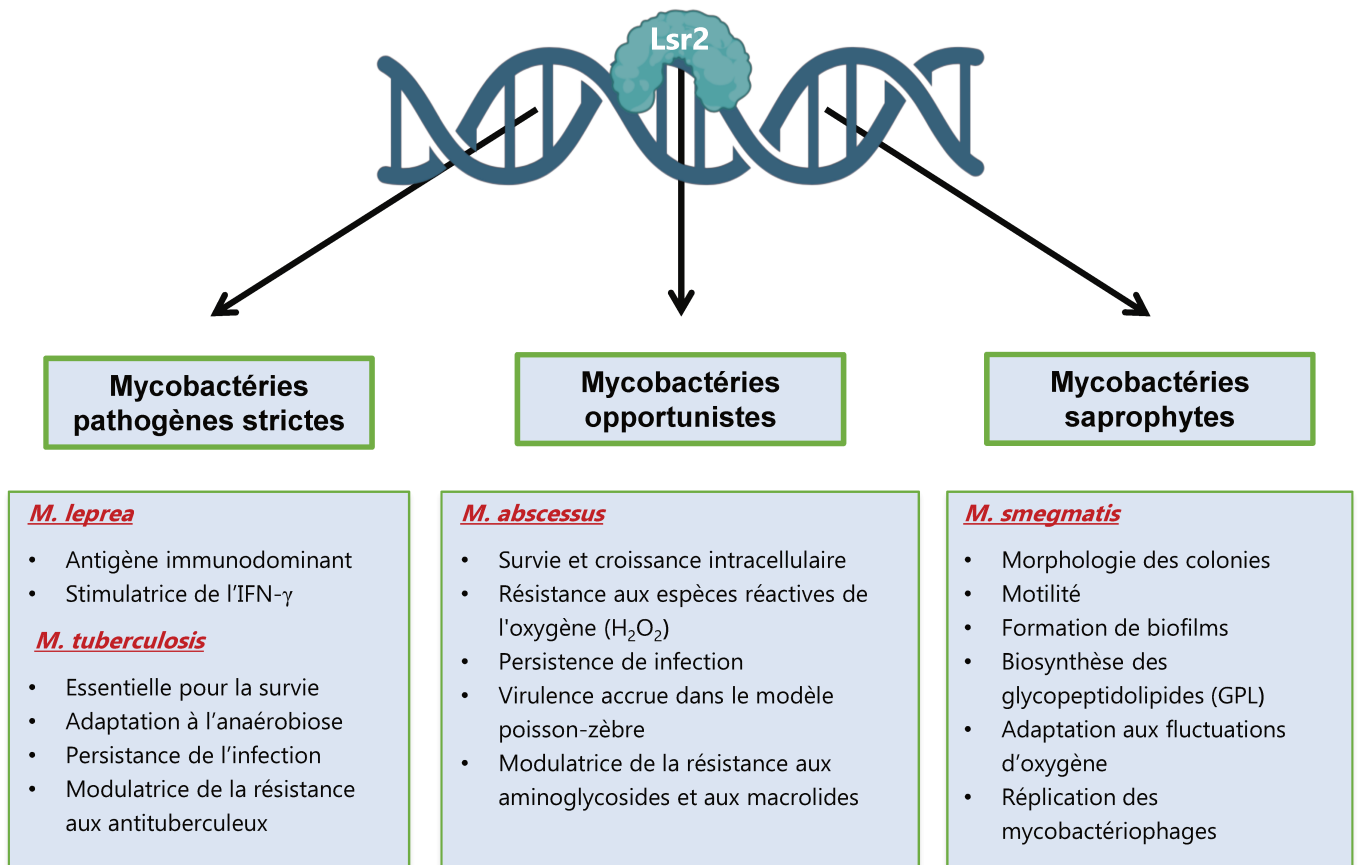
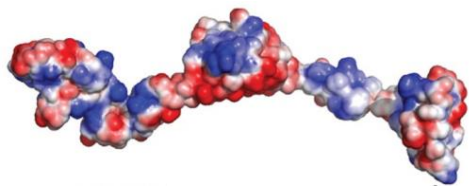
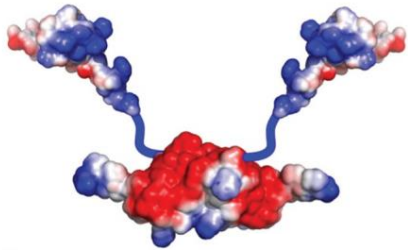


Figure 1



H-NS



Lsr2

Charge électrique



Figure 2

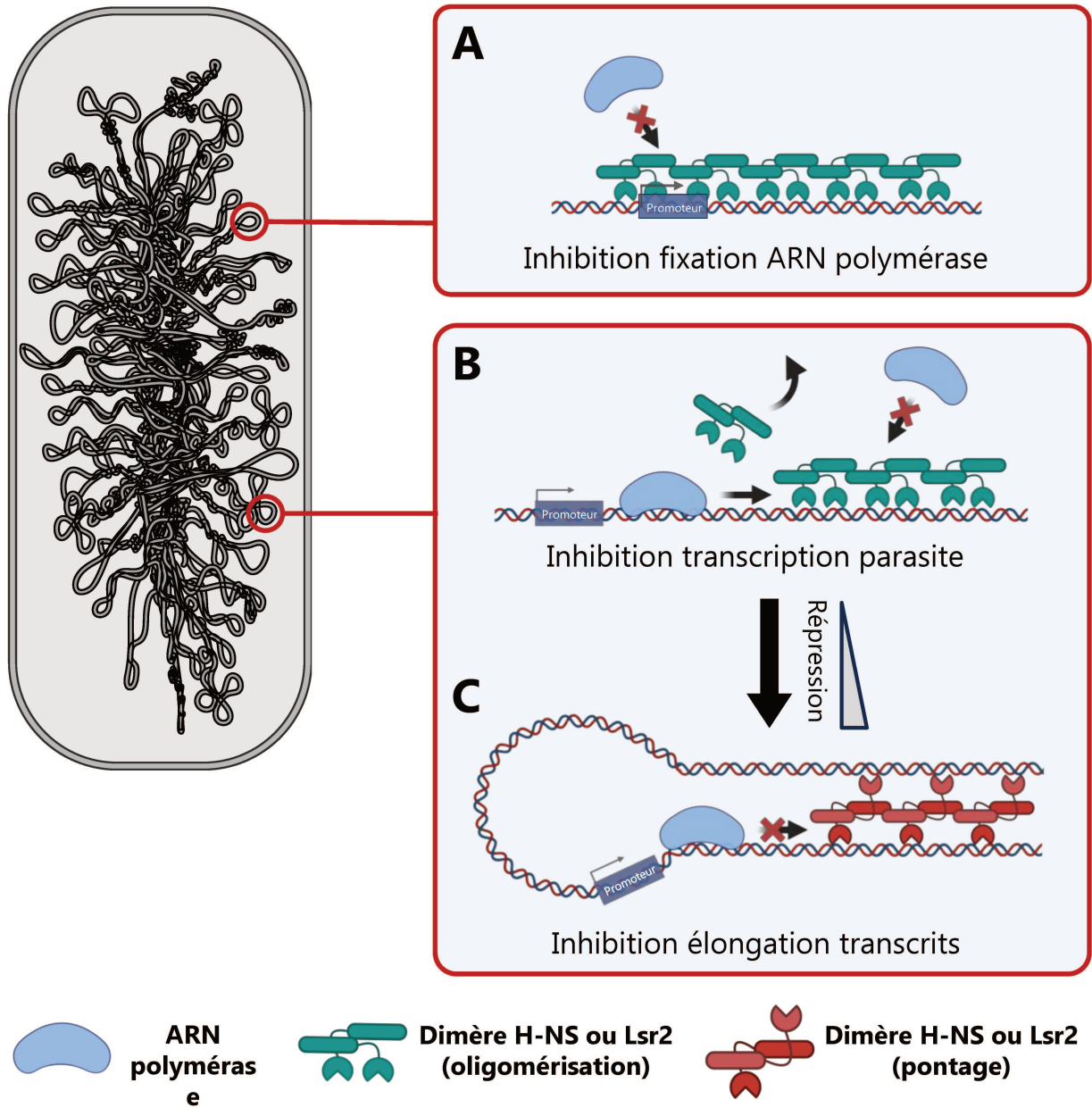


Figure 3

Objectifs

Mycobacterium abscessus est une mycobactérie à croissance rapide (MCR) actuellement classée parmi les mycobactéries non-tuberculeuses (MNT) les plus pathogènes. Elle est principalement responsable d'infections pulmonaires sévères, en particulier chez les individus atteints de mucoviscidose. Cette bactérie se caractérise par une résistance naturelle à de nombreux antibiotiques, ce qui rend les infections à *M. abscessus* extrêmement difficiles à traiter. *M. abscessus* présente deux morphotypes qui diffèrent par leur morphologie ainsi que par leur virulence : un morphotype lisse (S) et un morphotype rugueux (R). La principale distinction entre ces deux morphotypes réside dans l'absence de glycopeptidolipides (GPLs) à la surface du morphotype R. Ce dernier a une forte tendance à former des cordes ou de gros agrégats au cours de l'infection, ce qui rend leur phagocytose par les macrophages difficile. C'est un trait caractéristique de la virulence accrue du morphotype R.

L'étude comparative des transcriptomes de plusieurs couples isogéniques S/R, à la fois par microarray et par RNA-seq, a révélé que cette transition est associée à des changements dans l'expression d'un large ensemble de gènes, parmi lesquels le gène *MAB_0545*, fortement exprimé chez le morphotype R, qui code pour le facteur de la transcription Lsr2. Lsr2 est une petite protéine basique exprimée chez toutes les mycobactéries ainsi que chez les actinomycètes, et qui a été précédemment décrite comme un répresseur de transcription. Une des propriétés les plus intéressantes de Lsr2 est certainement son rôle comme modulateur de la résistance aux antibiotiques. Lsr2 joue un rôle physiologique essentiel tant dans les morphotypes lisses que rugueux de *M. abscessus*, influençant la croissance intracellulaire au sein des macrophages et des amibes. Lsr2 contribue également à la virulence dans le modèle du poisson-zèbre et joue un rôle significatif dans la persistance de l'infection dans les poumons de souris infectées. Lsr2 occupe un rôle crucial dans la défense contre les espèces réactives de l'oxygène (ROS), à la fois chez *M. abscessus* et *M. tuberculosis*.

Lsr2 appartient à la superfamille des protéines associées au nucléoïde (NAPs), connues pour leur rôle essentiel dans l'organisation hiérarchique des chromosomes bactériens ainsi que dans la régulation génique. Comme son orthologue H-NS chez les entérobactéries, Lsr2 lie préférentiellement les séquences d'ADN riches en AT et possède la capacité de former des oligomères le long du génome, caractéristiques déjà décrites chez *M. tuberculosis* et *M. smegmatis*. Ces oligomères sont capables d'interagir entre eux *in vitro* afin de connecter des segments d'ADN, ce qui participerait *in vivo* à la formation de boucles. Ces deux propriétés permettraient d'expliquer le rôle de Lsr2 en tant que répresseur de l'expression de nombreux

gènes en modifiant la topologie locale de l'ADN en modulant, par exemple, l'accès de l'ARN polymérase au site de transcription ou sa progression durant l'élongation des transcrits.

Le but de mon projet de thèse est d'utiliser une approche intégrative de trois méthodes de génomique fonctionnelle afin d'explorer le rôle moléculaire de Lsr2 dans la pathobiologie des deux morphotypes S et R de *M. abscessus*.

Ces approches se décomposent en trois axes de travail :

- **Premier axe** : Mise en évidence des cibles transcriptionnelles de Lsr2 dans les morphotypes S et R de *M. abscessus* par la technique du séquençage haut débit des ARN (RNA-seq).
- **Deuxième axe** : Étude de la distribution de Lsr2 sur le génome des deux morphotypes S et R de *M. abscessus* par la méthode de l'immunoprécipitation de la chromatine suivie d'un séquençage haut débit (ChIP-seq). Les résultats obtenus seront corrélés par une étude par microscopie super-résolution pour déterminer la localisation subcellulaire de la protéine dans la bactérie, ainsi que d'une analyse intégrative RNA-seq/ChIP-seq afin de mieux cerner le mode de régulation de Lsr2.
- **Troisième axe** : Étude de l'impact de Lsr2 sur la conformation 3D du génome des deux morphotypes S et R de *M. abscessus* par la méthode de "High-throughput Chromosome Conformation Capture" (Hi-C).

Résultats

Partie I: Lsr2, un régulateur pléiotropique au cœur de la stratégie infectieuse de *Mycobacterium abscessus*

Dans cette partie de mon projet, j'ai utilisé deux méthodes de génomiques fonctionnelles, le RNA-seq et le CHIP-seq, afin d'étudier les gènes cibles de ce facteur de transcription, ainsi que la distribution de Lsr2 au niveau du génome des deux morphotypes de *M. abscessus*.

L'analyse transcriptomique montre que Lsr2 régule l'expression de nombreux gènes impliqués dans plusieurs processus cellulaires et moléculaires clés chez *M. abscessus*, dont seulement une partie est commune entre *M. abscessus* (Mabs)-S et *M. abscessus* (Mabs)-R. Lsr2 est notamment impliquée dans la régulation des gènes modifiant l'activité des macrolides et aminoglycosides, couramment utilisés dans le traitement clinique de *M. abscessus*. Ces résultats ont été confirmés par RT-qPCR, par des tests de détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI), ainsi qu'après infection des macrophages en mesurant la sensibilité des deux morphotypes en présence de ces antibiotiques. Le même effet régulateur de Lsr2 a également été démontré par des analyses de RT-qPCR pour deux gènes impliqués dans la virulence de *M. abscessus*, *mmpL8* et *MAB_2037*, après extraction d'ARN 16 heures post-infection de macrophages.

L'analyse par CHIP-seq a révélé que Lsr2 se lie fortement au génome de *M. abscessus* (10%) au niveau de séquences riches en AT sous forme de longs domaines, ce qui suggère une conservation de ce mode de fixation chez les mycobactéries. De manière surprenante, la distribution pangénomique de Lsr2 est identique entre Mabs-S et Mabs-R. Nous avons également confirmé le rôle répressif direct de Lsr2, où les gènes cibles directs sont davantage réprimés par rapport à l'ensemble des gènes régulés. De même, une forte corrélation a été observée entre l'oligomérisation de Lsr2 et son effet répressif. Enfin, le grand nombre de gènes liés par Lsr2 mais ne montrant aucune répression de leur expression nous a permis d'envisager des mécanismes transcriptionnels plus complexes, tels que l'existence de partenaires exprimés spécifiquement dans chacun de ces morphotypes ou des conditions physiologiques influençant le pontage de l'ADN par Lsr2.

Ce travail, qui englobe les deux premiers axes de mon projet de thèse, a fait l'objet d'un manuscrit, actuellement en révision dans la revue *Microbiology Spectrum*.

1 **Research article**

2 **Lsr2, a pleiotropic regulator at the core of the infectious strategy**
3 **of *Mycobacterium abscessus***

4
5 Elias Gerges¹, María del Pilar Rodríguez-Ordoñez², Nicolas Durand¹, Jean-Louis Herrmann^{1,3}
6 and Frédéric Crémazy^{1#}

7
8
9
10 ¹ Université Paris-Saclay, UVSQ, Inserm, Infection et inflammation, Montigny-Le-
11 Bretonneux, France.

12 ² Université Paris-Saclay, Université d'Evry, Laboratoire Européen de Recherche pour la
13 Polyarthrite rhumatoïde-Genhotel, Evry, France.

14 ³ APHP, GHU Paris-Saclay, Hôpital Raymond Poincaré, Service de Microbiologie, Garches,
15 France.

16
17
18
19 # **Correspondence:** frederic.cremazy@uvsq.fr

20
21 **Keywords:** *Mycobacterium abscessus*, S/R morphotypes, Lsr2, Nucleoid-Associated Protein,
22 Transcription factor, Antibiotic resistance

23
24 **Running title:** Lsr2 as a pleiotropic transcription factor in *M. abscessus*

25 **ABSTRACT**

26 *Mycobacterium abscessus* is a non-tuberculous mycobacterium, causing lung infections in
27 cystic fibrosis patients. During pulmonary infection, *M. abscessus* switches from smooth
28 (Mabs-S) to rough (Mabs-R) morphotypes, the latter being hyper-virulent. Previously, we
29 isolated the *lsr2* gene as differentially expressed during S-to-R transition. *lsr2* encodes a
30 pleiotropic transcription factor that falls under the superfamily of nucleoid-associated proteins
31 (NAPs). Here, we used two functional genomics methods, RNA-seq and ChIP-seq, to elucidate
32 the molecular role of Lsr2 in the pathobiology of *M. abscessus*. Transcriptomic analysis shows
33 that Lsr2 differentially regulates gene expression across both morphotypes, most of which are
34 involved in several key cellular processes of *M. abscessus*, including host adaptation and
35 antibiotic resistance. These results were confirmed through RT-qPCR, as well as by minimum
36 inhibitory concentration (MIC) tests and infection tests on macrophages in the presence of
37 antibiotics. ChIP-seq analysis revealed that Lsr2 extensively binds the *M. abscessus* genome at
38 AT-rich sequences and appears to form long domains that participate in the repression of its
39 target genes. Unexpectedly, the genomic distribution of Lsr2 revealed no distinctions between
40 Mabs-S and Mabs-R, implying more intricate mechanisms at play for achieving target
41 selectivity.

42

43 **IMPORTANCE**

44 Lsr2 is a crucial transcription factor and chromosome organizer involved in intracellular
45 growth and virulence in the smooth and rough morphotypes of *Mycobacterium abscessus*
46 (Mabs). Using RNA-seq and ChIP-seq, we investigated the molecular role of Lsr2 in gene
47 expression regulation along with its distribution on Mabs genome. Our study demonstrates the
48 pleiotropic regulatory role of Lsr2, regulating the expression of many genes coordinating

49 essential cellular and molecular processes in both morphotypes. In addition, we have elucidated
50 the role of Lsr2 in antibiotic resistance both *in vitro* and *in vivo*, where *lsr2* mutant strains
51 display heightened sensitivity to antibiotics. Through CHIP-seq, we reported the widespread
52 distribution of Lsr2 on Mabs genome, revealing a direct repressive effect due to its extensive
53 binding on promoters or coding sequences of its targets. This study unveils the significant
54 regulatory role of Lsr2, intricately intertwined with its function in shaping the organization of
55 the Mabs genome.

56

57 INTRODUCTION

58 *Mycobacterium abscessus* is a rapidly growing mycobacterium (RGM) that has emerged as a
59 significant pathogen in humans (1, 2). This species is known to be one of the most pathogenic
60 non-tuberculous mycobacteria (NTM), representing a serious threat to the health and well-
61 being of cystic fibrosis (CF) patients (3, 4). In comparison to other NTMs, *M. abscessus*
62 infections have been found to have particularly deleterious effects on ventilatory functions (5).
63 It is also responsible for persistent chronic infections associated with the formation of
64 inflammatory granulomas (6). Furthermore, analysis of the *M. abscessus* genome has revealed
65 the presence of several genes associated with multi-resistance to antibiotics and disinfectants
66 which make it hard to treat and eradicate (7–9).

67 Like other mycobacteria, *M. abscessus* displays two distinct morphotypes phenotypically
68 different in their motility and their ability to grow biofilm: Smooth (Mabs-S) and Rough
69 (Mabs-R) colony morphotypes (10, 11). The loss of surface-associated glycopeptidolipids
70 (GPL) stands as the hallmark of the Mabs-R morphotype, serving as a critical element in its
71 pathogenic strategy (11, 12). Indeed, the transition from Mabs-S to Mabs-R has been found to
72 be correlated with a significant increase in pathogenicity and modulation of the immune system
73 response (13, 14). Additionally, Mabs-R is associated with increased apoptosis and autophagy
74 in cells, leading to cell death and the formation of aggregates or serpentine cords in the
75 extracellular environment, facilitating the multiplication of the bacteria (15, 16). Thus,
76 understanding the mechanisms behind S-to-R transition that only occurs during pulmonary
77 infections is key for unraveling the pathogenicity of *M. abscessus*. Genomic analysis
78 comparing couples of isogenic morphotypes of Mabs-S and Mabs-R identified several
79 insertions/deletions (indels) and single nucleotide polymorphism (SNP) that impair the correct
80 expression of genes involved in the synthesis (*mps1* and *mps2*) and the transport (*mmpL4b*) of
81 GPL (17). Furthermore, we also identified the gene encoding the Leprosy serum reactive clone

82 2 (Lsr2) protein as exhibiting significantly higher expression level in Mabs-R, thereby
83 indicating its involvement in the heightened pathogenicity of this morphotype.

84 Originally identified as an immunodominant antigen in *M. leprae* (18), Lsr2 has subsequently
85 been isolated in other mycobacteria (19, 20) and streptomycetes (21). This 12.4 kDa small basic
86 protein belongs to the nucleoid-associated proteins (NAPs), a well-known family of
87 chromosomal organizers and global transcription factors (22). Recent studies have highlighted
88 the pivotal role of NAPs as major contributors to bacterial adaptation in response to changes in
89 environmental conditions and stress, particularly during host infections (23). Lsr2 acts as a
90 functional ortholog of the heat-stable nucleoid-structuring protein (H-NS), sharing its ability
91 to preferentially bind AT-rich sequences, possibly forming rigid oligomers and bridging distant
92 DNA fragments across the genome (24). Lsr2 functions as a pleiotropic regulator, influencing
93 the expression of numerous genes involved in virulence and host-induced stress response (25).
94 Chromatin immunoprecipitation-sequencing (ChIP-seq) studies performed in *M. tuberculosis*
95 have revealed that Lsr2 binds to genes associated with early antigenic secretion (ESX) systems,
96 the biosynthesis of phthiocerol dimycocerosates (PDIMs) and phenolic glycolipids (PGL) cell
97 wall lipids, and encoding antigenic proteins of the proline-glutamate (PE) and proline-proline-
98 glutamate (PPE) family (20). Additionally, Lsr2 has been shown as crucial for *M. tuberculosis*'
99 ability to vary oxygen levels and protect bacilli during macrophage infection against reactive
100 oxygen intermediates (ROI) (26, 27). Unlike in *M. tuberculosis*, Lsr2 is not vital for *M.*
101 *smegmatis* survival but impacts colony morphology, biofilm formation, and adaptation to
102 hypoxia and antibiotics (19, 28).

103 We recently showed that in *M. abscessus*, Lsr2 is crucial for intracellular growth of both
104 morphotypes within macrophages and amoeba (29). Deletion of *lsr2* increases the
105 susceptibility of the Mabs-R to oxidative species, highlighting the role of Lsr2 in protecting
106 DNA integrity from ROI during macrophage infection. Furthermore, Lsr2 is essential for the

107 virulence of *M. abscessus* in the zebrafish model and persistence in the lungs of infected mice.
108 Here, we used an integrated functional genomic approach to delve into the function of Lsr2 in
109 both S and R morphotypes of *M. abscessus*. Moreover, we investigated its impact on host
110 adaptation and its contribution to antibiotic resistance.

111 RESULTS

112 Differential expression analysis of the Mabs-S and Mabs-R transcriptomes of *M.* 113 *abscessus*

114 We first confirmed our precedent results by performing RNA-seq and comparing gene
115 expression on the S/R pair of 19977-IP (CIP) wild-type control strains. As shown in a prior
116 study conducted by Pawlik and co-workers (17), our data revealed only a handful of genes
117 showing differential expression between the two morphotypes. Specifically, we observed that
118 4 genes were more expressed in Mabs-S while 9 genes were more expressed in Mabs-R.
119 **(Supplementary Table S2)**. Notably, among these differentially expressed genes, we
120 identified key players in the S/R transition, such as the genes of GPL locus (*mps1*, *mps2* and
121 *gap*). Our current RNA-seq study also unveiled decreased expression of GPL locus genes in
122 Mabs-R compared to Mabs-S. This finding aligns with our previous study, which reported the
123 absence of mRNA transcripts for the *mps1-mps2-gap* operon in the Mabs-R due to the CG
124 insertion in the 5' region of *mps1*. Furthermore, both our work and the aforementioned study
125 highlight differential regulation of the genes encoding the Nrd family proteins between the two
126 morphotypes. Specifically, transcript expression levels of *nrdF*, *nrdE*, *nrdI* and *nrdH* were
127 significantly increased in Mabs-R. These genes are known to be involved in the nucleotide
128 metabolism pathway as well as in the persistence of mycobacteria within phagolysosomes.

129 Differential gene expression analysis of wild-type and *lsr2* mutant strains for Mabs-S and 130 Mabs-R

131 We performed differential gene expression analysis between *lsr2* mutant and wild-type strains
132 to identify the Lsr2 targets in *M. abscessus*. Our RNA-sequencing analysis revealed that a total
133 of 215 genes were regulated by Lsr2 in Mabs-R and 385 genes in Mabs-S. Interestingly, more
134 than 50% of these genes were upregulated in both morphotypes (158 genes in Mabs-R and 220

135 genes in Mabs-S) in the *lsr2* mutant, providing further evidence for the repressor role of Lsr2
136 under optimal growth conditions (**Figure 1A**). Among those, only 126 genes were common to
137 both Mabs-S and Mabs-R (**Figure 1B**). These include genes that are either repressed (e.g.,
138 *MAB_2037*, *MAB_2275*, *MAB_4467*...) or activated in both morphotypes (e.g., *eis2*, *paaK*,
139 *MAB_2355c*...) but also genes that show opposite regulation (e.g., *mmpL8*, *fadD9*,
140 *MAB_0829*...). We also show that 67.2% and 41.4% of the deregulated genes are only
141 regulated in Mabs-S and Mabs-R respectively (e.g., *mps2*, *MAB_1012c*, *ispe*...). This global
142 analysis suggests a different regulatory role for Lsr2 in the two morphotypes depending on
143 their physiologies.

144 Gene Ontology (GO) analysis performed on both Mabs-S and R showed that Lsr2 affects
145 multiple categories of biological and functional processes in *M. abscessus*, confirming its role
146 as a pleiotropic transcription regulator (**Figure 1C**). Notably, Lsr2 exhibits a significant impact
147 on the transport of different substrates in both morphotypes including siderophore transport
148 (GO:0044718), methionine transport (GO:0015821), sulfur amino acid transport
149 (GO:0000101), iron coordination entity transport (GO:1901678) and ABC-type amino acid
150 transporter activity (GO:0015424). Pertaining to metabolism activity, we observed GO
151 enrichment associated with phenylacetate catabolism (GO:0097266, GO:0010124,
152 GO:0033776), metabolism of glucose (GO:0006098) and organic acid catabolism
153 (GO:0016054). Interestingly, we observed an enrichment in lipid metabolism (GO:0016298,
154 GO:0004806) exclusively in Mabs-S suggesting a regulatory role for this protein based on the
155 membrane lipid composition of the two morphotypes. In addition, GO related to bacterial stress
156 response is also enriched in both Mabs-S and Mabs-R, particularly in the context of the
157 xenobiotic stimulus (GO:0009410).

158 **Lsr2 modulates the expression of genes involved in intracellular growth and in response**
159 **to stress**

160 Our transcriptomic analysis shows that Lsr2 acts as a pleiotropic transcription factor in both
161 morphotypes of *M. abscessus*, regulating a wide range of genes involved in key physiological
162 and cellular processes. Lsr2 positively controls the expression of genes related to growth and
163 intracellular survival (**Figure 2A**), such as *paaA*, *paaB*, *paaI*, *paaJ* and *paak* genes which were
164 acquired through horizontal transfer from β -*proteobacteria* and involved in phenylacetic acid
165 (PAA) degradation (7). *nrdI* and *nrdE* genes, two key players of intracellular survival (17) are
166 both upregulated by Lsr2 in Mabs-R, while they are downregulated in Mabs-S. Deletion of *lsr2*
167 leads to a significant decrease the expression of *MAB_4532c* (*eis2*) that encodes the Eis N-
168 acetyl transferase protein (30) both in Mabs-S and Mabs-R (**Figure 2A**).

169 Additionally, we identified two genes, *MAB_2142* and *MAB_2146* activated only in Mabs-R
170 by Lsr2 and encoding [4F-4S] Ferredoxin proteins that function as intracellular stress sensors
171 and contribute to genomic stability during macrophage and amoeba infections (30). Deletion
172 of *lsr2* in Mabs-S and Mabs-R also results in a significant decrease in the expression of the
173 *MAB_4324c* gene, which encodes an N-acetyltransferase recently found to enhance
174 internalization and intracellular growth of mycobacteria in human macrophages (31) (**Figure**
175 **2A**).

176 **Lsr2 plays a role in virulence and pathogenicity regulation genes**

177 Lsr2 modulates the expression of *mce* (mammalian cell entry) genes encoding proteins
178 involved in virulence and pathogenicity through host cell recognition and invasion in
179 *M.tuberculosis* (32, 33). For example, *mceA*, *mceB* and *mceC* genes were more expressed in
180 wild-type Mabs-S compared to Mabs-S- Δ *lsr2* while other *mce* genes such *mceD* and *mceF*,
181 located in a different locus, were repressed (**Figure 2A**). *nuoG*, *aphC* and *htrA2*, all regulated

182 in Mabs-R, impede macrophage antimicrobial effectors through their response to oxidative and
183 nitrosative stress as well as their inhibitory effect on cell apoptosis and phagosomal maturation
184 (34, 35). Interestingly, several families of transcriptional regulators playing a key role in
185 virulence were targets for Lsr2. For example, *sigD* and *SigE* that code for two sigma factors
186 regulated by Lsr2 in Mabs-S and Mabs-R respectively, are involved in macrophage viability
187 through resistance to oxidative stress (36, 37). Moreover, *mprA* and *mprB*, also regulated by
188 Lsr2 in Mabs-R, are *sigD*-dependent transcriptional regulators involved in stress response
189 pathways in *M. tuberculosis* (38). *dosR* and *dosT*, encoding essential factors for hypoxic
190 adaptation, persistence, virulence for *M. tuberculosis*, are tightly controlled by Lsr2 in Mabs-
191 S (39, 40). Finally, Lsr2 controls *whiB3* transcription in Mabs-R, which is known to be involved
192 in intraphagosomal stress resistance in *M. tuberculosis* (41, 42) and redox sensing in *M.*
193 *smegmatis* (43). The transcriptomic results reveal a diverse range of Lsr2 targets involved in
194 virulence, strongly suggesting its role in the infection, pathogenicity, and persistence of *M.*
195 *abscessus*.

196 **Lsr2 regulates families of proteins involved in transport in *M. abscessus***

197 MmpL proteins (Mycobacterial membrane protein Large) play a crucial role in mycobacterial
198 physiology by facilitating the export of lipid components, toxins, and metabolites across the
199 cell envelope, as well as expelling antibiotics (44, 45). Interestingly, Lsr2 exhibits distinct
200 regulation of the *MAB_0855* gene encoding the MmpL8 protein in both Mabs-S and Mabs-R
201 **(Figure 2A and Supplementary Table S3)**. MmpL8 was found to be essential for intracellular
202 growth of *M. abscessus* in amoeba and macrophages. Its deletion significantly reduces
203 virulence in zebrafish and disrupts interactions with macrophages, hampering the
204 establishment of cytosolic connections (46). In Mabs-S, Lsr2 upregulated the *mmpL8* gene by
205 around 56-fold compared to Mabs-S- Δ *lsr2*, while in Mabs-R, Lsr2 downregulated the *mmpL8*

206 gene by approximately 5-fold in Mabs-R- Δ *lsr2*. To confirm if whether Lsr2 exhibits the same
207 regulatory effect *in vivo*, we performed RT-qPCR analysis on *mmpL8* using mRNA isolated
208 from wild-type and *lsr2* mutants Mabs-S and Mabs-R morphotypes 16 hours after murine
209 J774.2 macrophage infections. Consistent with transcriptomic analysis in planktonic cultures,
210 Lsr2 regulation of the *mmpL8* gene persists during macrophage infections. We observed a
211 significant increase in *mmpL8* transcripts in Mabs-R- Δ *lsr2*, while the expression of this gene
212 was not detectable in Mabs-S- Δ *lsr2* (**Figure 3**). This can also suggest that Lsr2 controls the
213 expression of the *tetR* transcription factor, which in turn regulates the entire *mmpL8*_{MAB} locus
214 (**Figure 2A and Supplementary Table S3**). Additional examples for strongly regulated *mmpL*
215 genes in Mabs-S and Mabs-R were *MAB_2037* and *MAB_2075*. The *MAB_2037* gene,
216 belonging to mycolate synthesis operon (30), was significantly repressed by Lsr2 both in Mabs-
217 S and Mabs-R (**Figure 2A**). Again, the repressive effect of Lsr2 on the *MAB_2037* gene was
218 confirmed by RT-qPCR after infection by both morphotypes of *M. abscessus* (**Figure 3**). For
219 all these genes, complementing the mutant strains with *lsr2* restored the same level of
220 expression as observed in wild-type strains.

221 ***lsr2* deletion results in increased GPL locus transcripts in Mabs-R morphotype**

222 The loss of GPL at the plasma membrane of *M. abscessus* is known as the hallmark of the S-
223 to-R transition and the role of Lsr2 as a negative regulator of GPL production was already
224 described in *M. smegmatis* (47). However, our previous results showed no effect of Lsr2
225 deletion on either the GPL profile or the morphology of the bacterium (29). Upon deletion of
226 *lsr2*, genes involved in GPL biosynthesis and transport (*mps1*, *mps2*, *gap* and *mmpL4b*) showed
227 increased expression only in Mabs-R, coinciding with the restoration of a full-length transcript,
228 despite the presence of the genetic lesion, while no significant difference in Mabs-S was
229 observed (**Figure 2A**).

230 **Lsr2 is implicated in central carbon metabolism regulation**

231 Through KEGG analysis, we investigated the impact of Lsr2 on various metabolic pathways
232 in *M. abscessus* (**Figure 2B**). Notably, our findings revealed that Lsr2 predominantly affects
233 the pathways of fatty acid degradation (β -oxidation) and amino acid degradation in both
234 morphotypes. Lsr2 exhibits both upregulation and downregulation of numerous genes
235 encoding enzymes involved in β -oxidation, including *fad* genes encoding acyl-CoA
236 synthetases, ultimately leading to acetyl-CoA production for further incorporation into the
237 tricarboxylic acid (TCA) cycle (**Figure 2B**). The regulatory influence of Lsr2 extends to amino
238 acid metabolism, particularly affecting the *paa* genes involved in intracellular growth, which
239 exhibit increased expression in both morphotypes. Genes involved in propanoate metabolism
240 were mostly highly expressed following *lsr2* deletion in Mabs-S and Mabs-R, including *bkdA*,
241 *bkdB*, *bkdC* and *MAB_4618* that facilitate the conversion of propionyl-CoA derived by β -
242 oxidation of odd-chain fatty acids, into succinate.

243 **Lsr2 controls antimicrobials resistance genes transcription and sensibility to antibiotics** 244 **in *M. abscessus***

245 Among the genes regulated by Lsr2 in both Mabs-S and Mabs-R, we have identified four genes
246 (*eis2*, *MAB_1409c*, *MAB_2355c* and *erm41*) encoding proteins modifying the activity of
247 aminoglycosides and macrolides antibiotics families, both widely used in the clinical treatment
248 of *M. abscessus* (9, 48–53). Our RNA-seq data shows that Lsr2 activates these antimicrobial
249 resistance genes, exhibiting higher expression in wild-type strains (**Figure 2A**). Furthermore,
250 RT-qPCR showed a significant decrease of expression of these four genes in Mabs-S- Δ *lsr2*
251 and Mabs-R- Δ *lsr2* upon macrophage infections (**Figure 4A**). Again, the wild-type expression
252 level of these genes was restored by complementing the mutant strains with *lsr2*. To investigate
253 whether this reduction in gene expression correlates with an increase in antibiotics sensitivity,

254 we determined the minimum inhibitory concentrations (MICs) of amikacin, tobramycin and
255 clarithromycin for both wild-type and mutant strains (**Table 1**). Mabs-S- Δ *lsr2* and Mabs-R-
256 Δ *lsr2* were more sensitive to one dilution factor for amikacin (4.5 and 8 μ g/mL) and for
257 tobramycin (4.5 and 5.5 μ g/mL) compared to wild-type strains. For clarithromycin, Mabs-R-
258 Δ *lsr2* (0.125 μ g/mL) was only four times more sensitive than Mabs-R (0.5 μ g/mL). Similar
259 experiments performed after macrophage infections followed by treatments with 1xCMI
260 liposomal amikacin and 1xCMI clarithromycin showed that both Mabs-S and Mabs-R respond
261 more significantly to liposomal amikacin and clarithromycin treatments compared to the wild-
262 type strains. For liposomal amikacin, this increased sensitivity is already significant on day 1
263 post-treatment for Mabs-S ($p < 0.05$) and day 3 for the Mabs-R ($p < 0.01$). By day 6, both
264 mutant strains exhibit a substantial difference in response to liposomal amikacin ($p < 0.0001$).
265 Regarding clarithromycin, the impact of *lsr2* deletion on antibiotic response is particularly
266 prominent in the Mabs-R- Δ *lsr2*, with a significant effect observed as early as day 1 post
267 treatment ($p < 0.05$) and a stronger response by day 6 ($p < 0.0001$) (**Figure 4B**). These results
268 strongly indicate that Lsr2, through its transcriptional effect, contributes in lowering
269 susceptibility to antibiotics, thereby confirming its role in antibiotic resistance. Moreover,
270 when assessing intracellular CFU counting following infection without antibiotic treatments,
271 we observed a more important reduction in bacterial viability in the presence of antibiotics for
272 *lsr2* mutant strains (**Supplementary Figure S1**).

273 **DNA-binding profiles of Lsr2 on Mabs-S and Mabs-R genomes**

274 We used ChIP-seq to reveal how Lsr2 binding mode on *M. abscessus* genome can explain its
275 effect on transcription regulation. Lsr2 binds around 10% of *M. abscessus* genes (511/4920
276 genes in Mabs-S and 501/4290 genes in Mabs-R), which is significantly less than what was
277 observed in *M. tuberculosis* and *M. smegmatis* (respectively 21% and 13%) (20). Peak calling

278 analysis showed that Lsr2 binding profile is similar between Mabs-S and Mabs-R with 348
279 enrichment peaks detected along the chromosome (**Figure 5A**). Lsr2 binds to long tracts of
280 DNA, forming extensive binding domains visualized through ChIP-seq as regions of enriched
281 coverage that can span over 1 Kb and extend up to 6 Kb in certain regions (averages of 589
282 and 560 bp in Mabs-S and Mabs-R respectively) (**Figures 5B and 5C**). This ability to form
283 long binding domains bears similarities to that observed in other NAPs such as H-NS in Gram
284 negative bacteria and has also been described for Lsr2 *in vivo* in *M. tuberculosis* (24, 54, 55).
285 Furthermore, we found that Lsr2 binds preferentially to AT-rich sequences (43% on average)
286 (**Figure 5B and 5D, Supplementary figure S2**) compared to the average AT content observed
287 in *M. abscessus* genome (35.9%) (7). Lsr2 had the same binding preference in other
288 mycobacteria such as *M. tuberculosis* (20) and *M. smegmatis* (28). We next assess the
289 distribution of Lsr2 over the different predicted operons constituting *M. abscessus*' genome.
290 This analysis revealed that Lsr2 binds to 16% of the operons, with the ability to bind either
291 operon promoters (12%), CDS (34%), or both operon promoters and CDS (54%) (**Figure 5E**).
292 These findings emphasize the preferential enrichment of Lsr2 on coding sequences, suggesting
293 its direct role in gene regulation through extensive binding domains.

294 **Effects of Lsr2 binding on transcription regulation in *M. abscessus***

295 Integration of RNA-seq data with Lsr2 binding profiles show that direct Lsr2 targets genes
296 constitute only 25% (99/385 genes) and 38% (81/215 genes) of all Lsr2-regulated genes in
297 Mabs-S and Mabs-R respectively. This numbers rise to 40% (154/385 genes) and 52%
298 (111/215 genes) when considering the genes within Lsr2-bound operons that additionally
299 exhibit altered expression in Lsr2 mutant strains (**Figure 6A**). Secondly, although Lsr2 binds
300 to a large number of genes or operons, many of them remain unregulated, indicating that its
301 binding to DNA alone is insufficient to trigger transcription regulation. Indeed, 82% (422/511

302 genes) and 86% (433/501 genes) of the genes bound by Lsr2 are not differentially expressed in
303 Mabs-S and Mabs-R mutants respectively (**Figure 6A**). If this lack of regulation can be
304 explained by an absence of expression for a part of these genes in our experimental conditions,
305 this result also suggests that unknown factors required for the transcriptional effect of Lsr2 are
306 missing, or that Lsr2 has only a structural effect on these genomic regions. Furthermore, among
307 all the direct targets of Lsr2 (**Figure 6B**), we found a stronger direct effect for Lsr2 in the
308 regulation of genes involved in transport (77.5%) while all the antimicrobial resistance genes
309 studied are indirectly regulated. To confirm the repressive function of Lsr2, we compared the
310 expression levels between all Lsr2-regulated genes with its direct target genes in Mabs-S and
311 Mabs-R. More than 74% of the direct target genes show significantly higher positive Log₂FC
312 values compared to all Lsr2-regulated genes in both morphotypes, confirming the direct
313 repressive role of Lsr2 in gene regulation (**Figure 6C**). In order to assess the potential impact
314 of the length of Lsr2 binding regions on its repressive effect, we investigated the distribution
315 of expression levels among the direct target genes, categorized based on the size of the binding
316 domains formed by Lsr2 (either less than 1 Kb or greater than 1 Kb). Significantly, more
317 positive Log₂FC folds are correlated with binding domains larger than 1 Kb ($p < 0.0001$ in
318 Mabs-S and $p < 0.01$ in Mabs-R), suggesting a positive correlation between the size of Lsr2-
319 enriched domains and the repressive effect of Lsr2 (**Figure 6D**).

320 DISCUSSION

321 If NAPs are widely recognized as essential factors in the hierarchical structural organization of
322 the bacterial chromosome, compelling evidence also highlights their crucial role in pathogen
323 adaptation to changing environments, including their ability to thrive within host cells, such as
324 macrophages, during infection. This includes reactive oxygen species (ROS) production, pH
325 variations, hypoxia or nutrient scarcity (56). The present study further establishes the pivotal
326 role of the NAP Lsr2 in the infectious strategy of *M. abscessus* as well as in its antibiotic
327 resistance. Consistent with previous findings (29), our transcriptomic analysis confirms the
328 impact of Lsr2 in controlling expression of key virulence factors on the intracellular and *in vivo*
329 survival of *M. abscessus*. Among *lsr2* regulated genes, *eis2* is an important determinant of
330 intracellular growth whose expression is highly induced in macrophages during infection. It
331 controls the production of ROS, the sensitivity of bacteria to hydrogen peroxide (H₂O₂) and
332 contributes to phagosomal membrane damage, thereby facilitating contact between the
333 pathogen and cytosol (30). Similarly, *paa* genes that are upregulated by *lsr2* contribute to stress
334 tolerance induced by antibiotics in *Acinetobacter baumannii* (57). These genes are also present
335 in *Burkholderia cepacia* where the *paak*'s homolog is essential for the survival of the pathogen
336 during infection in a rat model of chronic lung (58). The *sigD* and *SigE* genes, encoding two
337 sigma factors regulated by Lsr2 in Mabs-S and Mabs-R respectively, are involved in
338 macrophage viability through resistance to oxidative stress. The loss of *sigD* reduces virulence,
339 histopathology and lethality of *M. tuberculosis* infection in mice (36–38). The KEGG analysis
340 highlights a role of Lsr2 in the regulation of multiple metabolic pathways, with a particular
341 emphasis for genes related to fatty acid degradation. This is intriguing, considering that during
342 macrophage infections, a metabolic shift in carbon source utilization from sugars to lipids as a
343 carbon source was previously observed (30), reflecting certain signatures of adaptation in
344 intracellular life. Hence, the observed increase in mortality among *lsr2* mutant strains during

345 infection (29) may be attributed to the challenges they face in adapting their metabolism in the
346 absence of Lsr2. Likewise, Fe-S proteins, also regulated by Lsr2, are intracellular stress sensors
347 and play a role in the genomic stability whose biosynthesis was induced in macrophages and
348 amoeba by *M. abscessus* to adapt to an intracellular lifestyle (30). It has also been reported that
349 impaired Fe-S protein biogenesis was deleterious to *Pseudomonas aeruginosa* growth (59) and
350 decreases the ability of *Shigella flexneri* to invade epithelial cells lining the human colon (60).

351 Treatment of *M. abscessus* infection is particularly challenging, as this bacterium is resistant
352 to most classes of antibiotics (9, 61). Here, our transcriptomic analysis revealed that four genes
353 (*eis2*, *MAB_1409c*, *MAB_2355c* and *erm41*) contributing to aminoglycoside and macrolide
354 resistance, are regulatory targets activated by Lsr2 in both morphotypes. *erm41*, encoding a
355 methyltransferase, is widely studied for its role in inducible macrolide resistance in *M.*
356 *abscessus*, observed in 40-60% of clinical strains (49, 50, 62). *eis2*, which code for an N-
357 acetyltransferase, plays an important role in aminoglycoside resistance in *M. abscessus* by
358 acetylating the first amino group of molecules like amikacin, in addition to its role in
359 intracellular growth (53). The role of Lsr2 as a modulator of antibiotic resistance has been
360 previously demonstrated in mycobacteria (63). In *M. smegmatis*, deletion of *lsr2* showed
361 increased sensitivity of cells to nalidixic acid and rifampicin compared to the wild-type strain,
362 in addition to better penetration for vancomycin through the cell wall (28). Similarly, in *M.*
363 *abscessus*, we reported a greater sensitivity of *lsr2* mutant strains to liposomal amikacin and
364 clarithromycin during macrophage infections and MICs determination. The increased
365 sensitivity to antibiotics following *lsr2* deletion could also be explained by a deregulation of
366 certain enzymes involved in the metabolism of lipids essential for cell wall formation, thereby
367 modifying its permeability. Alternatively, the contribution of Lsr2 to antibiotic resistance in *M.*
368 *tuberculosis* has been explained by the repression of an efflux pump for isoniazid following its
369 overexpression (63). However, according to ChIP-seq results, these genes show no Lsr2

370 enrichment, suggesting their indirect regulation. Overall, the regulatory role of Lsr2 protein in
371 response to antibiotics across various mycobacteria confirmed its potential as a target for the
372 development of new antimicrobials.

373 Lsr2 was previously shown to bind to the promoter of the *mps* operon, while its deletion
374 increases GPL level at the membrane of *M. smegmatis* (24, 47). However, we previously
375 showed that the *lsr2* mutation did not restore the production of GPL in Mabs-R (29). These
376 findings align with the identification of a CG insertion in the 5' region of the *mps1* gene, which
377 completely abolishes the production of transcripts for the *mps1-mps2-gap* operon in this
378 morphotype (17). Remarkably, our RNA-seq data demonstrated that *lsr2* deletion can restore
379 transcripts elongation in this region to levels comparable to those observed in Mabs-S.
380 Nevertheless, the presence of this indel is likely to result in a non-functional protein, thus
381 preventing the bacteria to transition back to a smooth morphotype. This result still suggests an
382 intriguing insight regarding Lsr2 functions in regulating transcription dynamics and RNA
383 polymerase processivity, possibly via oligomerization or through changes in local DNA
384 topology.

385 One of the fundamental goals of our study was to highlight the binding modes and to identify
386 the direct target genes of Lsr2 on Mabs-S and Mabs-R genomes. Our ChIP-seq analysis
387 identified 348 Lsr2 binding sites distributed throughout the *M. abscessus* chromosome. Like
388 its ortholog H-NS, we have determined that Lsr2 presents a high affinity for AT-rich sequences.
389 Previous reports suggest that Lsr2 and H-NS act as xenogeneic silencers for AT-rich regions
390 acquired by horizontal gene transfer (21, 64, 65). In the case of *M. abscessus*, our findings do
391 not support the binding of Lsr2 to these specific genes. Analysis of the Lsr2 genomic
392 distribution in *M. tuberculosis* showed an enrichment pattern across 840 genes, including genes
393 coding for type VII secretion systems of the ESX family, for the synthesis of cell wall lipids

394 and PE/PPE proteins. In contrast, neither our ChIP-seq nor RNA-seq data revealed any binding
395 or regulation by Lsr2 on genes involved in the secretion systems in *M. abscessus*. Our data also
396 show that Lsr2 binding spans genomic regions that could sometimes exceed 1 Kb in size. As
397 already suggested in previous works, this observation highlights the potential role of Lsr2 in
398 repressing gene expression through a mechanism involving its oligomerization along
399 promoters and coding sequences of its target genes. It has also been suggested that the
400 oligomerization of Lsr2 plays a significant role in enhancing DNA stability by safeguarding it
401 against nuclease degradation or ROS (66).

402 Finally, the existence of a limited repertoire of shared Lsr2-regulated genes between Mabs-S
403 and Mabs-R firstly suggests differences in the Lsr2 distribution on the two morphotypes.
404 Surprisingly, this distribution was strictly identical between both morphotypes with the same
405 number of enrichment peaks detected. This result was further confirmed by a quantitative
406 statistical analysis using the DiffBind R package. It has been reported that the mode of action
407 of Lsr2 and H-NS could depend on additional features, such as the bridging of oligomers on
408 distant DNA fragments, which most likely contribute to loop formation (24, 25). The different
409 regulation between the two morphotypes as well as the presence of a large number of genes
410 bound by Lsr2 without any effect on their transcription strongly suggests the intervention of
411 other factors such as the existence of partner proteins or post-transcriptional modifications to
412 explain the Lsr2-dependant transcriptional repression mechanism.

413 MATERIALS AND METHODS

414 *M. abscessus* strains, growth conditions and DNA manipulations

415 Wild-type, *lsr2* mutant and *lsr2* complemented strains of *Mycobacterium abscessus* 19977-IP,
416 designated Mabs-S-WT, Mabs-R-WT, Mabs-S- Δ *lsr2*, Mabs-R- Δ *lsr2*, Mabs-S- Δ *lsr2*-*Clsr2* and
417 Mabs-R- Δ *lsr2*-*Clsr2*, were grown aerobically at 37°C in Middlebrook 7H9 broth or on
418 Middlebrook 7H11 agar, supplemented with 2% glycerol, 1% glucose and 0.05% tween 80
419 when necessary. Construction of *lsr2* mutant and *lsr2* complemented strains was carried out
420 during our previous study (29). Zeocin (25 µg/mL), kanamycin (250 µg/mL) and hygromycin
421 (500 µg/mL) were added to cultures for strain selection. The Lsr2-FLAG expressing strains
422 used for ChIP-seq analysis, designated Mabs-S-Lsr2-FLAG and Mabs-R-Lsr2-FLAG were
423 obtained by cloning PCR-amplified homology regions surrounding the *lsr2* locus into a vector
424 containing the *lsr2* gene sequence fused with three repeats of the FLAG epitope followed with
425 a zeocin resistance cassette. Sequences of primers used for this construction are listed in
426 **Supplementary Table S1**. Replacement of the endogenous *lsr2* gene by *lsr2*-FLAG-zeocin
427 sequence in Mabs-S and Mabs-R was performed as described previously (28, 55, 67). The
428 insertion of the FLAG protein did not alter the phenotype of the bacteria, nor did it affect the
429 *in vitro* growth rates of the strains in liquid culture when compared to Mabs-S and Mabs-R
430 (**Supplementary Figure S3**).

431 RNA extraction, purification and library preparation for RNA sequencing

432 Wild-type and *lsr2* mutant strains were grown until exponential growth phase with optical
433 density value 600 nm (OD₆₀₀) of 0.6 corresponding to approximately 2.4×10^8 cells/mL. A
434 total of 4.8×10^9 cells were harvested and total RNA from three biological replicates was
435 extracted for each strain using the Monarch® Total RNA Miniprep (NEB) Kit. After DNase I
436 treatment and elution, RNA concentrations were measured using the Qubit fluorometer

437 (Promega). RNA integrity was evaluated using the Bioanalyzer system (Agilent) and all
438 samples used for library preparation showed RNA Integrity Number (RIN) scores >8. rRNA
439 depletion was performed using the NEBNext® rRNA Depletion Kit (Bacteria) (NEB) and the
440 sequencing libraries were prepared using NEBNext Ultra II Directional RNA Library Prep Kit
441 (NEB) following manufacturer's instructions. RNA extraction from *lsr2* complemented strains
442 was carried out in the same for RT-qPCR experiments.

443 **NGS sequencing and data analyses**

444 All libraries were sequenced using a NextSeq500 (Illumina) at the Genomics platform of the
445 UFR Sciences de la Santé (UVSQ, Montigny-le-Bretonneux, France). The reads were trimmed
446 with fastp v0.23.2 (68) and mapped to the *M. abscessus* ATCC 19977 reference genome (NCBI
447 accession number NC_010397) using STAR 2.7.6a (69). Reads were counted with
448 featureCounts v2.0 (70). Differential gene expression analysis was performed on R using the
449 SARtools package using correction for batch effect (71). Significantly activated/repressed
450 genes were selected with a threshold of 0.05 on the adjusted P-value and a Log₂ fold change
451 (Log₂FC) of at least 1.

452 **Gene Ontology term analysis**

453 The Gene Ontology (GO) annotation of *M. abscessus* genome, specifically BP (Biological
454 Process) and MF (Molecular Function) categories, was used to describe the roles and functions
455 of the differentially expressed genes. The enrichment analysis was performed using the R
456 package TopGO v.2.46.0 by combining the three different methods (*classic*, *elim* and *weight*)
457 with two statistical tests to evaluate the score significance (Fisher's exact test and Kolmogorov-
458 Smirnov test).

459 **ChIP-seq library preparation**

460 Mabs-S-Lsr2-FLAG and Mabs-R-Lsr2-FLAG strains were grown until an OD of 0.6 and ChIP
461 experiments were carried out in three biological replicates for each strain. Briefly, 50 mL of
462 culture was fixed in 1% formaldehyde (Euromedex), quenched with glycine, washed with
463 phosphate-buffered saline (PBS) and lysed using VK05 beads and Precellys grinder (3 cycles:
464 8,700 rpm –3 × 20 s ON/60 s OFF, Bertin Technologies). For immunoprecipitation, 25 µg of
465 chromatin was incubated with 25 µl of monoclonal anti-FLAG® M2 magnetic beads (Sigma-
466 Aldrich) on a rotary shaker for 16 h at 4°C (29). The immunoprecipitated DNA and 1% of the
467 total input were reverse-crosslinked and eluted using the iPure v2 kit (Diagenode). For library
468 preparation, NEBNext® Ultra™ II DNA Library Prep Kit for Illumina (NEB) was used. In
469 parallel, ChIP-Seq libraries of Mabs-S and Mabs-R wild-type strains were prepared as a
470 negative control. All the libraries were sequenced with paired ends (150 cycles) using an
471 iSeq100 sequencer (Illumina).

472 **ChIP-seq data analysis**

473 Reads were trimmed with fastp v0.23.2 (68), followed by mapping to the *M. abscessus* ATCC
474 19977 genome (NCBI accession number NC_010397) using Bowtie v2.4.5 (72) with a
475 distribution of read coverages showing a mean of 35 to 58 as a proxy for sequencing depth.
476 Fragments size of all libraires showed a distribution with median values ranging from 107 to
477 165 bp. PCR duplicates were marked by Picard 3.1.0 and further removed with samtools
478 v1.15.1 (73). Peaks were visualized as raw sequencing coverage using the IGV genome
479 browser (74) after conversion of the bam files in bigwig using Deeptools (75) without input
480 normalization. Peak calling was performed using MACS v2.1.3.3 (76) with an FDR = 0,0029
481 and normalized against input libraries. Occurrence of Lsr2 peaks on operons or their promoters
482 was detected using the intersect function of Bedtools v2.29.2 (77). The *M. abscessus* operons

483 were predicted using Operon-mapper (78). Differential analysis of Lsr2 peaks between Mabs-
484 S and Mabs-R was performed on R using the DiffBind package v3.10.0 (79).

485 **Drug susceptibility testing**

486 Minimum inhibitory concentrations (MICs) were determined for amikacin (1-256 µg/mL),
487 tobramycin (0.25-64 µg/mL), clarithromycin (0.06-32 µg/mL) according to Clinical &
488 Laboratory Standards Institute (CLSI) guidelines (80). Stock solutions of amikacin (Mylan)
489 and tobramycin (Mylan) were dissolved in water and stock solutions of clarithromycin (Mylan)
490 were dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO). Drug susceptibility testing was determined
491 using the microdilution method, cation-adjusted Mueller-Hinton broth in three biological
492 replicates, as described previously (81, 82).

493 **Macrophage culture, infections and intracellular survival after antibiotic treatments**

494 Murine J774.2 macrophages were maintained at 37°C under 5% CO₂ in Dulbecco's modified
495 Eagle medium (DMEM) (Gibco) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (Gibco),
496 penicillin (100 IU/mL) and streptomycin (100 µg/mL). Macrophages were seeded in a 24-well
497 plate at a concentration of 5×10⁴ cells/mL of medium. Macrophage infections with wild-type
498 and *lsr2* mutant strains at 10 MOI and treatments with 1x CMI liposomal amikacin (Insmed)
499 and clarithromycin (Mylan) were carried out in three biological replicates, as described
500 previously (16, 83, 84). The number of intracellular CFU/mL was determined on days 1, 3, and
501 6 post-infection and post-treatment. For plate day 0, the number of intracellular CFU/mL was
502 determined 3 hours after infection, without any antibiotic treatments. In parallel, the same
503 infections were performed without antibiotic treatments as control for bacterial growth for 3
504 plates (days 1, 3 and 6).

505

506 **RNA extraction of mycobacteria from macrophage cocultures**

507 Infections and RNA extractions were carried out in three biological replicates as described
508 previously (30, 83). In brief, approximately 10^7 cells of murine J774.2 macrophages were
509 infected with wild-type, *lsr2* mutant and *lsr2* complemented strains at 50 MOI. Macrophages
510 were lysed 16 hours post-infection with a guanidine thiocyanate solution (4 M) plus β -
511 mercaptoethanol and total RNA was isolated from the bacterial pellets using TRIzol
512 reagent (Ambion) in the presence of zirconia/silica beads. After bacterial cell disruption using
513 a Precellys grinder (3 cycles: 8,700 rpm -3×20 s ON/60 s OFF, Bertin Technologies), RNA
514 samples were precipitated using chloroform isoamyl alcohol 24:1 and with 0.8 volumes of cold
515 isopropanol, washed with ethanol (70%), re-suspended in RNase-free water and treated with
516 the Turbo DNA-free kit (Invitrogen) to remove DNA contaminants.

517 **Reverse transcriptase quantitative PCR (RT-qPCR)**

518 cDNA was prepared using SuperScript® III First-Strand Synthesis System Kit (Invitrogen).
519 RT-qPCR was performed with a CFX96 thermal cycler (Bio-Rad), using the DyNAmo
520 ColorFlash SYBR Green qPCR Kit (ThermoFisher), as described previously (14, 17). Target
521 gene expression was quantified relative to the reference gene, *sigA*. The sequences of primers
522 used for quantitative real-time PCR (RT-qPCR) are listed in **Supplementary Table S1**. Each
523 RT-qPCR was performed on three biological replicates.

524 **DATA AVAILABILITY**

525 All genomic data produced in the present project (RNA-seq and ChIP-seq) are available in the
526 NCBI GEO database under accession number GSE239871.

527 **FUNDINGS**

528 This work was supported by the Vaincre la mucoviscidose and Gregory Lemarchal associations
529 (PhD fellowship to VLM - RF20200502727/2/1/53).

530 *Conflict of interest statement:* The authors declare that no competing interests exist.

531 **ACKNOWLEDGEMENTS**

532 *Author contributions:*

533 E.G. designed and performed experiments, analyzed data, and wrote the paper; M.P.R-O.
534 analyzed data; ND wrote the paper; J-L.H. designed experiments and wrote the paper; F.C.
535 designed experiments, analyzed data, and wrote the paper.

536

537 **REFERENCES**

- 538 1. Thomson RM, Carter R, Tolson C, Coulter C, Huygens F, Hargreaves M. 2013. Factors associated
539 with the isolation of Nontuberculous mycobacteria (NTM) from a large municipal water system in
540 Brisbane, Australia. *BMC Microbiol* 13:89.
- 541 2. Mougari F, Guglielmetti L, Raskine L, Sermet-Gaudelus I, Veziris N, Cambau E. 2016. Infections
542 caused by *Mycobacterium abscessus*: epidemiology, diagnostic tools and treatment. *Expert Rev Anti*
543 *Infect Ther* 14:1139–1154.
- 544 3. Degiacomi G, Sammartino JC, Chiarelli LR, Riabova O, Makarov V, Pasca MR. 2019.
545 *Mycobacterium abscessus*, an Emerging and Worrisome Pathogen among Cystic Fibrosis Patients. *Int*
546 *J Mol Sci* 20:5868.
- 547 4. Johansen MD, Herrmann J-L, Kremer L. 2020. Non-tuberculous mycobacteria and the rise of
548 *Mycobacterium abscessus*. *Nat Rev Microbiol* 18:392–407.
- 549 5. Qvist T, Taylor-Robinson D, Waldmann E, Olesen HV, Hansen CR, Mathiesen IH, Høiby N,
550 Katzenstein TL, Smyth RL, Diggle PJ, Pressler T. 2016. Comparing the harmful effects of
551 nontuberculous mycobacteria and Gram negative bacteria on lung function in patients with cystic
552 fibrosis. *J Cyst Fibros Off J Eur Cyst Fibros Soc* 15:380–385.
- 553 6. Esther CR, Esserman DA, Gilligan P, Kerr A, Noone PG. 2010. Chronic *Mycobacterium abscessus*
554 infection and lung function decline in cystic fibrosis. *J Cyst Fibros Off J Eur Cyst Fibros Soc* 9:117–
555 123.
- 556 7. Ripoll F, Pasek S, Schenowitz C, Dossat C, Barbe V, Rottman M, Macheras E, Heym B, Herrmann
557 J-L, Daffé M, Brosch R, Risler J-L, Gaillard J-L. 2009. Non mycobacterial virulence genes in the
558 genome of the emerging pathogen *Mycobacterium abscessus*. *PloS One* 4:e5660.
- 559 8. Rominski A, Selchow P, Becker K, Brülle JK, Dal Molin M, Sander P. 2017. Elucidation of
560 *Mycobacterium abscessus* aminoglycoside and capreomycin resistance by targeted deletion of three
561 putative resistance genes. *J Antimicrob Chemother* 72:2191–2200.
- 562 9. Illouz M, Alcaraz M, Roquet-Banères F, Kremer L. 2021. [*Mycobacterium abscessus*, a model of
563 resistance to multiple antibiotic classes]. *Med Sci MS* 37:993–1001.
- 564 10. Byrd TF, Lyons CR. 1999. Preliminary characterization of a *Mycobacterium abscessus* mutant in
565 human and murine models of infection. *Infect Immun* 67:4700–4707.
- 566 11. Howard ST, Rhoades E, Recht J, Pang X, Alsup A, Kolter R, Lyons CR, Byrd TF. 2006.

567 Spontaneous reversion of *Mycobacterium abscessus* from a smooth to a rough morphotype is associated
568 with reduced expression of glycopeptidolipid and reacquisition of an invasive phenotype. *Microbiol*
569 *Read Engl* 152:1581–1590.

570 12. Medjahed H, Gaillard J-L, Reyrat J-M. 2010. *Mycobacterium abscessus*: a new player in the
571 mycobacterial field. *Trends Microbiol* 18:117–123.

572 13. Davidson LB, Nessar R, Kempaiah P, Perkins DJ, Byrd TF. 2011. *Mycobacterium abscessus*
573 glycopeptidolipid prevents respiratory epithelial TLR2 signaling as measured by H β D2 gene expression
574 and IL-8 release. *PloS One* 6:e29148.

575 14. Roux A-L, Ray A, Pawlik A, Medjahed H, Etienne G, Rottman M, Catherinot E, Coppée J-Y,
576 Chaoui K, Monsarrat B, Toubert A, Daffé M, Puzo G, Gaillard J-L, Brosch R, Dulphy N, Nigou J,
577 Herrmann J-L. 2011. Overexpression of proinflammatory TLR-2-signalling lipoproteins in
578 hypervirulent mycobacterial variants. *Cell Microbiol* 13:692–704.

579 15. Bernut A, Herrmann J-L, Kissa K, Dubremetz J-F, Gaillard J-L, Lutfalla G, Kremer L. 2014.
580 *Mycobacterium abscessus* cording prevents phagocytosis and promotes abscess formation. *Proc Natl*
581 *Acad Sci U S A* 111:E943-952.

582 16. Roux A-L, Viljoen A, Bah A, Simeone R, Bernut A, Laencina L, Deramaudt T, Rottman M,
583 Gaillard J-L, Majlessi L, Brosch R, Girard-Misguich F, Vergne I, de Chastellier C, Kremer L, Herrmann
584 J-L. 2016. The distinct fate of smooth and rough *Mycobacterium abscessus* variants inside
585 macrophages. *Open Biol* 6:160185.

586 17. Pawlik A, Garnier G, Orgeur M, Tong P, Lohan A, Le Chevalier F, Sapriel G, Roux A-L, Conlon
587 K, Honoré N, Dillies M-A, Ma L, Bouchier C, Coppée J-Y, Gaillard J-L, Gordon SV, Loftus B, Brosch
588 R, Herrmann JL. 2013. Identification and characterization of the genetic changes responsible for the
589 characteristic smooth-to-rough morphotype alterations of clinically persistent *Mycobacterium*
590 *abscessus*. *Mol Microbiol* 90:612–629.

591 18. Laal S, Sharma YD, Prasad HK, Murtaza A, Singh S, Tangri S, Misra RS, Nath I. 1991.
592 Recombinant fusion protein identified by lepromatous sera mimics native *Mycobacterium leprae* in T-
593 cell responses across the leprosy spectrum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:1054–1058.

594 19. Chen JM, German GJ, Alexander DC, Ren H, Tan T, Liu J. 2006. Roles of Lsr2 in colony
595 morphology and biofilm formation of *Mycobacterium smegmatis*. *J Bacteriol* 188:633–641.

596 20. Gordon BRG, Li Y, Wang L, Sintsova A, van Bakel H, Tian S, Navarre WW, Xia B, Liu J. 2010.
597 Lsr2 is a nucleoid-associated protein that targets AT-rich sequences and virulence genes in
598 *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:5154–5159.

- 599 21. Gehrke EJ, Zhang X, Pimentel-Elardo SM, Johnson AR, Rees CA, Jones SE, Hindra null, Gehrke
600 SS, Turvey S, Boursalie S, Hill JE, Carlson EE, Nodwell JR, Elliot MA. 2019. Silencing cryptic
601 specialized metabolism in *Streptomyces* by the nucleoid-associated protein Lsr2. *eLife* 8:e47691.
- 602 22. Dame RT, Rashid F-ZM, Grainger DC. 2020. Chromosome organization in bacteria: mechanistic
603 insights into genome structure and function. *Nat Rev Genet* 21:227–242.
- 604 23. Hołówka J, Zakrzewska-Czerwińska J. 2020. Nucleoid Associated Proteins: The Small Organizers
605 That Help to Cope With Stress. *Front Microbiol* 11:590.
- 606 24. Chen JM, Ren H, Shaw JE, Wang YJ, Li M, Leung AS, Tran V, Berbenetz NM, Kocíncová D, Yip
607 CM, Reyrat J-M, Liu J. 2008. Lsr2 of *Mycobacterium tuberculosis* is a DNA-bridging protein. *Nucleic
608 Acids Res* 36:2123–2135.
- 609 25. Liu J, Gordon BRG. 2012. Targeting the global regulator Lsr2 as a novel approach for anti-
610 tuberculosis drug development. *Expert Rev Anti Infect Ther* 10:1049–1053.
- 611 26. Colangeli R, Haq A, Arcus VL, Summers E, Magliozzo RS, McBride A, Mitra AK, Radjainia M,
612 Khajo A, Jacobs WR, Salgame P, Alland D. 2009. The multifunctional histone-like protein Lsr2
613 protects mycobacteria against reactive oxygen intermediates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:4414–
614 4418.
- 615 27. Bartek IL, Woolhiser LK, Baughn AD, Basaraba RJ, Jacobs WR, Lenaerts AJ, Voskuil MI. 2014.
616 *Mycobacterium tuberculosis* Lsr2 is a global transcriptional regulator required for adaptation to
617 changing oxygen levels and virulence. *mBio* 5:e01106-01114.
- 618 28. Kołodziej M, Łebkowski T, Płociński P, Hołówka J, Paściak M, Wojtaś B, Bury K, Konieczny I,
619 Dziadek J, Zakrzewska-Czerwińska J. 2021. Lsr2 and Its Novel Parologue Mediate the Adjustment of
620 *Mycobacterium smegmatis* to Unfavorable Environmental Conditions. *mSphere* 6:e00290-21.
- 621 29. Le Moigne V, Bernut A, Cortès M, Viljoen A, Dupont C, Pawlik A, Gaillard J-L, Misguich F,
622 Crémazy F, Kremer L, Herrmann J-L. 2019. Lsr2 Is an Important Determinant of Intracellular Growth
623 and Virulence in *Mycobacterium abscessus*. *Front Microbiol* 10:905.
- 624 30. Dubois V, Pawlik A, Bories A, Le Moigne V, Sismeiro O, Legendre R, Varet H, Rodríguez-
625 Ordóñez MDP, Gaillard J-L, Coppée J-Y, Brosch R, Herrmann J-L, Girard-Misguich F. 2019.
626 *Mycobacterium abscessus* virulence traits unraveled by transcriptomic profiling in amoeba and
627 macrophages. *PLoS Pathog* 15:e1008069.
- 628 31. Alsarraf HMAB, Ung KL, Johansen MD, Dimon J, Olieric V, Kremer L, Blaise M. 2022.
629 Biochemical, structural, and functional studies reveal that MAB_4324c from *Mycobacterium abscessus*

630 is an active tandem repeat N-acetyltransferase. FEBS Lett 596:1516–1532.

631 32. El-Shazly S, Ahmad S, Mustafa AS, Al-Attayah R, Krajci D. 2007. Internalization by HeLa cells
632 of latex beads coated with mammalian cell entry (Mce) proteins encoded by the mce3 operon of
633 *Mycobacterium tuberculosis*. J Med Microbiol 56:1145–1151.

634 33. Stavrum R, Valvatne H, Stavrum A-K, Riley LW, Ulvestad E, Jonassen I, Doherty TM, Grewal
635 HMS. 2012. *Mycobacterium tuberculosis* Mce1 protein complex initiates rapid induction of
636 transcription of genes involved in substrate trafficking. Genes Immun 13:496–502.

637 34. Velmurugan K, Chen B, Miller JL, Azogue S, Gurses S, Hsu T, Glickman M, Jacobs WR, Porcelli
638 SA, Briken V. 2007. *Mycobacterium tuberculosis* nuoG is a virulence gene that inhibits apoptosis of
639 infected host cells. PLoS Pathog 3:e110.

640 35. Pradhan G, Shrivastva R, Mukhopadhyay S. 2018. Mycobacterial PknG Targets the Rab711
641 Signaling Pathway To Inhibit Phagosome-Lysosome Fusion. J Immunol Baltim Md 1950 201:1421–
642 1433.

643 36. Calamita H, Ko C, Tyagi S, Yoshimatsu T, Morrison NE, Bishai WR. 2005. The *Mycobacterium*
644 *tuberculosis* SigD sigma factor controls the expression of ribosome-associated gene products in
645 stationary phase and is required for full virulence. Cell Microbiol 7:233–244.

646 37. Manganelli R. 2014. Sigma Factors: Key Molecules in *Mycobacterium tuberculosis* Physiology
647 and Virulence. Microbiol Spectr 2:2.1.02.

648 38. Sachdeva P, Misra R, Tyagi AK, Singh Y. 2010. The sigma factors of *Mycobacterium tuberculosis*:
649 regulation of the regulators. FEBS J 277:605–626.

650 39. Chen T, He L, Deng W, Xie J. 2013. The *Mycobacterium* DosR regulon structure and diversity
651 revealed by comparative genomic analysis. J Cell Biochem 114:1–6.

652 40. Gautam US, Sikri K, Vashist A, Singh V, Tyagi JS. 2014. Essentiality of DevR/DosR interaction
653 with SigA for the dormancy survival program in *Mycobacterium tuberculosis*. J Bacteriol 196:790–799.

654 41. Singh A, Crossman DK, Mai D, Guidry L, Voskuil MI, Renfrow MB, Steyn AJC. 2009.
655 *Mycobacterium tuberculosis* WhiB3 maintains redox homeostasis by regulating virulence lipid
656 anabolism to modulate macrophage response. PLoS Pathog 5:e1000545.

657 42. Mehta M, Rajmani RS, Singh A. 2016. *Mycobacterium tuberculosis* WhiB3 Responds to Vacuolar
658 pH-induced Changes in Mycothiol Redox Potential to Modulate Phagosomal Maturation and Virulence.
659 J Biol Chem 291:2888–2903.

- 660 43. You D, Xu Y, Yin B-C, Ye B-C. 2019. Nitrogen Regulator GlnR Controls Redox Sensing and
661 Lipids Anabolism by Directly Activating the whiB3 in *Mycobacterium smegmatis*. *Front Microbiol*
662 10:74.
- 663 44. Viljoen A, Dubois V, Girard-Misguich F, Blaise M, Herrmann J-L, Kremer L. 2017. The diverse
664 family of MmpL transporters in mycobacteria: from regulation to antimicrobial developments. *Mol*
665 *Microbiol* 104:889–904.
- 666 45. Richard M, Gutiérrez AV, Viljoen A, Rodriguez-Rincon D, Roquet-Baneres F, Blaise M, Everall
667 I, Parkhill J, Floto RA, Kremer L. 2019. Mutations in the MAB_2299c TetR Regulator Confer Cross-
668 Resistance to Clofazimine and Bedaquiline in *Mycobacterium abscessus*. *Antimicrob Agents*
669 *Chemother* 63:e01316-18.
- 670 46. Dubois V, Viljoen A, Laencina L, Le Moigne V, Bernut A, Dubar F, Blaise M, Gaillard J-L,
671 Guérardel Y, Kremer L, Herrmann J-L, Girard-Misguich F. 2018. MmpL8MAB controls
672 *Mycobacterium abscessus* virulence and production of a previously unknown glycolipid family. *Proc*
673 *Natl Acad Sci U S A* 115:E10147–E10156.
- 674 47. Kocíncová D, Singh AK, Beretti J-L, Ren H, Euphrasie D, Liu J, Daffé M, Etienne G, Reyrat J-M.
675 2008. Spontaneous transposition of IS1096 or ISMsm3 leads to glycopeptidolipid overproduction and
676 affects surface properties in *Mycobacterium smegmatis*. *Tuberc Edinb Scotl* 88:390–398.
- 677 48. Guo Q, Zhang Y, Fan J, Zhang H, Zhang Z, Li B, Chu H. 2021. MAB_2355c Confers Macrolide
678 Resistance in *Mycobacterium abscessus* by Ribosome Protection. *Antimicrob Agents Chemother*
679 65:e0033021.
- 680 49. Nash KA, Brown-Elliott BA, Wallace RJ. 2009. A novel gene, erm(41), confers inducible
681 macrolide resistance to clinical isolates of *Mycobacterium abscessus* but is absent from *Mycobacterium*
682 *chelonae*. *Antimicrob Agents Chemother* 53:1367–1376.
- 683 50. Richard M, Gutiérrez AV, Kremer L. 2020. Dissecting erm(41)-Mediated Macrolide-Inducible
684 Resistance in *Mycobacterium abscessus*. *Antimicrob Agents Chemother* 64:e01879-19.
- 685 51. Vianna JS, Machado D, Ramis IB, Silva FP, Bierhals DV, Abril MA, von Groll A, Ramos DF,
686 Lourenço MCS, Viveiros M, da Silva PEA. 2019. The Contribution of Efflux Pumps in *Mycobacterium*
687 *abscessus* Complex Resistance to Clarithromycin. *Antibiot Basel Switz* 8:153.
- 688 52. Guo Q, Chen J, Zhang S, Zou Y, Zhang Y, Huang D, Zhang Z, Li B, Chu H. 2020. Efflux Pumps
689 Contribute to Intrinsic Clarithromycin Resistance in Clinical, *Mycobacterium abscessus* Isolates. *Infect*
690 *Drug Resist* 13:447–454.

- 691 53. Ung KL, Alsarraf HMAB, Olieric V, Kremer L, Blaise M. 2019. Crystal structure of the
692 aminoglycosides N-acetyltransferase Eis2 from *Mycobacterium abscessus*. *FEBS J* 286:4342–4355.
- 693 54. Dillon SC, Dorman CJ. 2010. Bacterial nucleoid-associated proteins, nucleoid structure and gene
694 expression. *Nat Rev Microbiol* 8:185–195.
- 695 55. Kahramanoglou C, Seshasayee ASN, Prieto AI, Ibberson D, Schmidt S, Zimmermann J, Benes V,
696 Fraser GM, Luscombe NM. 2011. Direct and indirect effects of H-NS and Fis on global gene expression
697 control in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res* 39:2073–2091.
- 698 56. Bussi C, Gutierrez MG. 2019. *Mycobacterium tuberculosis* infection of host cells in space and
699 time. *FEMS Microbiol Rev* 43:341–361.
- 700 57. Hooppaw AJ, McGuffey JC, Di Venanzio G, Ortiz-Marquez JC, Weber BS, Lightly TJ, van
701 Opijnen T, Scott NE, Cardona ST, Feldman MF. 2022. The Phenylacetic Acid Catabolic Pathway
702 Regulates Antibiotic and Oxidative Stress Responses in *Acinetobacter*. *mBio* 13:e0186321.
- 703 58. Hunt TA, Kooi C, Sokol PA, Valvano MA. 2004. Identification of *Burkholderia cenocepacia* genes
704 required for bacterial survival in vivo. *Infect Immun* 72:4010–4022.
- 705 59. Elsen S, Efthymiou G, Peteinatos P, Diallinas G, Kyritsis P, Moulis J-M. 2010. A bacteria-specific
706 2[4Fe-4S] ferredoxin is essential in *Pseudomonas aeruginosa*. *BMC Microbiol* 10:271.
- 707 60. Py B, Barras F. 2014. [Iron and sulfur in proteins. How does the cell build Fe-S clusters, cofactors
708 essential for life?]. *Med Sci MS* 30:1110–1122.
- 709 61. Kwak N, Dalcolmo MP, Daley CL, Eather G, Gayoso R, Hasegawa N, Jhun BW, Koh W-J,
710 Namkoong H, Park J, Thomson R, van Ingen J, Zweijpfenning SMH, Yim J-J. 2019. *Mycobacterium*
711 *abscessus* pulmonary disease: individual patient data meta-analysis. *Eur Respir J* 54:1801991.
- 712 62. Bastian S, Veziris N, Roux A-L, Brossier F, Gaillard J-L, Jarlier V, Cambau E. 2011. Assessment
713 of clarithromycin susceptibility in strains belonging to the *Mycobacterium abscessus* group by *erm*(41)
714 and *rrl* sequencing. *Antimicrob Agents Chemother* 55:775–781.
- 715 63. Colangeli R, Helb D, Vilchèze C, Hazbón MH, Lee C-G, Safi H, Sayers B, Sardone I, Jones MB,
716 Fleischmann RD, Peterson SN, Jacobs WR, Alland D. 2007. Transcriptional regulation of multi-drug
717 tolerance and antibiotic-induced responses by the histone-like protein Lsr2 in *M. tuberculosis*. *PLoS*
718 *Pathog* 3:e87.
- 719 64. Navarre WW, McClelland M, Libby SJ, Fang FC. 2007. Silencing of xenogeneic DNA by H-NS-
720 facilitation of lateral gene transfer in bacteria by a defense system that recognizes foreign DNA. *Genes*
721 *Dev* 21:1456–1471.

- 722 65. Gordon BRG, Li Y, Cote A, Weirauch MT, Ding P, Hughes TR, Navarre WW, Xia B, Liu J. 2011.
723 Structural basis for recognition of AT-rich DNA by unrelated xenogeneic silencing proteins. *Proc Natl*
724 *Acad Sci U S A* 108:10690–10695.
- 725 66. Summers EL, Meindl K, Usón I, Mitra AK, Radjainia M, Colangeli R, Alland D, Arcus VL. 2012.
726 The Structure of the Oligomerization Domain of Lsr2 from *Mycobacterium tuberculosis* Reveals a
727 Mechanism for Chromosome Organization and Protection. *PLoS ONE* 7:e38542.
- 728 67. Medjahed H, Singh AK. 2010. Genetic manipulation of *Mycobacterium abscessus*. *Curr Protoc*
729 *Microbiol* Chapter 10:Unit 10D.2.
- 730 68. Chen S. 2023. Ultrafast one-pass FASTQ data preprocessing, quality control, and deduplication
731 using fastp. *iMeta* 2:e107.
- 732 69. Dobin A, Davis CA, Schlesinger F, Drenkow J, Zaleski C, Jha S, Batut P, Chaisson M, Gingeras
733 TR. 2013. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics* 29:15–21.
- 734 70. Liao Y, Smyth GK, Shi W. 2014. featureCounts: an efficient general purpose program for
735 assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics* 30:923–930.
- 736 71. Varet H, Brillet-Guéguen L, Coppée J-Y, Dillies M-A. 2016. SARTools: A DESeq2- and EdgeR-
737 Based R Pipeline for Comprehensive Differential Analysis of RNA-Seq Data. *PloS One* 11:e0157022.
- 738 72. Langmead B, Salzberg SL. 2012. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. 4. *Nat Methods*
739 9:357–359.
- 740 73. Danecek P, Bonfield JK, Liddle J, Marshall J, Ohan V, Pollard MO, Whitwham A, Keane T,
741 McCarthy SA, Davies RM, Li H. 2021. Twelve years of SAMtools and BCFtools. *GigaScience*
742 10:giab008.
- 743 74. Robinson JT, Thorvaldsdóttir H, Winckler W, Guttman M, Lander ES, Getz G, Mesirov JP. 2011.
744 Integrative genomics viewer. *Nat Biotechnol* 29:24–26.
- 745 75. Ramírez F, Ryan DP, Grüning B, Bhardwaj V, Kilpert F, Richter AS, Heyne S, Dündar F, Manke
746 T. 2016. deepTools2: a next generation web server for deep-sequencing data analysis. *Nucleic Acids*
747 *Res* 44:W160-5.
- 748 76. Zhang Y, Liu T, Meyer CA, Eeckhoute J, Johnson DS, Bernstein BE, Nusbaum C, Myers RM,
749 Brown M, Li W, Liu XS. 2008. Model-based analysis of ChIP-Seq (MACS). *Genome Biol* 9:R137.
- 750 77. Quinlan AR, Hall IM. 2010. BEDTools: a flexible suite of utilities for comparing genomic features.
751 *Bioinforma Oxf Engl* 26:841–842.

- 752 78. Taboada B, Estrada K, Ciria R, Merino E. 2018. Operon-mapper: a web server for precise operon
753 identification in bacterial and archaeal genomes. *Bioinforma Oxf Engl* 34:4118–4120.
- 754 79. Stark R, Brown G. 2011. DiffBind: differential binding analysis of ChIP-Seq peak data. R Package
755 Version 100.
- 756 80. Woods GL, Brown-Elliott BA, Conville PS, Desmond EP, Hall GS, Lin G, Pfyffer GE, Ridderhof
757 JC, Siddiqi SH, Wallace RJ, Warren NG, Witebsky FG. 2011. *Susceptibility Testing of Mycobacteria,*
758 *Nocardiae, and Other Aerobic Actinomycetes*, 2nd ed. Clinical and Laboratory Standards Institute,
759 Wayne (PA). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK544374/>. Retrieved 9 November 2022.
- 760 81. Halloum I, Viljoen A, Khanna V, Craig D, Bouchier C, Brosch R, Coxon G, Kremer L. 2017.
761 Resistance to Thiacetazone Derivatives Active against *Mycobacterium abscessus* Involves Mutations
762 in the MmpL5 Transcriptional Repressor MAB_4384. *Antimicrob Agents Chemother* 61:e02509-16.
- 763 82. Le Run E, Arthur M, Mainardi J-L. 2018. In Vitro and Intracellular Activity of Imipenem
764 Combined with Rifabutin and Avibactam against *Mycobacterium abscessus*. *Antimicrob Agents*
765 *Chemother* 62:e00623-18.
- 766 83. Bakala N’Goma JC, Le Moigne V, Soismier N, Laencina L, Le Chevalier F, Roux A-L, Poncin I,
767 Serveau-Avesque C, Rottman M, Gaillard J-L, Etienne G, Brosch R, Herrmann J-L, Canaan S, Girard-
768 Misguich F. 2015. *Mycobacterium abscessus* phospholipase C expression is induced during coculture
769 within amoebae and enhances *M. abscessus* virulence in mice. *Infect Immun* 83:780–791.
- 770 84. Le Moigne V, Blouquit-Laye S, Desquesnes A, Girard-Misguich F, Herrmann J-L. 2022.
771 Liposomal amikacin and *Mycobacterium abscessus*: intimate interactions inside eukaryotic cells. *J*
772 *Antimicrob Chemother* dkac348.

774 **Figure 1. Analysis of Lsr2 regulon in *M. abscessus* morphotypes.** **A.** Volcano plots showing
775 differentially expressed genes (DEG) (red) in Mabs-S- Δ lsr2 vs Mabs-S-WT (left) and Mabs-
776 R- Δ lsr2 vs Mabs-R-WT (right). Genes exhibiting a greater than 2-FoldChange in expression
777 between two conditions ($\text{Log}_2 \text{FoldChange} \leq -1$ or ≥ 1) and with a false discovery rate (FDR) of
778 less than 0.05 are considered significantly deregulated. Genes with $\text{Log}_2 \text{FC} \geq 1$ correspond to
779 down-regulated genes by Lsr2 (repressed genes) and genes with $\text{Log}_2 \text{FC} \leq -1$ correspond to up-
780 regulated genes by Lsr2 (activated genes). **B.** Plot representation showing all genes regulated
781 by Lsr2 at least in one of the two morphotypes of *M. abscessus* with a $\text{Log}_2 \text{FC} \geq 1$ and $\text{Log}_2 \text{FC}$
782 ≤ -1 of gene expression between the Δ lsr2 mutant strains and wild-type strains. **C.** GO
783 enrichment analysis was performed with the topGO R package. Enriched GOs (Biological
784 Process in blue and Molecular Function in red) are sorted according to their enrichment factor
785 (EF), corresponding to the ratio of significant DEGs assigned to the GO over expected assigned
786 DEGs to the GO as defined by topGO. Enriched GOs are represented by circles whose size is
787 proportional to the amount of significant DEGs assigned. Positive statistical tests are given that
788 face each GO.

789 **Figure 2. Lsr2 regulated genes involved in different pathways in *M. abscessus*.** **A** and **B.**
790 Heat maps representing genes regulated by Lsr2 and implicated in various cellular mechanisms
791 (intracellular survival and growth, virulence and pathogenicity, glycopeptidolipids
792 biosynthesis, transport, antimicrobial resistance genes and central carbon metabolism) in
793 Mabs-S and Mabs-R. The color scale represents differentially expressed genes (DEGs) with a
794 $\text{Log}_2 \text{FC}$ ranging from -8 and 8. Genes with $\text{Log}_2 \text{FC} \geq 1$ correspond to down-regulated genes by
795 Lsr2 (repressed genes) while genes with $\text{Log}_2 \text{FC} \leq -1$ correspond to up-regulated genes by Lsr2
796 (activated genes).

797 **Figure 3. Conservation of Lsr2 regulatory effect on transport genes in both planktonic**
798 **growth and intracellular growth conditions.** Quantification of relative expression of *mmpL8*

799 and *MAB_2037* measured by RT-qPCR under planktonic growth conditions (left side) and
800 intracellular growth conditions (right side) in Mabs-S-WT (red), Mabs-S- Δ *lsr2* (orange),
801 Mabs-S- Δ *lsr2-Clsr2* (brown), Mabs-R-WT (blue), Mabs-R- Δ *lsr2* (light blue) and Mabs-R-
802 Δ *lsr2-Clsr2* (dark blue). *SigA* transcript levels were used for normalization. For each assay, n=
803 3 and error bars are SEM. *** $P < 0.001$, and **** $P < 0.0001$ (Student's *t* test)

804 **Figure 4. Enhanced sensitivity to aminoglycosides and macrolides due to diminished**
805 **transcriptional expression of antimicrobial resistance genes in Mabs-S- Δ *lsr2* and Mabs-**
806 **R- Δ *lsr2* strains. A.** Quantification of relative expression of antimicrobial resistance genes;
807 *eis2*, *MAB_1409c*, *MAB_2355c* and *erm41* by RT-qPCR under planktonic growth conditions
808 (upper side) and intracellular growth conditions (lower side) in Mabs-S-WT (red), Mabs-S-
809 Δ *lsr2* (orange), Mabs-S- Δ *lsr2-Clsr2* (brown), Mabs-R-WT (blue), Mabs-R- Δ *lsr2* (light blue)
810 and Mabs-R- Δ *lsr2-Clsr2* (dark blue). *SigA* transcript levels were used for normalization. For
811 each assay, n= 3 and error bars are SEM. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, and **** $P <$
812 0.0001 (Student's *t* test). **B.** Intracellular growth of *M. abscessus* strains: Mabs-S-WT (red),
813 Mabs-S- Δ *lsr2* (orange), Mabs-R-WT (blue), and Mabs-R- Δ *lsr2* (light blue), following
814 antibiotic treatments. Murine J774.2 macrophages were infected with mycobacteria at an MOI
815 of 10 and subsequently treated with 1X CMI liposomal amikacin or 1X CMI clarithromycin.
816 Intracellular growth post-antibiotic treatment was assessed by counting CFUs at various time
817 points after treatment (days 0, 1, 3, and 6). The data are representative of three independent
818 experiments and are presented as means \pm SEM. Differences between means were analyzed by
819 two-way ANOVA and the Tukey post-test, allowing multiple comparisons. ns, non-significant,
820 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, and **** $P < 0.0001$.

821 **Figure 5. Modalities of Lsr2 binding on the *M. abscessus* genome. A.** Global distribution of
822 Lsr2 on the genomes of Mabs-S and Mabs-R morphotypes analyzed by ChIP-seq. **B.**
823 Distribution of Lsr2 is strongly correlated with enhanced AT content as exemplified for

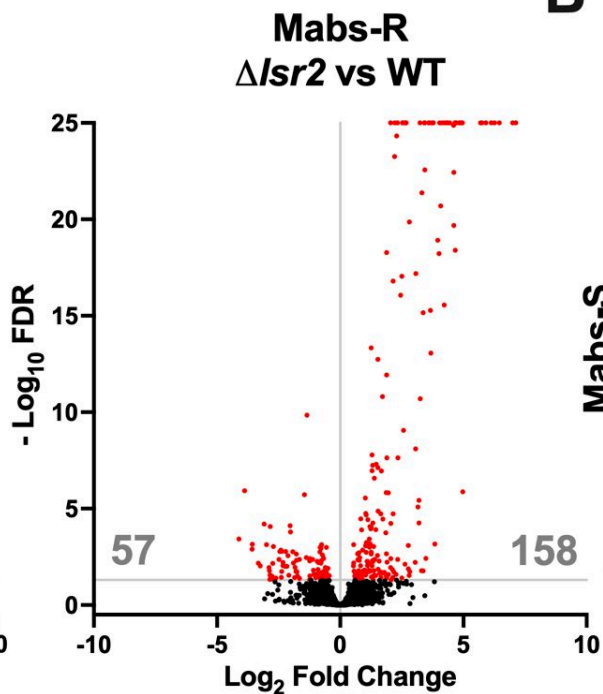
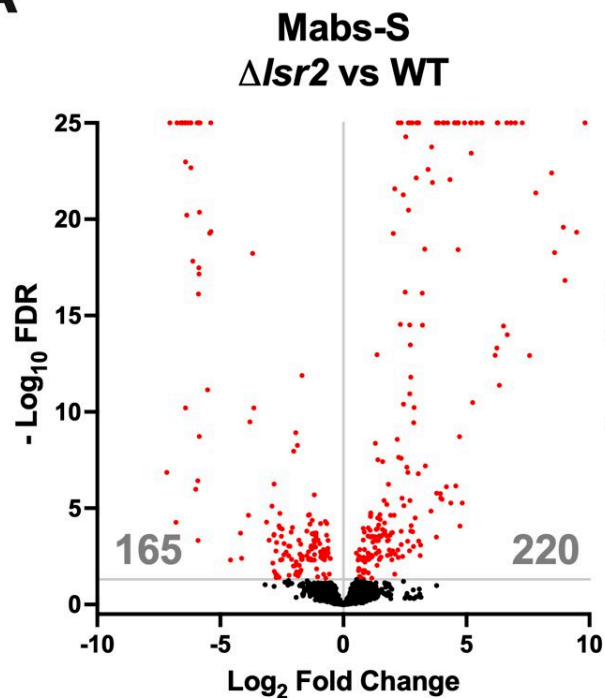
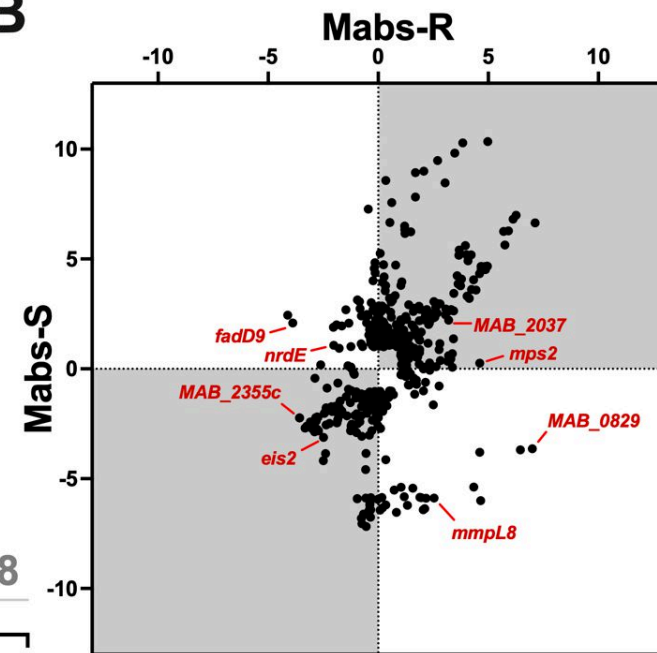
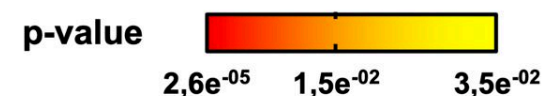
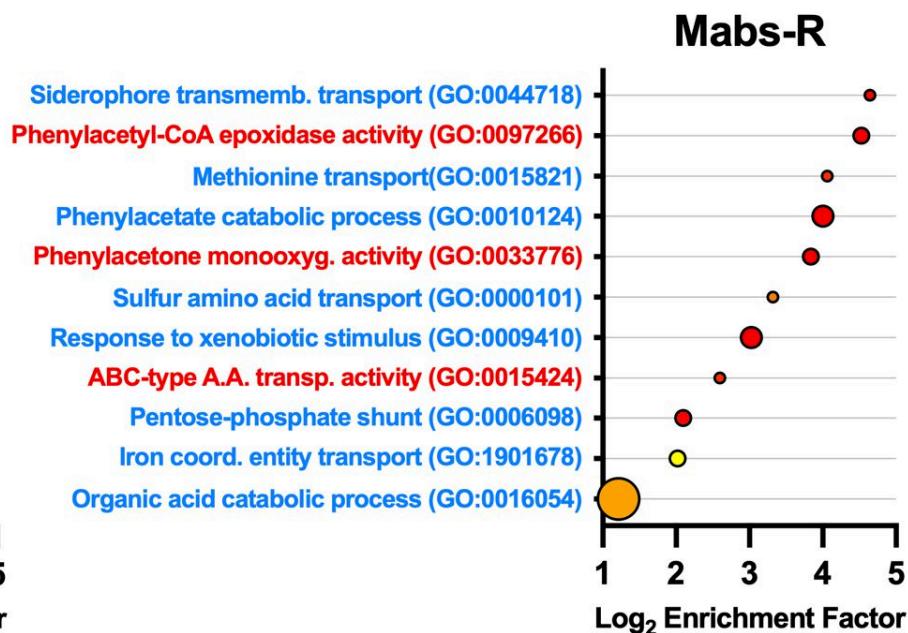
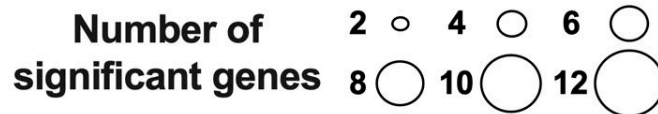
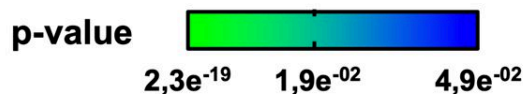
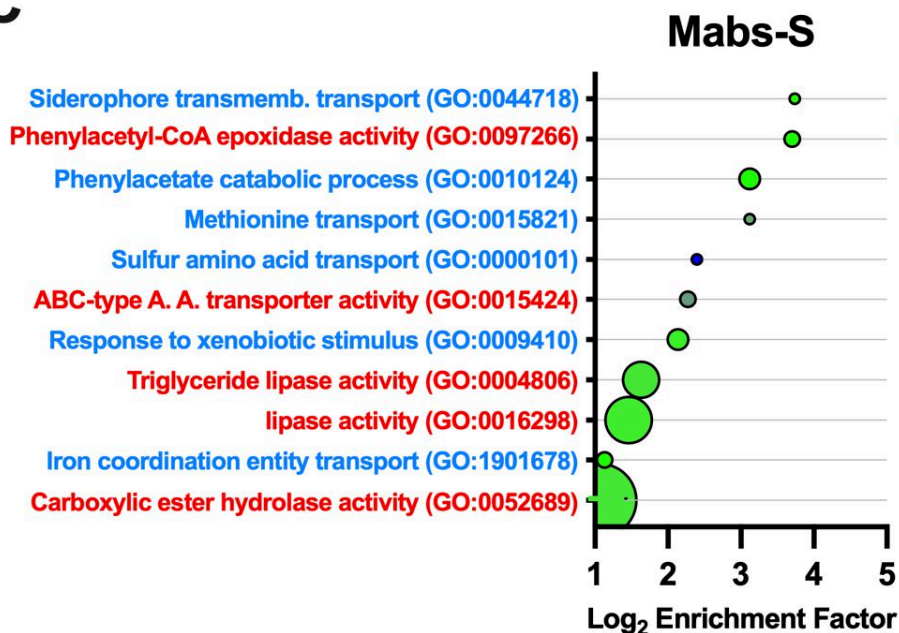
824 genomic regions encompassing genes from *MAB_0827* to *MAB_0842* and from *MAB_4463* to
825 *MAB_4467*. The bottom part corresponds to gene positions. C. Box plots showing the
826 distribution of the lengths of binding regions of Lsr2 in the Mabs-S and Mabs-R morphotypes
827 (with mean indicated as a « + »). D. Box plots summarizing the preference of Lsr2 to bind to
828 AT-rich regions of the *M. abscessus* Mabs-S and Mabs-R genome. E. Histogram representing
829 the percentage of Lsr2 within genomics features of operons (promoters, CDS or promoters with
830 CDS).

831 **Figure 6. Integrative analysis RNA-seq/ChIP-seq.** A. Venn diagram showing the number of
832 direct target genes of Lsr2, the number of genes regulated by Lsr2 without binding and the
833 number of genes bound by Lsr2 without regulatory effect in Mabs-S and Mabs-R. The numbers
834 in the smallest circles show the number of regulated genes in the same operons as the direct
835 targets. B. Histogram representing the percentage of direct target genes of Lsr2 in the categories
836 of metabolism, transport, genetic information processing and antimicrobial resistance genes.
837 The number of genes bound by Lsr2 and the total number of genes annotated in the KEGG
838 database are also indicated on each histogram. C. Violin plots comparing Log₂FC of all genes
839 regulated by Lsr2 to Log₂FC of direct target genes in Mabs-S and Mabs-R. D. Box plots
840 comparing Log₂FC of all genes regulated by Lsr2 to Log₂FC of direct target genes belonging
841 to two domain size categories formed by Lsr2 less than 1 Kb and greater than 1 Kb. Differences
842 between means were analyzed by ordinary one-way ANOVA. ns, non-significant and *****P* <
843 0.0001.

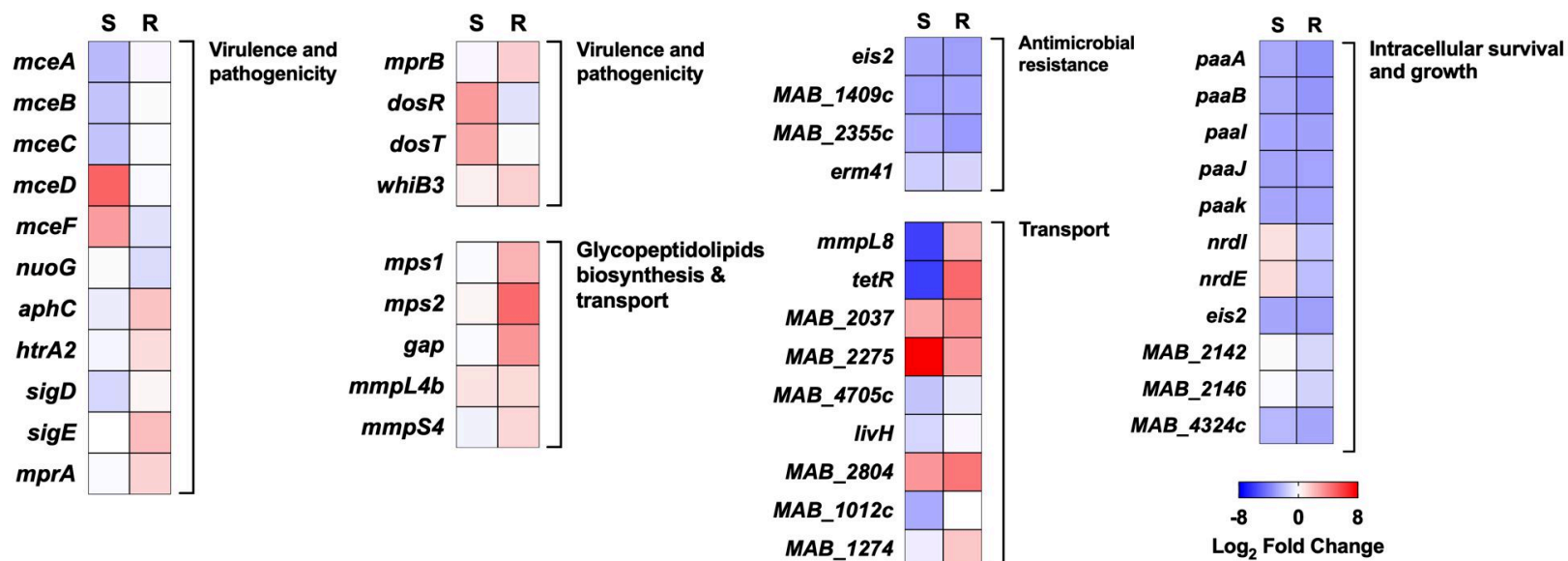
844 **Table 1: Increased sensitivity of *lsr2* mutant strains to aminoglycoside and macrolide**
 845 **antibiotics.** Antibiotic susceptibility profiles (MICs) of *M. abscessus* wild-type (WT) and
 846 mutant (Δ *lsr2*) strains (μ g/mL) after 3 to 5 days of incubation.

Antimicrobial agent		MIC (μ g/mL) for			
		Mabs-S-WT	Mabs-S- Δ <i>lsr2</i>	Mabs-R-WT	Mabs-R- Δ <i>lsr2</i>
Aminoglycosides	Amikacin	9	4.5	15.5	8
	Tobramycin	9.5	4.5	11	5.5
Macrolides	Clarithromycin	0.5	0.5	0.5	0.125

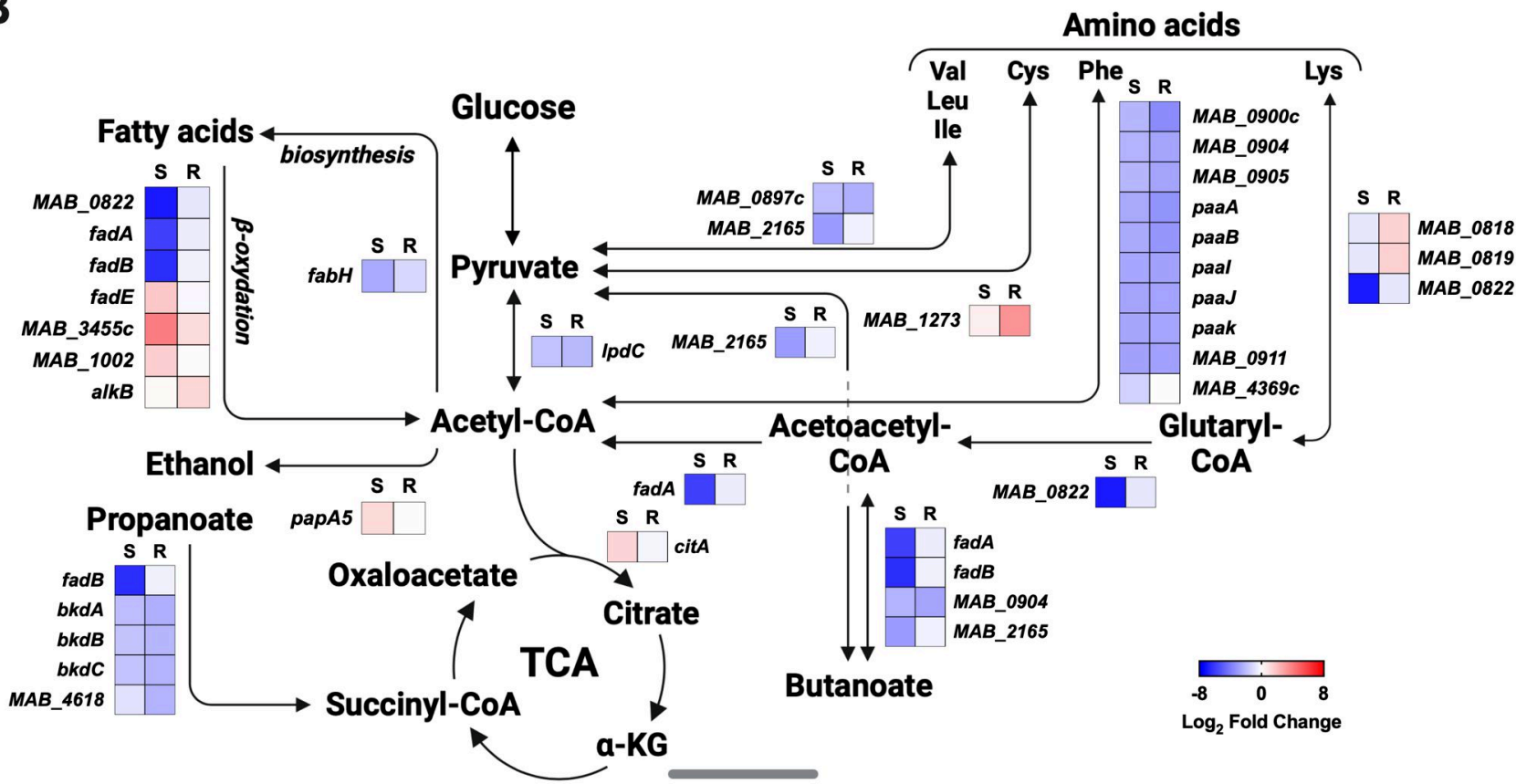
847

A**B****C**

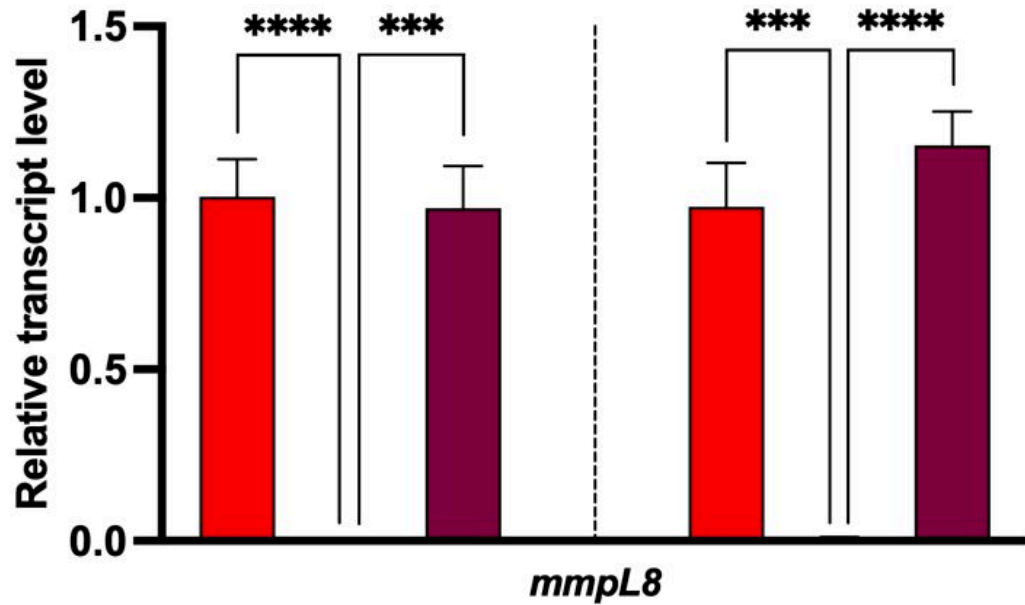
A



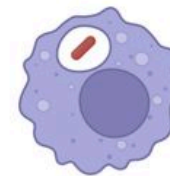
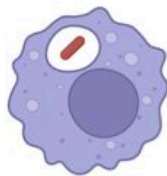
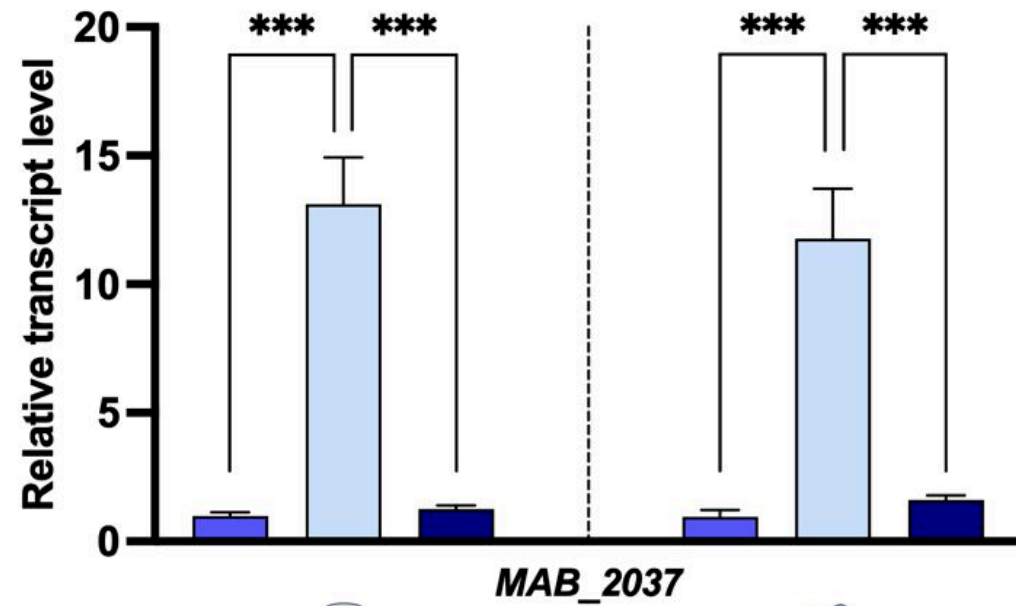
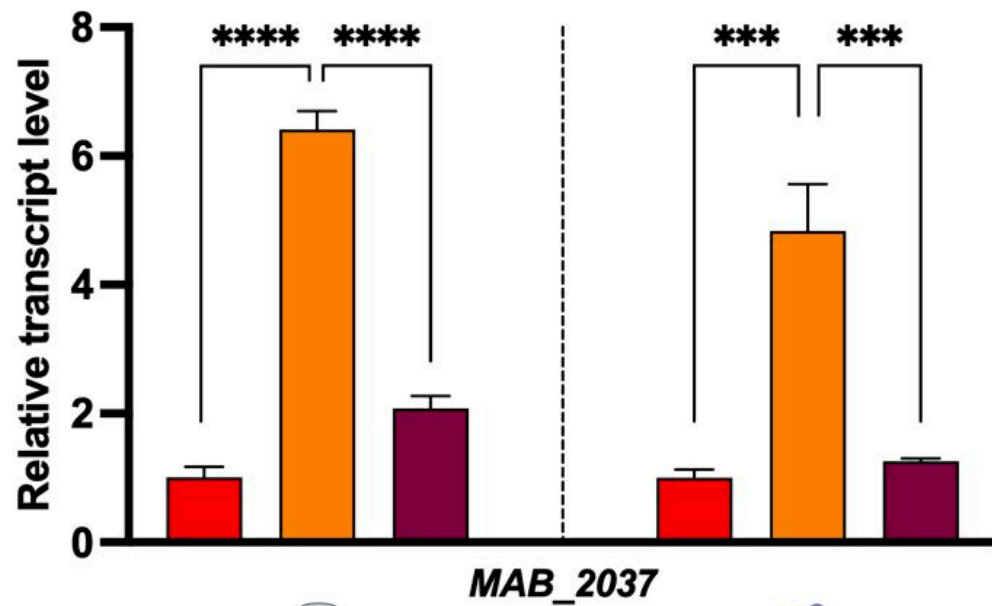
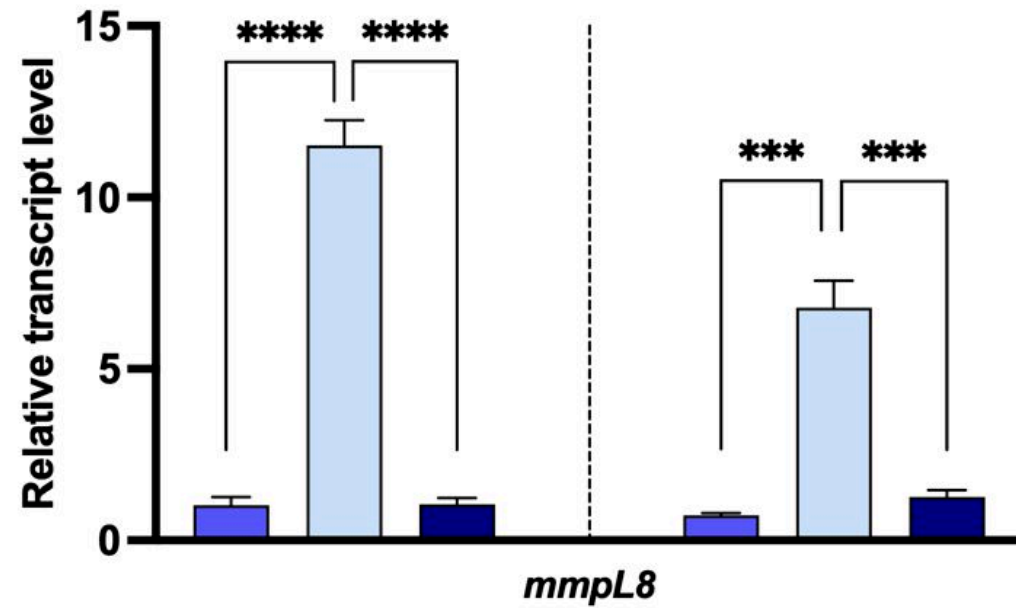
B

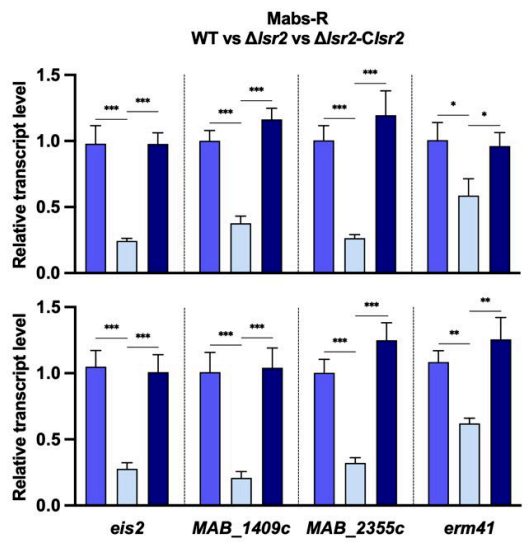
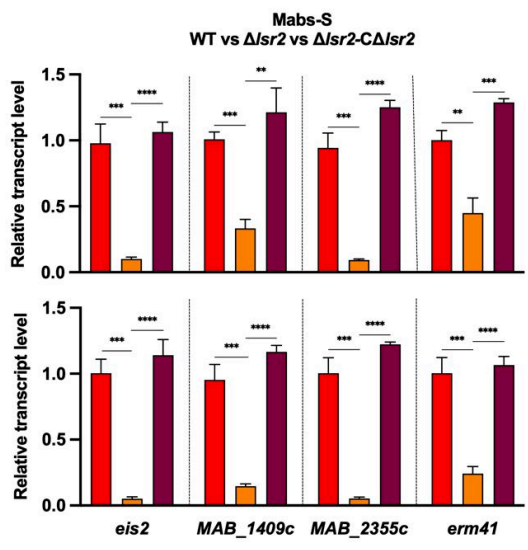
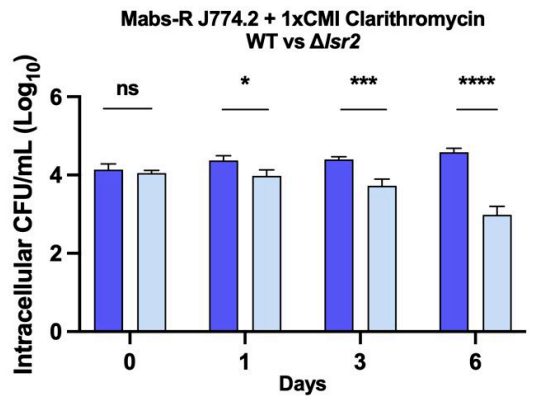
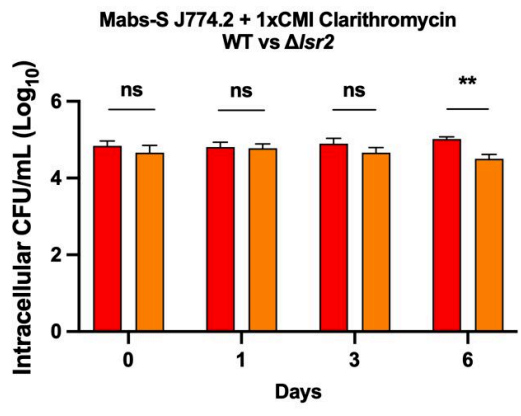
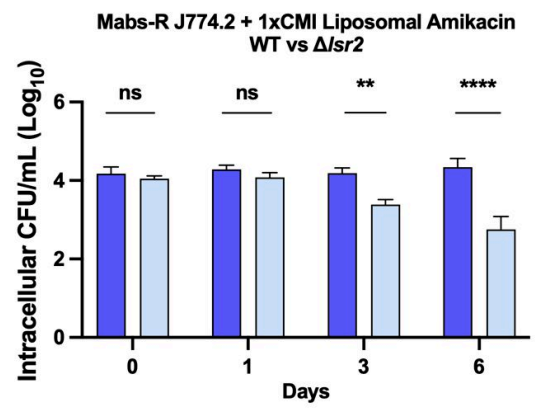
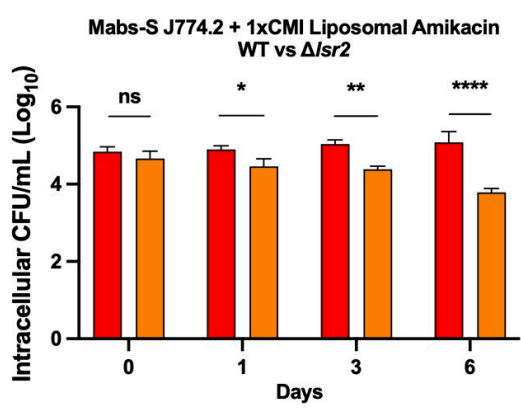


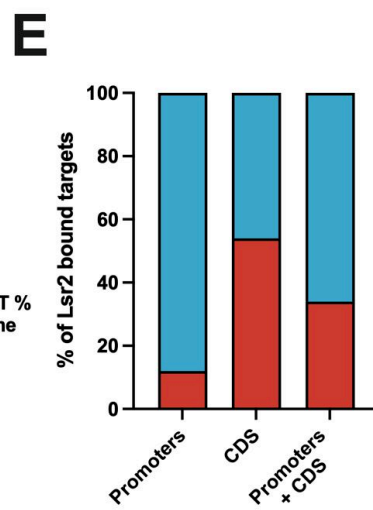
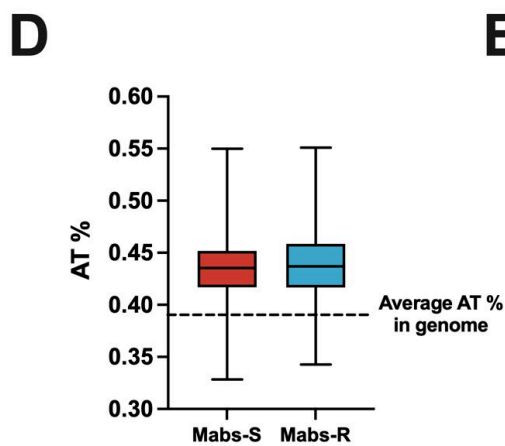
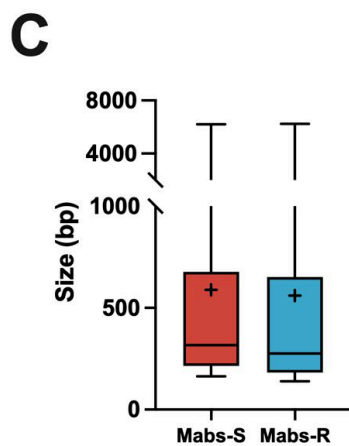
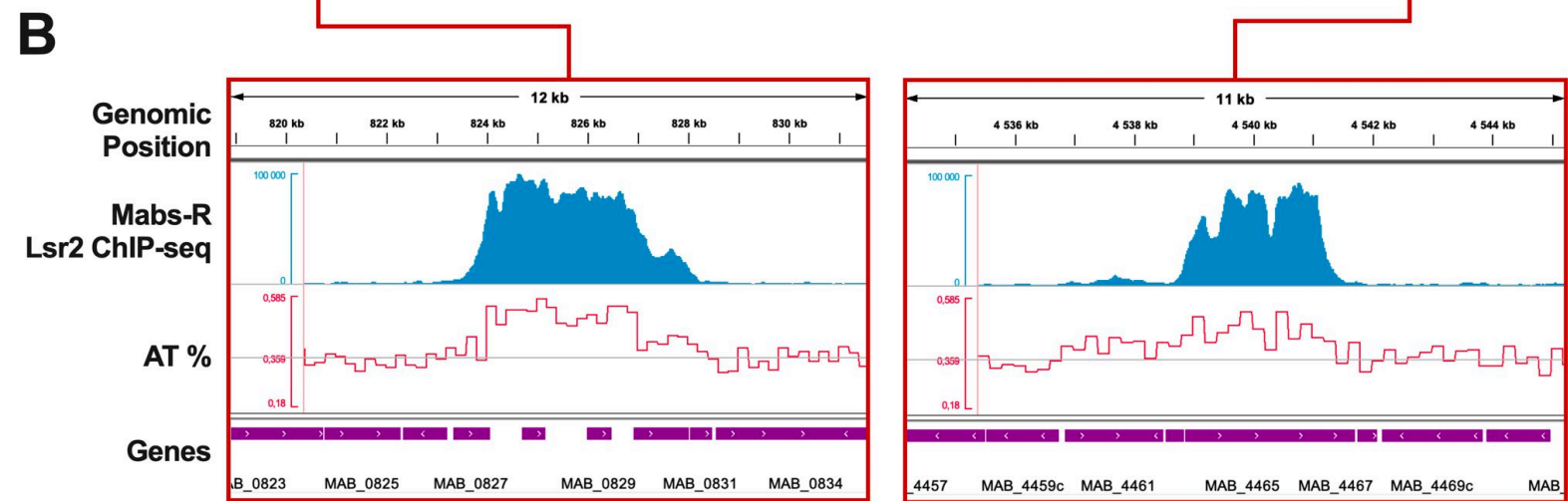
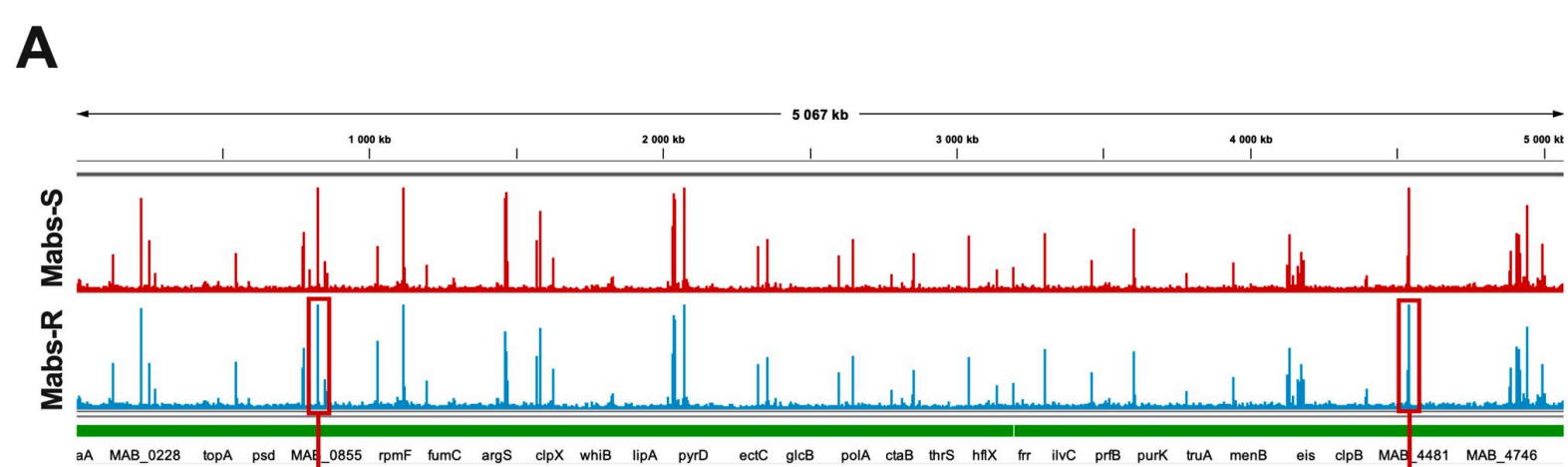
Mabs-S
WT vs $\Delta lsr2$ vs $\Delta lsr2-Clsr2$

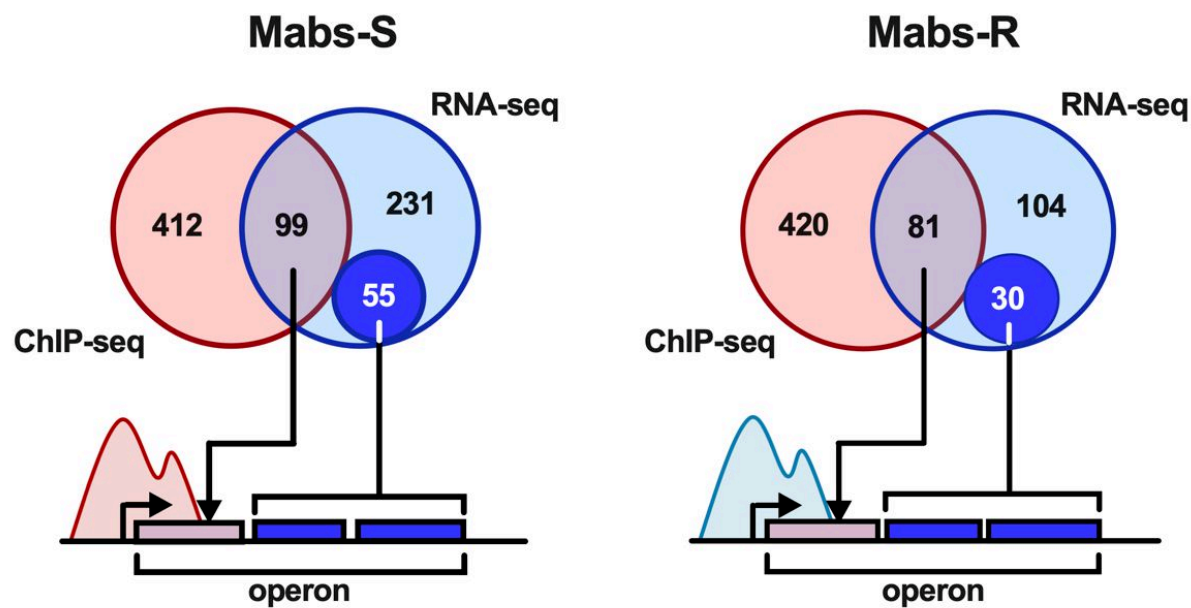
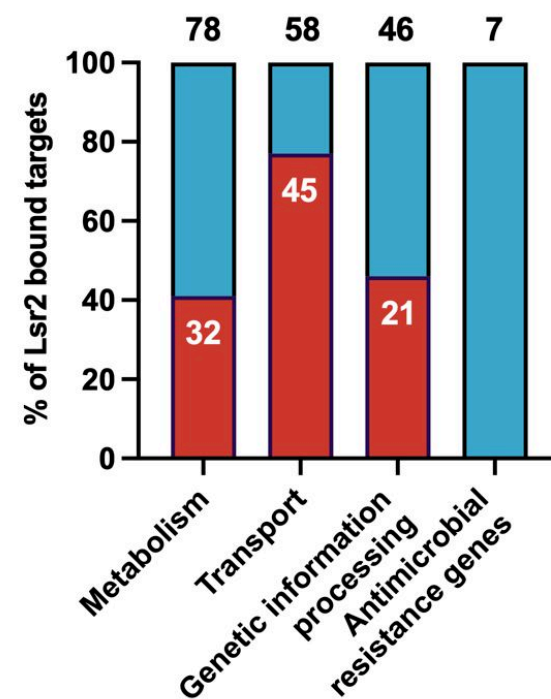
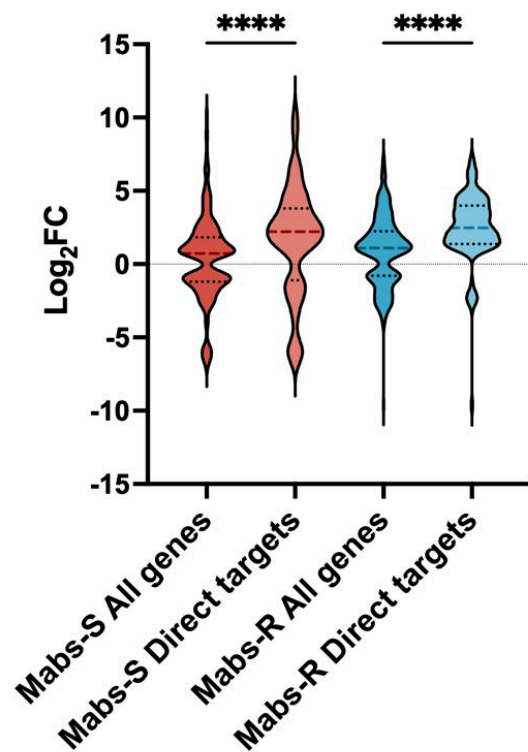
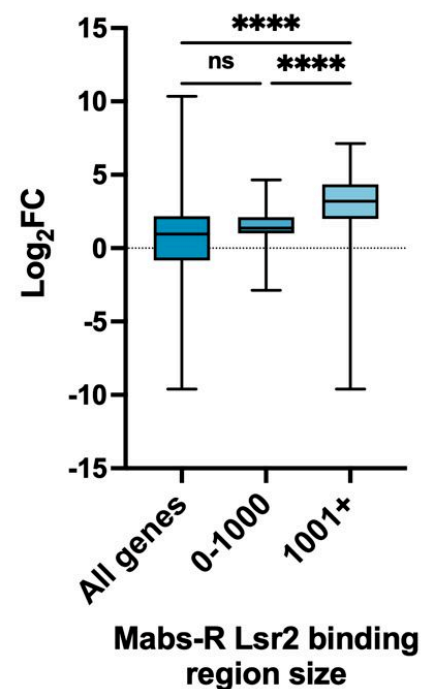
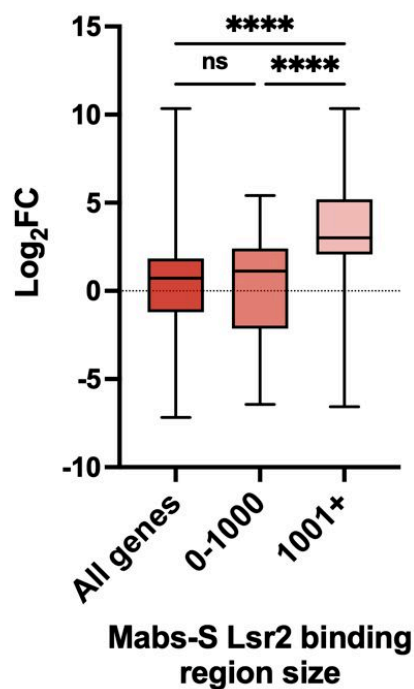


Mabs-R
WT vs $\Delta lsr2$ vs $\Delta lsr2-Clsr2$



A**B**



A**B****C****D**

Supplementary data:

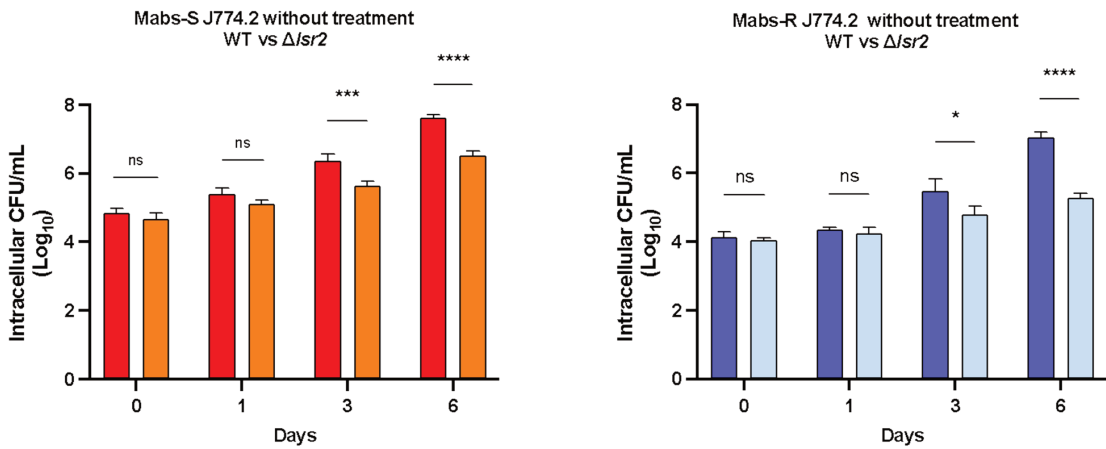


Figure S1: Intracellular growth of *M. abscessus* Mabs-S and Mabs-R wild-type and *Isr2* mutant strains in macrophages as control without antibiotics treatment. Murine J774.2 macrophages were infected with Mabs-S-WT (red), Mabs-S- Δ *Isr2* (orange), Mabs-R-WT (blue) and Mabs-R- Δ *Isr2* (light blue) at an MOI of 10. Intracellular growth was evaluated by counting CFUs at various time points post-infection (days 0, 1, 3, and 6). Data are representative of three independent experiments and represent means \pm SEM. Differences between means were analyzed by two-way ANOVA and the Tukey post-test, allowing multiple comparisons. ns, non-significant, * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$, and **** $P < 0.0001$.

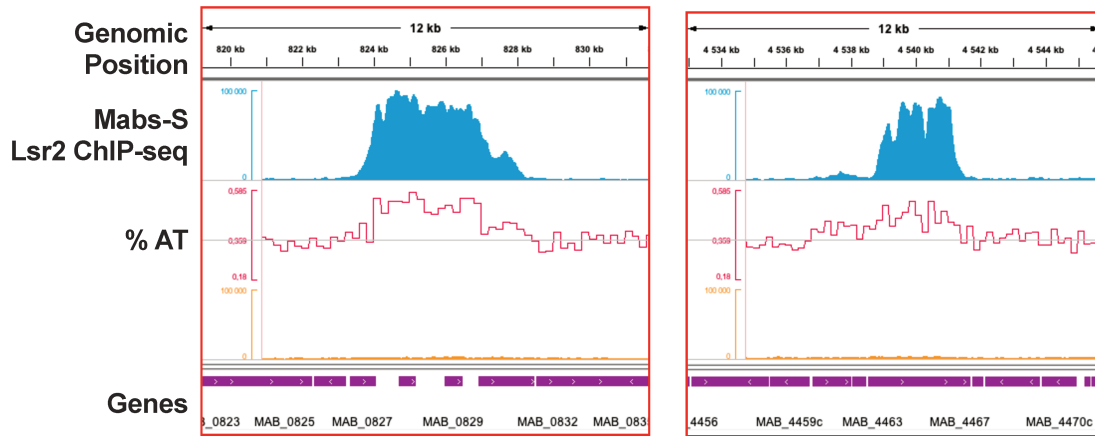


Figure S2: Lsr2 binds specifically on AT-rich sequences of the *M. abscessus* genome. Distribution of Lsr2 (in blue) is strongly correlated with enhanced AT content as exemplified for genomic regions encompassing genes from *MAB_0827* to *MAB_0842* and from *MAB_4463* to *MAB_4467*. Raw sequencing coverage from Input sample is also pictured in orange as a control for Lsr2 binding specificity. The bottom part corresponds to gene positions.

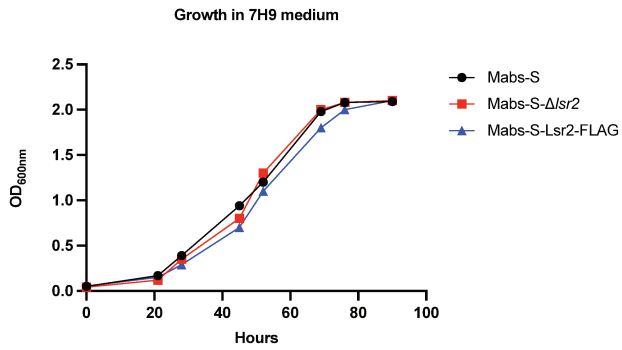
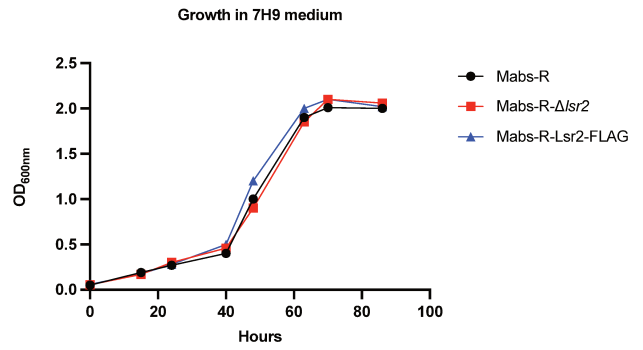
A**B**

Figure S3: (A) Growth curve showing the absence of a growth defect in Mabs-S- Δ /sr2 and Mabs-S-Lsr2-FLAG strains as compared to Mabs-S. **(B)** Growth curve showing the absence of a growth defect in Mabs-R- Δ /sr2 and Mabs-R-Lsr2-FLAG strains as compared to Mabs-R.

Table S1. Primers used in this study

Name	Sequence
<i>5'_Homology_Lsr2_region_Fwd</i>	5'-aatgtatccgctcgttgtcagaag-3'
<i>5'_Homology_Lsr2_region_Rev</i>	5'-tcctttttccttccaaaagcg-3'
<i>Lsr2-3XFLAG-zeocin_Fwd</i>	5'- atggctaagaagggtcacgg-3'
<i>Lsr2-3XFLAG-zeocin_Rev</i>	5'-ggctctgacgctcagtggaac-3'
<i>3'_Homology_Lsr2_region_Fwd</i>	5'-tacgtcccgggacaatttc-3'
<i>3'_Homology_Lsr2_region_Rev</i>	5'-ctcgaaatcaccgcggtag-3'
<i>SigA_Fwd</i>	5'-tccgagaaagacaaggcttc-3'
<i>SigA_Rev</i>	5'-ccagctcgacttctcttcg-3'
<i>MAB_2355c_Fwd</i>	5'-atgcaaactcggaacta-3'
<i>MAB_2355c_Rev</i>	5'-tctgccggtacatcaacacc-3'
<i>erm41_Fwd</i>	5'-ggaagatgtccggatagcgg-3'
<i>erm41_Rev</i>	5'-gtatcagtgcgctggtgact-3'
<i>eis2_Fwd</i>	5'-gtgtgtgagcgatgcgac-3'
<i>eis2_Rev</i>	5'-cggaagaaagtctcgggtca-3'
<i>MAB_1409c_Fwd</i>	5'-gtcgatcttctccgacgtcc-3'
<i>MAB_1409c_Rev</i>	5'-gtcatcgcaaggatcgggat-3'
<i>lsr2_Fwd</i>	5'-gagaccgtgaattcggtg-3'
<i>lsr2_Rev</i>	5'-gctgattacgcagcttctcc-3'
<i>MmpL8_Fwd</i>	5'-ctcgaatcagaccctgacgttcat-3'
<i>MmpL8_Rev</i>	5'-tgcccaacttggtgaatcccat-3'
<i>MAB_2037_Fwd</i>	5'-gcagacacgcatggcattaagt-3'
<i>MAB_2037_Rev</i>	5'-gaaaccgtagagcgacctgaaagt-3'

Table S2. Differentially expressed genes between Mabs-S and Mabs-R morphotypes of *M. abscessus*

Genes	Mab-S vs Mabs-R		Functions of encoded proteins
	Log ₂ FC	Adj. p-value	
<i>mps1</i>	-1.724	3.06E-03	Glycopeptidolipid biosynthesis protein
<i>mps2</i>	-3.881	6.15E-15	Glycopeptidolipid biosynthesis protein
<i>gap</i>	-2.633	4.79E-06	Integral membrane protein
<i>MAB_2552c</i>	-1.546	3.51E-15	Lipid transport and metabolism protein
<i>MAB_4272c</i>	2.477	0.005783288	Molecular chaperone GrpE (HSP-70 cofactor) protein
<i>MAB_4273c</i>	2.462	0.004734461	Molecular chaperone DnaK (HSP-70) protein
<i>MAB_1242c</i>	2.121	0.000254187	Hypothetical protein
<i>MAB_1243c</i>	1.875	0.005783288	Hypothetical protein
<i>MAB_1247c</i>	2.381	0.026330185	Hypothetical protein
<i>nrdF</i>	2.031	0.026330185	Nucleotide transport and metabolism protein
<i>nrdE</i>	1.894	0.005783288	Nucleotide transport and metabolism
<i>nrdI</i>	1.851	0.026330185	Nucleotide transport and metabolism
<i>nrdH</i>	1.677	0.034602339	Posttranslational modification protein

Table S3. Regulation of *mmpL8*_{MAB} locus by Lsr2 in Mabs-S and Mabs-R morphotypes of *M. abscessus*

<i>mmpL8</i> _{MAB} locus (genes)	Mabs-S Δ lsr2 vs WT		Mabs-S Δ lsr2 vs WT	
	Log ₂ FC	Adj. p-value	Log ₂ FC	Adj. p-value
<i>papA2</i>	-6.362	6.08E-21	2.117	1.46E-02
<i>lipP</i>	-6.412	1.07E-23	2.046	1.15E-02
<i>MAB_0854</i>	-5.868	3.29E-18	1.949	2.60E-02
<i>mmpL8</i>	-5.886	7.64E-17	2.174	1.89E-02
<i>tetR</i>	-6.002	1.04E-06	4.656	2.27E-36
<i>MAB_0857</i>	-5.381	4.42E-20	4.342	2.25E-34
<i>MAB_0858</i>	-6.21	6.15E-50	1.323	5.60E-03
<i>MAB_0859</i>	-5.393	1.83E-27	1.041	1.76E-05

Partie II : Analyse de la conformation 3D du génome de *M. abscessus* par Hi-C et 3C-qPCR

1. Étude de la structure 3D du chromosome des morphotypes Mabs-S et Mabs-R par Hi-C

Le troisième objectif de ma thèse a consisté en une exploration de la conformation 3D du chromosome des morphotypes S et R de *M. abscessus* en utilisant la méthode Hi-C, tout en cherchant à appréhender le rôle de Lsr2 dans son organisation. Si la méthode Hi-C a été utilisée pour révéler la structure 3D du chromosome d'un nombre grandissant d'espèces bactériennes, telles que *B. subtilis* (Marbouty *et al.*, 2015), *E. coli* (Lioy *et al.*, 2018) et *B. melitenses* (Huang *et al.*, 2023), elle n'a pas encore jamais été appliquée à une mycobactérie. Notre objectif est donc d'étudier si la transition S/R s'accompagne d'une modification de la conformation 3D du chromosome, notamment l'identification de domaines topologiques tels que les CIDs. De plus, étant donné le rôle suggéré de Lsr2 dans l'organisation du génome, nous souhaitons évaluer la plasticité de l'organisation globale des chromosomes après avoir délété *lsr2*.

Durant ma thèse, je me suis particulièrement consacré à l'implémentation de la méthode de Hi-C chez *M. abscessus*, en m'inspirant d'un protocole Hi-C dédié à l'étude du chromosome bactérien (Crémazy *et al.*, 2018). Les différentes étapes de la méthode sont résumés ci-dessous (**Figure 31 ; étapes 1-8**) :

(1) Les bactéries sont d'abord fixées avec du formaldéhyde, puis la membrane cellulaire est lysée pour libérer l'ADN. Les protocoles Hi-C existants utilisent généralement une lyse enzymatique (par la lysozyme) (Marbouty *et al.*, 2014), ce qui s'est relevé inadapté à cause de la membrane complexe et très résistante des mycobactéries. Par conséquent, nous avons remplacé la lyse enzymatique par une lyse mécanique. Ensuite, le génome de *M. abscessus* est digéré par l'enzyme de restriction SalI (site de restriction : 5'-G[^]TCGAC-3'). Le choix de l'enzyme dans la méthode Hi-C dépend du nombre de fragments d'ADN générés par cette dernière et qui conditionne fortement la résolution finale des matrices de contacts obtenues (Cockram, Thierry and Koszul, 2021). L'enzyme SalI permet de générer jusqu'à 3885 fragments génomiques après digestion du génome de *M. abscessus*, offrant ainsi plus de 15 millions d'interactions potentielles pour une résolution finale de 2-5 kb (**Figure 32**). De plus, *M. abscessus* exprime une endonucléase dépendante du tris(hydroxyméthyl)aminométhane (tris), capable de dégrader l'ADN génomique durant l'étape de lyse (Ripoll *et al.*, 2009). Il

m'a donc fallu adapter le protocole original en remplaçant le tris par de l'acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique associé à du potassium (K-HEPES).

(2) Les extrémités des fragments digérés sont ensuite complétées en utilisant le fragment Kleenow de l'ADN polymérase I en présence des quatre nucléotides, dont un dCTP marqué à l'aide de biotine. Cette étape de marquage de l'ADN (biotinylation) revêt une importance cruciale en Hi-C, car elle permet d'obtenir, après l'étape de la ligation, des fragments marqués avec de la biotine au niveau de la jonction. Ce processus favorise l'enrichissement de la banque NGS en jonctions qui seront capturées lors de l'étape de "pull-down".

(3) Une réaction de ligation, réalisée avec la T4 DNA ligase, est effectuée dans un grand volume pour favoriser les ligations entre les fragments impliqués dans les mêmes complexes nucléoprotéiques et spatialement proches dans le chromosome *in vivo*.

(4) Après réversion de la fixation ADN-protéines par la protéinase K, à haute température, l'échantillon subit un traitement exonucléasique à l'aide de la T4 DNA polymérase. Cette étape vise à digérer les extrémités marquées à la biotine pour lesquelles la ligation n'aurait pas fonctionné.

(5) L'ADN est ensuite fragmenté enzymatiquement, la taille des fragments obtenus dépendant de la durée d'incubation avec la fragmentase.

(6) Le "pull-down" est une étape cruciale visant à isoler spécifiquement les jonctions ligaturées qui ont été marquées avec de la biotine. Cela implique l'utilisation de la streptavidine, une protéine pouvant lier la biotine.

(7) La banque ainsi obtenue est ensuite préparée en vue du séquençage haut-débit.

(8) Enfin, la génération des matrices de contact est réalisée grâce à une analyse bioinformatique des données de séquençage. Cette analyse comprend l'alignement des séquences sur le génome de référence et la sélection des « paires valides » en éliminant les données de faible qualité, les duplicatas de PCR ainsi que les événements de re-ligation ou de non-digestion des fragments. La fréquence d'interaction de deux fragments au sein de ces « paires valides » est ensuite représentée sous forme de matrice de contact.

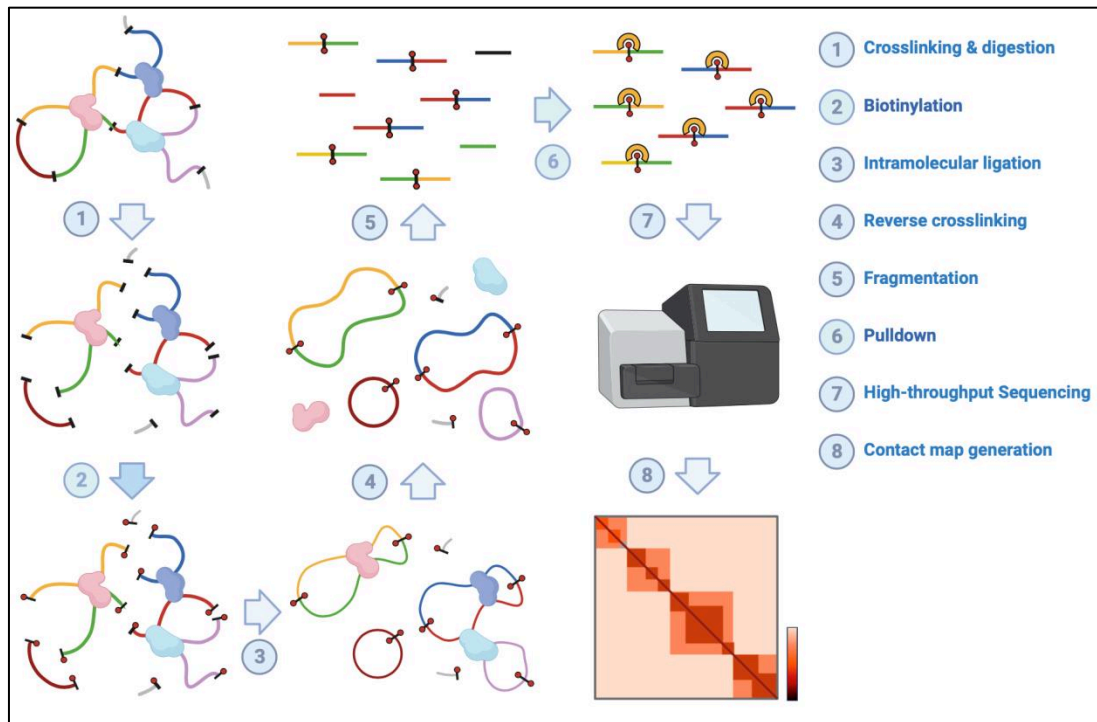


Figure 31 : Vue d'ensemble des étapes du protocole Hi-C (tirée de la revue: Shedding light on bacterial chromosome structure: exploring the significance of 3C-based approaches, en révision, *Meth Mol Biol- Bacterial Chromatin 2nd edition* (Hoareau, Gerges and Crémazy).

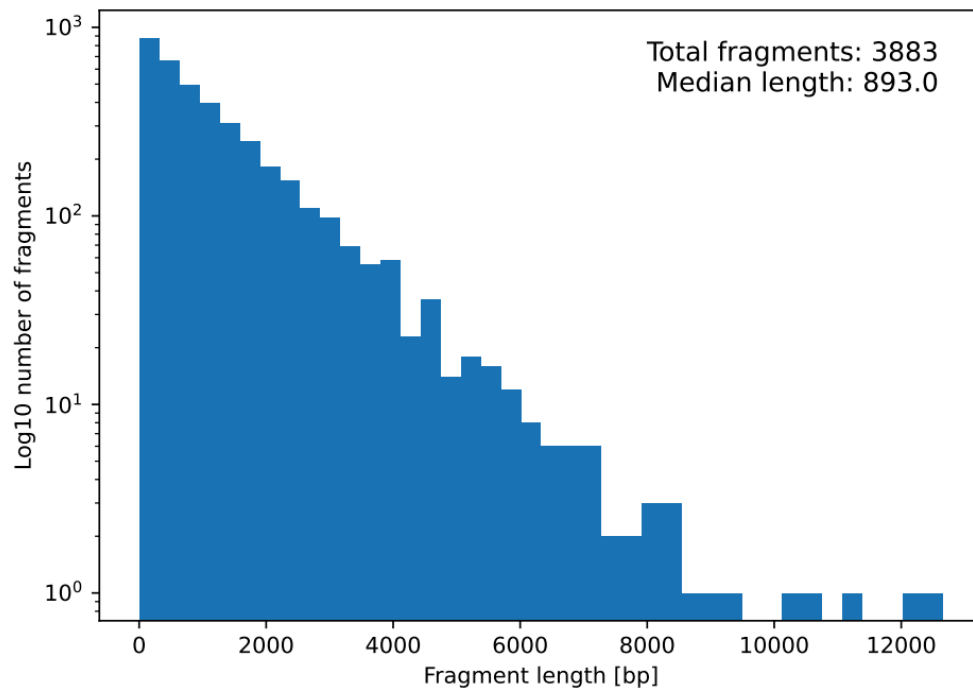


Figure 32 : Distribution des longueurs des fragments de restriction de Sall dans *M. abscessus* (Analyse par *hicstuff* - digest).

Mon travail a initialement porté sur l'implémentation et l'optimisation de la technique au sein du laboratoire. Parmi les optimisations effectuées, j'ai tout d'abord travaillé à l'obtention de chromatine de bonne qualité après lyse cellulaire, ainsi qu'à des réactions de digestion et de ligation réussies. Une analyse type de ces trois étapes effectuée par électrophorèse sur gel est présentée dans la **Figure 33**. Une chromatine de bonne qualité, non dégradée, migre sous la forme d'une bande unique et intense, indiquant la présence d'une molécule d'ADN d'une taille approximative de 20 kb. La digestion de l'ADN produit un motif de migration qui ressemble à une traînée (ou smear), et caractérisée par la perte de la bande à 20 kb. Après ligation, une répartition des fragments aux poids moléculaires plus élevés, similaire à celle de l'ADN génomique non digéré et non dégradé est observée.

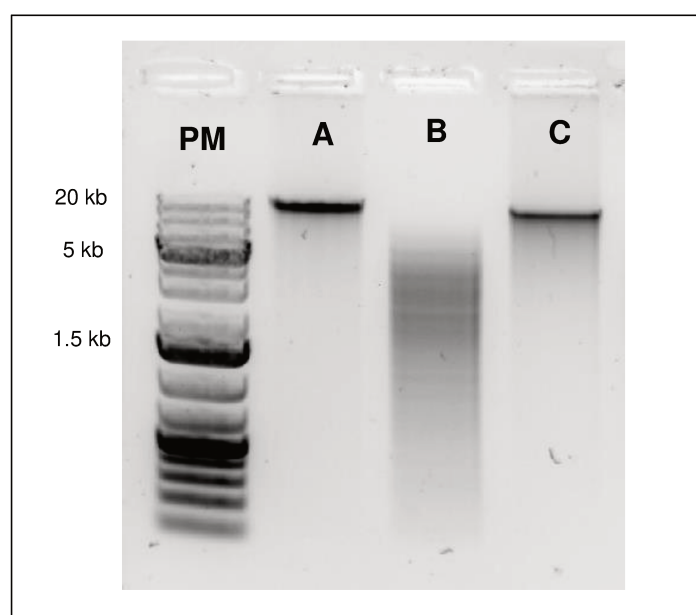


Figure 33 : Vérification de l'intégrité, digestion par Sall et ligation de l'ADN génomique sur gel électrophorèse. (A) : ADN génomique, (B) : ADN digéré par Sall, et (C) : ADN après ligation. PM : poids moléculaire (Generuler 1 kb plus – ThermoFisher).

Les premiers tests Hi-C effectués chez Mabs-S (**Figure 34A**) ont montré un nombre de « paires valides » ("3D intra") très faible (5.4%) par rapport aux événements de non-digestion ("uncuts") (71.55%) et de re-ligation ("loops") (23.03%). L'observation de la matrice de contact obtenue à partir de ces données n'a pas montré pas clairement l'existence de domaines topologiques tels que les CIDs qui sont pourtant une caractéristique conservée chez la majorité des bactéries (**Figure 35A**). Une des raisons de cette observation pourrait être attribuée soit à une mauvaise incorporation de la biotine, ce qui entraînerait un marquage insuffisant des produits de ligation, soit par un lavage insuffisant après l'étape de "pull-

down", qui induirait une présence importante de fragments non désirés ("uncuts" et "loops") (Matthey-Doret *et al.*, 2022). Afin d'améliorer ces deux étapes, j'ai augmenté le temps d'incubation des fragments digérés avec la biotine et ai également réduit la durée du « pull-down », en augmentant le nombre de lavages lors de cette dernière étape. La nouvelle banque Hi-C a montré une qualité supérieure, avec un nombre de « paires valides » environ 4,4 fois plus élevé (23.74%) que précédemment (**Figure 34B**). De nouveau, et malgré cette amélioration, nous n'avons pas obtenu de domaines bien définis (**Figure 35B**). La formation et le maintien des domaines topologiques chez les bactéries ont été corrélés à un niveau d'expression important des gènes présents à leurs frontières (Le *et al.*, 2013) (Le and Laub, 2016). Étant donné que la transcription chez les bactéries atteint généralement un niveau plus élevé au début de la phase de croissance exponentielle, l'utilisation de bactéries cultivées jusqu'à cette étape pourrait se traduire par une délimitation plus claire des CIDs potentiels. J'ai donc généré une nouvelle banque Hi-C (**Figure 34C**) en prélevant les bactéries à une densité optique (DO₆₀₀) de 0.15 au lieu de 0.6. En parallèle, vu que le pourcentage des fragments "uncuts" reste élevé après les trois optimisations effectuées, une possibilité serait que les digestions précédentes n'aient pas été complètes. Par conséquent, j'ai choisi de changer d'enzyme de restriction (**Figure 34D**) en remplaçant l'enzyme SallI par l'enzyme BstYI (site de restriction : 5'-R[^]GATCY-3'). Cette nouvelle enzyme coupe le génome de *M. abscessus* de manière plus fréquente, produisant ainsi 5654 fragments, avec un potentiel d'interactions plus important. Un résumé des optimisations apportées aux étapes du protocole et discutées dans le texte, est rapporté dans le **Tableau 8**.

Tableau 8 : Optimisations des expériences Hi-C

Banque Hi-C	A	B	C	D
Temps de biotinylation	45 min	4 h	4 h	4h
Temps du "pull-down"	1 h	15 min	15 min	15 min
DO₍₆₀₀₎ des bactéries prélevées	0.6	0.6	0.15	0.15
Enzyme de digestion	SallI	SallI	SallI	BstYI
Nombre de lectures séquencées	34 842 151	62 401 344	13 959 635	11 391 067
Nombre de valides paires	1 881 476 (5.4%)	14 814 079 (23.74%)	3 177 212 (22.76%)	2 200 754 (19.32%)

% : pourcentage ; min : minutes ; h : heures

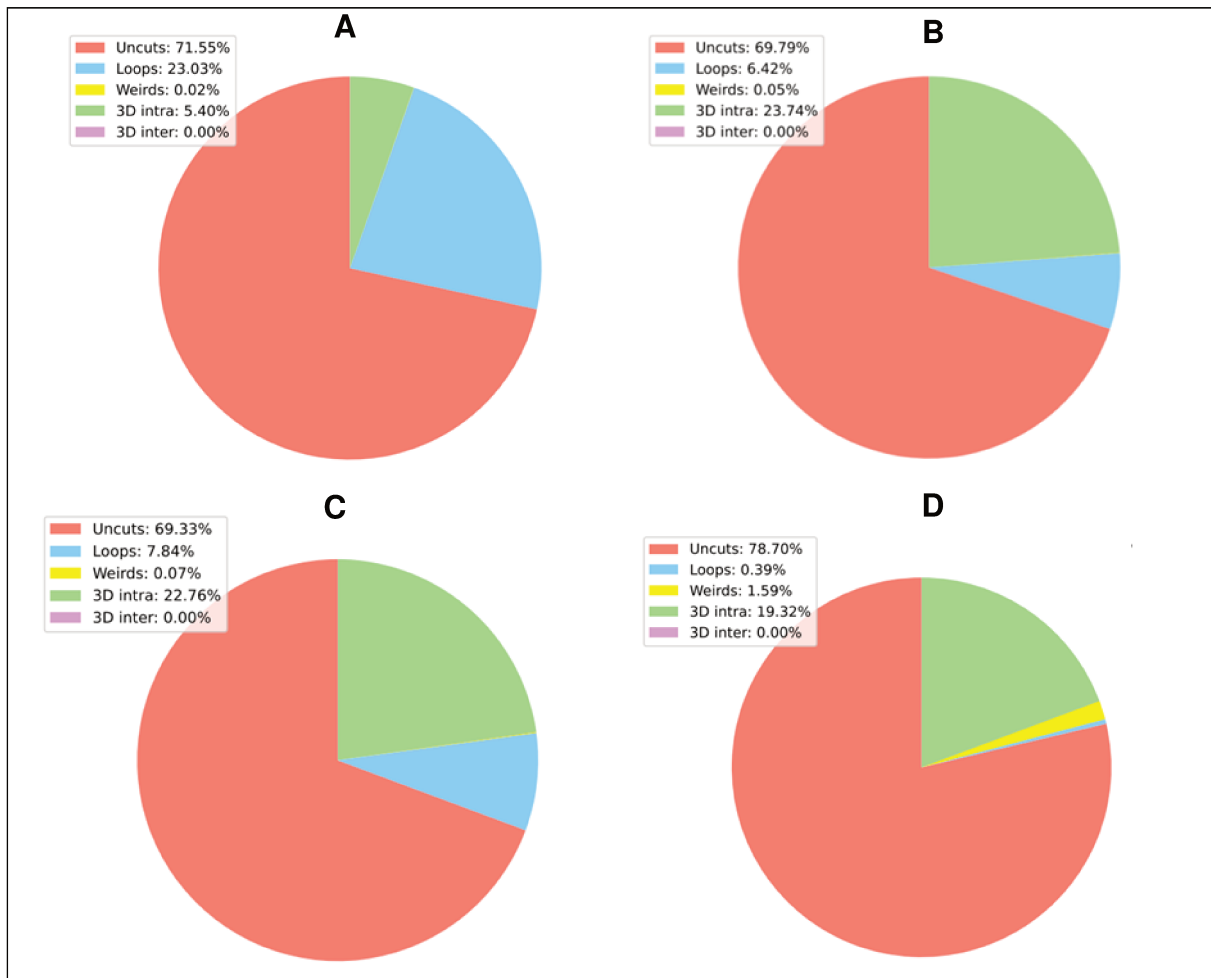
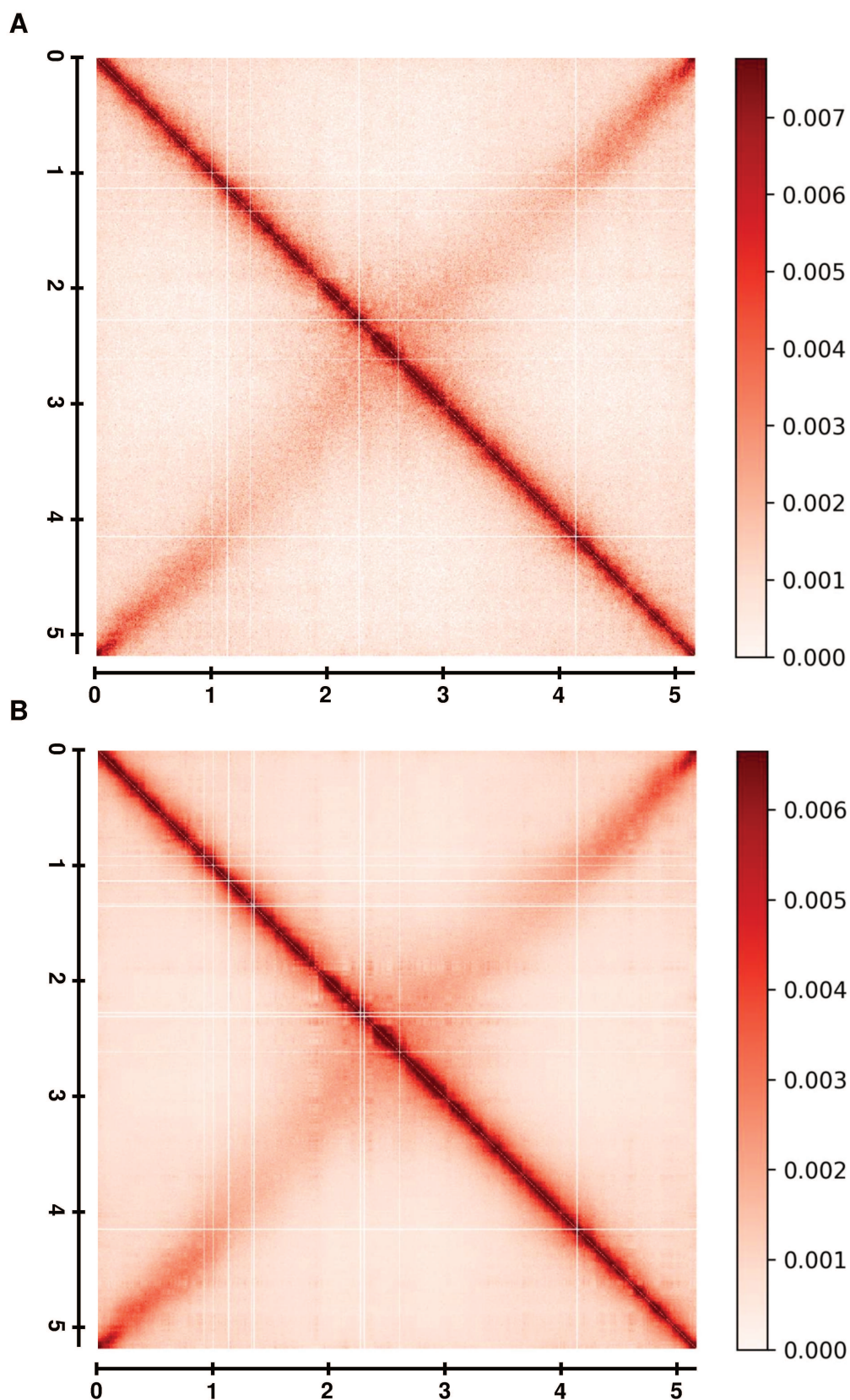


Figure 34 : Rapports de contrôle de qualité des données Hi-C des différentes banques pour Mabs-S, générés par le pipeline *hicstuff*. (A) : Avant toute optimisation du protocole, (B) : Après modification des temps de biotinylation et du "pull-down", (C) : Après prélèvement des bactéries à $DO_{600} : 0.15$ et (D) : Après le remplacement de SalI par BstYI. "Les "uncuts" (ou "dangling-end") se réfèrent aux fragments d'ADN qui n'ont pas été ligués ou marqués avec de la biotine. Les "loops" (ou "self-circles") se réfèrent à des auto-ligations qui se produisent entre des fragments d'ADN situés sur la même molécule d'ADN. Les "weirds" se réfèrent à des paires de lectures ayant la même orientation alignées sur le même fragment de restriction. Le "3D intra" (3D intrachromosomique ou paires valides) se réfère aux contacts physiques significatifs entre deux loci impliquant deux lectures situées sur le même chromosome. Le "3D inter" (3D interchromosomique) se réfère aux paires de lectures impliquant deux chromosomes différents, mais cela ne s'applique pas à *M. abscessus*.

Malheureusement, la génération de matrices de contact à partir des banques Hi-C préparées au début de la phase de croissance exponentielle et à l'aide de l'enzyme BstYI n'ont pas significativement amélioré la visualisation de CIDs par rapport à celle de la deuxième banque Hi-C préparée (**Figure 35C et 35D**).



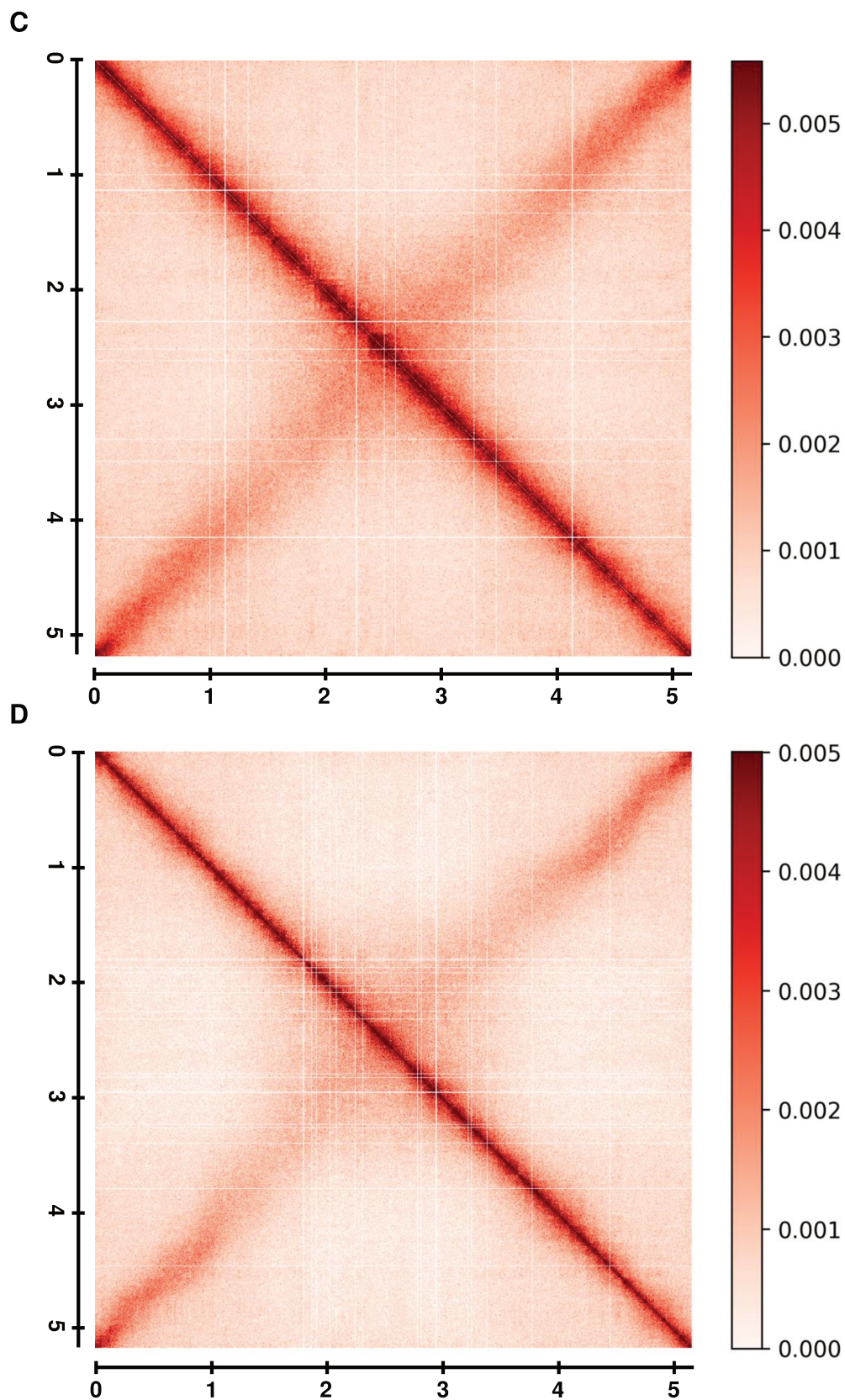


Figure 35 : Matrices de contact Hi-C représentant la structure topologique du chromosome du morphotype S de *M. abscessus*. (A) : banque Hi-C A, (B) : banque Hi-C B, (C) : banque Hi-C C et (D) : banque Hi-C D. La génération des matrices de contact est réalisée par le pipeline *hicstuff*. La fréquence d'interaction entre deux loci du génome est visualisée sous la forme d'une "heat map" (résolution de 5 kb). Les axes x et y correspondent aux coordonnées chromosomiques de *M. abscessus* (en Mb).

L'analyse préliminaire des premières matrices de contact obtenues pour Mabs-S (**Figure 36A**) et Mabs-R (**Figure 36B**), nous ont permis d'extraire deux informations importantes. Tout d'abord, l'apparition de motifs carrés autour de la diagonale principale suggère fortement une compartimentalisation du chromosome de *M. abscessus* sous forme de CIDs. Cependant, nos premières analyses par calcul de l'index de directionnalité n'ont pas permis d'identifier clairement la position et le nombre de domaines topologiques similaires à ceux déjà décrits dans de nombreuses espèces bactériennes. Ensuite, nous observons la présence d'une diagonale secondaire caractéristique des interactions entre des fragments d'ADN situés sur le bras chromosomique opposé. L'apparition de ce motif reflète une disposition longitudinale du chromosome de *M. abscessus*, à l'instar de ce qui a également été démontré pour *C. crescentus* (Le *et al.*, 2013) et pour *B. subtilis* (Marbouty *et al.*, 2015). Ces interactions n'ont pas été observées chez *E. coli* (Lioy *et al.*, 2018), ce qui implique une organisation transversale de son chromosome. Il ne m'a pas été non plus possible de réaliser des banques Hi-C à partir des mutants *lsr2* de Mabs-S et Mabs-R durant le temps imparti pour ma thèse. Cependant, la mise en évidence du rôle potentiel de Lsr2 dans l'organisation du chromosome de ces deux morphotypes est en cours d'évaluation par l'équipe.

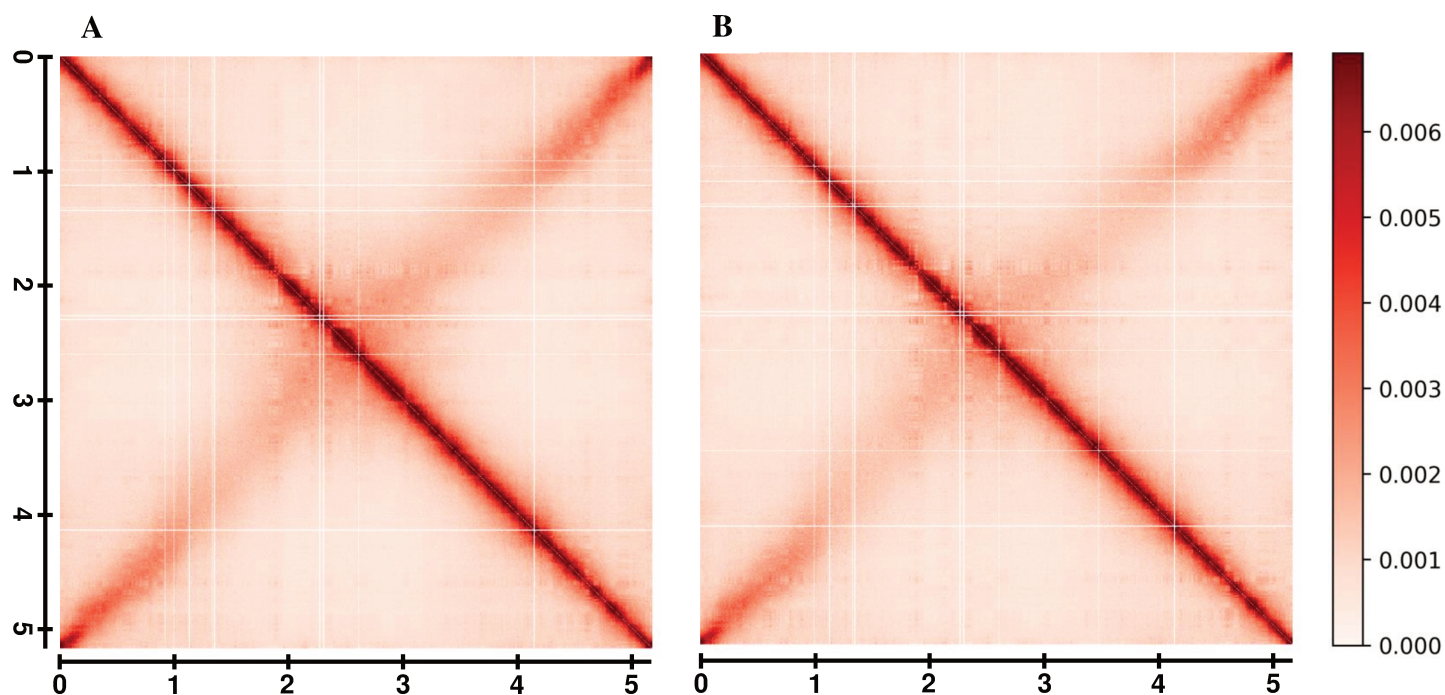


Figure 36 : Matrices de contact Hi-C représentant la structure topologique du chromosome de *M. abscessus*. (A) : Mabs-S et (B) : Mabs-R. La génération des matrices de contact est réalisée par le pipeline *hicstuff*. La fréquence d'interaction entre deux loci du génome est visualisée sous la forme d'une "heat map" (résolution de 5 kb). Les axes x et y correspondent aux coordonnées chromosomiques de *M. abscessus* (en Mb).

2. Étude de l'effet de Lsr2 sur les interactions d'ADN chez *M. abscessus* par 3C-qPCR

L'implémentation de la méthode Hi-C ayant pris plus de temps qu'escompté, nous n'avons pas pu l'employer afin de tester le rôle potentiel de Lsr2 dans la conformation du chromosome de *M. abscessus*. En parallèle, les résultats de RNA-seq ont montré des différences dans la régulation d'un grand nombre de gènes entre les deux morphotypes Mabs-S et Mabs-R par Lsr2, tandis qu'une distribution similaire de cette protéine le long du chromosome de ces deux morphotypes a été révélée par ChIP-seq. Cette observation nous a amené à émettre l'hypothèse que l'activité de pontage de Lsr2 dans le mécanisme de transcription serait en partie responsable de ces différents états transcriptionnels. Nous avons donc utilisé la méthode 3C-qPCR afin d'étudier ce type d'interactions plus discrètes potentiellement médiées par Lsr2.

Nous avons choisi le locus *mmpL8* comme région test présentant possiblement des changements d'interactions importants entre les deux morphotypes. Le choix de cette région était basé sur nos données de RNA-seq et ChIP-seq. L'ensemble des gènes constituant ce locus sont régulés différemment entre les deux morphotypes Mabs-S et Mabs-R par Lsr2, avec une répression observée chez Mabs-R et une activation constatée chez Mabs-S (Gerges *et al.*, Partie I – Résultats, Supplementary data, tableau S3). Le ChIP-seq a montré que le locus *mmpL8* serait une cible directe pour Lsr2, avec deux pics d'enrichissement détectés à ce niveau : un pic montrant une fixation sur le promoteur de l'opéron *mmpL8* (pic 1) et un autre pic situé sur les gènes qui constitue cet opéron (pic 2), séparés tous deux par une distance de 8 kb (**Figure 37**).

A travers la 3C-qPCR, nous avons déterminé à la fois chez le morphotype Mabs-S et Mabs-R la fréquence d'interaction relative entre les deux fragments d'ADN (pic 1 et pic 2) du locus *mmpL8* (**Figure 37**), en la comparant avec la fréquence d'interaction observée chez les mutants Mabs-S- Δ *lsr2* et Mabs-R- Δ *lsr2*, respectivement. De même, nous avons examiné la fréquence d'interaction physique entre le premier pic du locus *mmpL8* et un autre pic pour Lsr2 situé à 24 kb (pic 3), couvrant une région du génome de *M. abscessus* (désignée par *MAB_0828*) (**Figure 37**) impliquée dans le métabolisme des lipides. Cette région est également régulée directement par Lsr2 chez les deux morphotypes, de manière similaire au locus *mmpL8*.

De manière très similaire aux banques Hi-C, une banque 3C est construite en trois étapes principales, comprenant la fixation de la chromatine par du formaldéhyde, la digestion de la chromatine réticulée par des enzymes de restriction, et la ligation intramoléculaire des fragments digérés favorisant la proximité. Nous avons préparé nos banques de 3C pour trois

réplicats biologiques pour Mabs-S, Mabs-R, Mabs-S- Δ *lsr2* et Mabs-R- Δ *lsr2*, en s'inspirant d'un protocole 3C-qPCR adapté aux bactéries et récemment publié (Rashid, Detmar and Dame, 2022). Le choix de l'enzyme de digestion repose sur la nécessité qu'elle possède un site de restriction présent sur tous les fragments d'ADN que nous souhaitons tester pour leurs interactions. Nous avons sélectionné pour cela l'enzyme BstYI qui répond de manière satisfaisante à ce besoin (site de restriction : 5'-R[^]GATCY-3') (**Figure 37**).

Le fragment d'ADN I (pic 1) (**Figure 37**) a été utilisé comme fragment fixe dans notre étude pour tester l'ensemble des interactions avec tous les autres fragments. Il est ainsi désigné sous le nom de "fragment d'ancrage I".

Les fragments d'ADN dont nous avons testé les interactions physiques sont :

- Fragments de test II et IV : utilisés pour tester les interactions I+II et I+IV. Le fragment II correspond au pic 2 dans le locus *mmpL8* et le fragment IV correspond au pic 3 situé dans l'autre région *MAB_0828* (**Figure 37**).
- Fragment de contrôle interne III: correspond à un fragment d'ADN non enrichi en Lsr2, dont l'interaction I + III est destinée à permettre la normalisation des données afin de pouvoir comparer les différents échantillons entre eux (**Figure 37**).

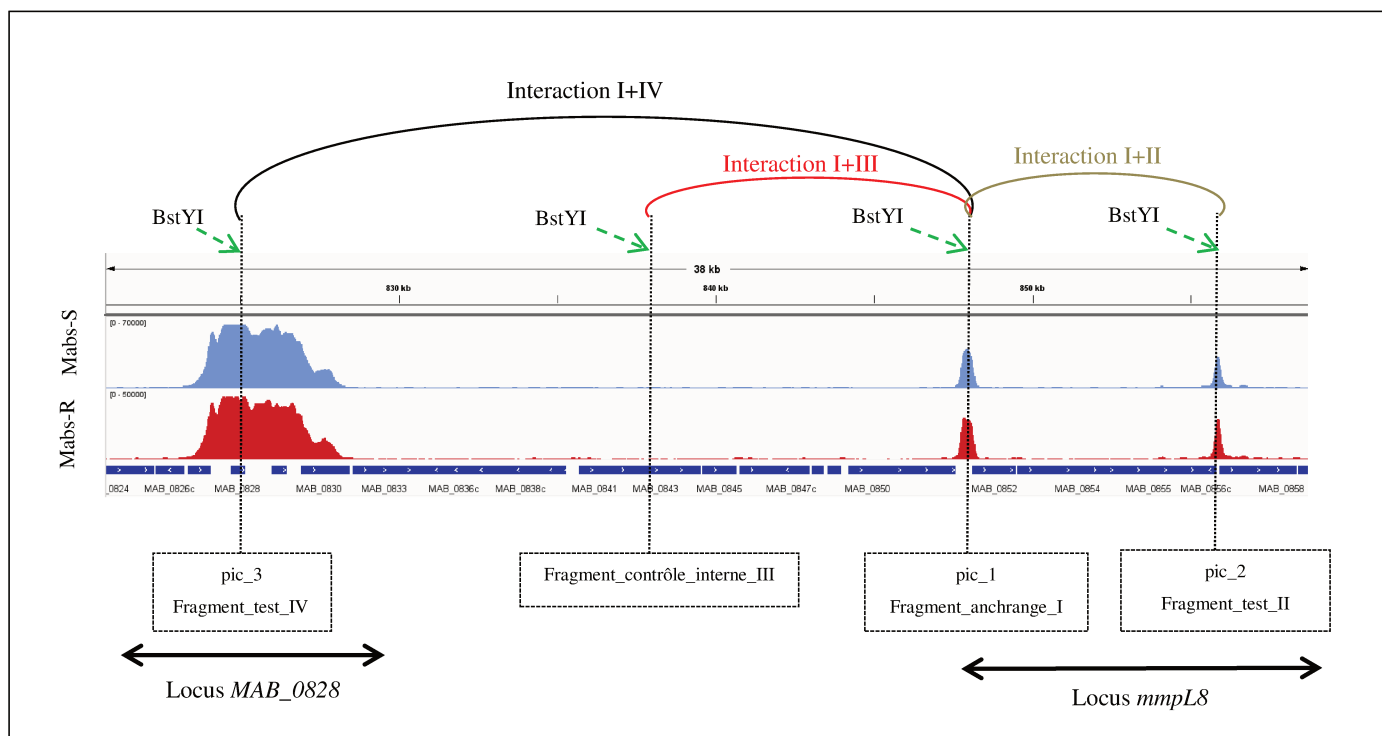


Figure 37 : Conception expérimentale de la 3C-qPCR. Schéma illustrant la fixation de Lsr2 sous forme de deux pics au niveau du locus *mmpL8* (pic_1 et pic_2) et d'un pic au niveau du locus *MAB_0828* (pic_3) chez Mabs-S et Mabs-R. Les interactions physiques testées par qPCR sont désignées comme suit : interaction I+II, correspondant à l'interaction

entre le fragment d'ancrage I et le fragment test II ; interaction I+III, correspondant à l'interaction entre le fragment d'ancrage I et le fragment de contrôle interne III ; et interaction I+IV, correspondant à l'interaction entre le fragment d'ancrage I et le fragment test IV. Les sites de restriction de l'enzyme BstYI au niveau des régions testées sont marqués par des flèches en pointillé vert.

La quantification des fréquences d'interactions des différentes jonctions est obtenue à l'aide d'une courbe d'étalon construite à partir d'une banque de jonctions contrôle. Chaque jonction étudiée a été synthétisée par PCR d'extension par chevauchement, puis les fragments obtenus (I+II, I+III et I+IV) ont été purifiés. Pour évaluer la quantité d'amplicons présents pour une interaction donnée et dans un échantillon (banque de contrôle ou banques 3C), nous avons utilisé la méthode de qPCR associée à l'utilisation de la sonde Taqman. La fréquence relative des interactions à tester (I+II et I+IV) chez les quatre souches de *M. abscessus* est déterminée en calculant le rapport entre la quantité initiale (Starting Quantity ou SQ) d'ADN cible de chaque fragment test et le SQ d'ADN cible du fragment de contrôle interne (I+III).

Les résultats de 3C-qPCR obtenus (**Figure 38**) montrent une fréquence d'interaction plus importante entre le fragment I et le fragment II, qui sont localisés dans la même région *mmpL8*, que l'interaction entre la région *mmpL8* et la région *MAB_0828*, que ce soit dans les souches sauvages ou les souches mutantes de *M. abscessus* pour *lsr2*. Concernant l'interaction entre les deux fragments I et II, situés sur le même locus *mmpL8* et enrichis par Lsr2, nous avons observé une fréquence d'interaction 2.4 fois plus élevée chez le morphotype Mabs-R que chez le morphotype Mabs-S. L'absence de *lsr2* a entraîné un changement significatif dans l'interaction entre ces deux fragments. Chez Mabs-R- Δ *lsr2*, nous avons observé une diminution de l'interaction physique, soit 5 fois moins par rapport à l'interaction détectée chez le morphotype sauvage Mabs-R. En revanche, l'absence de *lsr2* chez le morphotype Mabs-S a montré une augmentation très significative de l'interaction, soit 5.5 fois plus élevée par rapport à au morphotype sauvage Mabs-S. En comparant nos résultats de 3C-qPCR avec les données de RNA-seq et ChIP-seq obtenues pour le locus *mmpL8*, nous pouvons établir une corrélation entre les interactions physiques des fragments I et II, la liaison de Lsr2 à la fois au début et à la fin de ce locus, et les variations d'expression géniques entre les morphotypes sauvages et mutés. La répression de l'ensemble du locus chez Mabs-R pourrait être attribuable à une interaction physique significative, qui est par contre presque absente en l'absence de *lsr2* chez le même morphotype. De manière similaire, dans le contexte du morphotype Mabs-S, les différences observées dans les interactions physiques entre le morphotype sauvage et le morphotype muté expliquent la réduction des interactions

physiques, favorisant ainsi une transcription plus importante de ce locus (**Figure 38**). Cela est corroboré par l'augmentation des niveaux de transcrits observée pour ce locus une fois que le gène *lsr2* est muté chez le morphotype sauvage Mabs-S. Ces observations suggèrent que les interactions physiques entre les deux pics de Lsr2 que nous avons identifiées pourraient avoir un rôle clé dans le mécanisme de régulation génique.

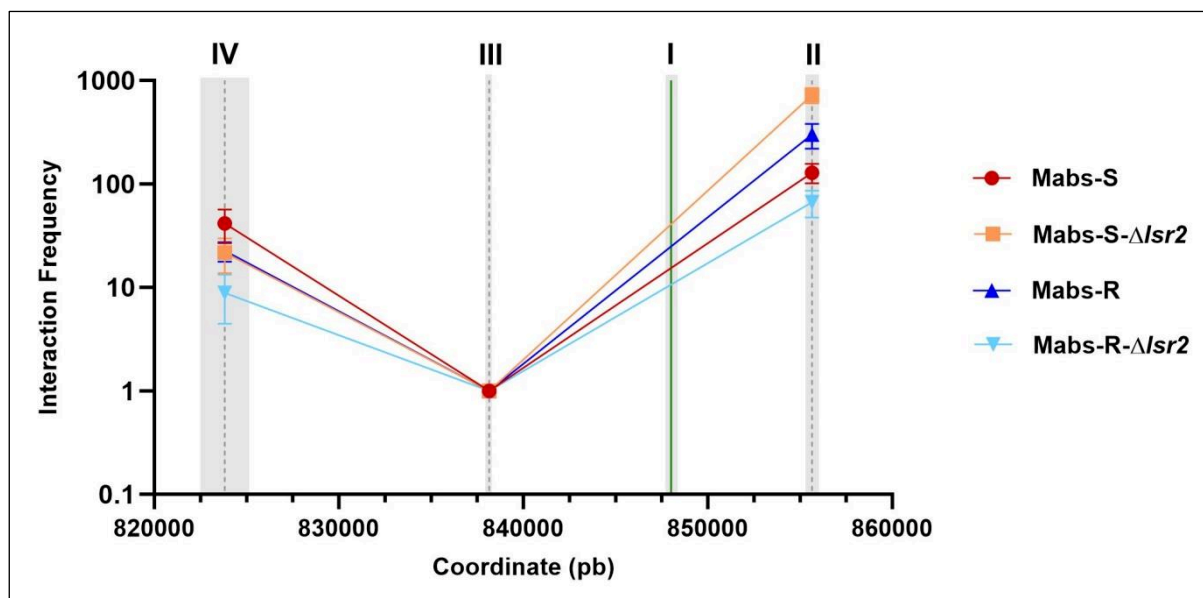


Figure 38 : Analyse 3C-qPCR des interactions au locus *mmpL8* chez les souches sauvages et mutantes pour *lsr2* de *M. abscessus*. La fréquence relative de l'interaction de chaque produit de ligation (fragments I+II et fragments I+IV) est représentée pour Mabs-S, Mabs-S- Δ *lsr2*, Mabs-R et Mabs-R- Δ *lsr2*, en fonction de sa distance (en pb) sur le génome de *M. abscessus*. Les données sont normalisées par rapport à l'interaction des fragments I+III (contrôle interne) (n=3). La largeur du rectangle gris sur le graphe correspond à la taille du fragment d'ADN généré après la digestion par BstYI.

Partie III : Étude de la localisation subcellulaire de Lsr2 sur le génome de *M. abscessus* et l'effet de la mutation du domaine N-terminal de Lsr2 dans sa fixation

1. Étude de la localisation subcellulaire de Lsr2 chez *M. abscessus* par la microscopie super-résolution

Nous avons souhaité compléter notre approche ChIP-seq en étudiant la localisation subcellulaire de Lsr2 à l'aide de deux techniques de microscopie super-résolution : la microscopie PALM (photo-activated localization microscopy) et la microscopie confocale "spinning disk" associée à un module « LiveSR » développé par la société Gataca Systems.

La microscopie PALM permet l'acquisition d'images à une résolution sub-nanométrique de 10 à 20 nanomètres (Betzig *et al.*, 2006). Son application pour l'étude de la localisation de Lsr2 requiert son étiquetage préalable avec une protéine fluorescente photoactivable. Pour ce faire, nous avons utilisé la même méthode de recombinaison homologue que celle employée pour la construction des morphotypes S et R Mabs-Lsr2-FLAG (Gerges *et al.*, Partie I - Résultats) et avons fusionné le gène *lsr2* avec celui codant la protéine mEos3.2 (obtention des morphotypes Mabs-S-Lsr2-mEos3.2 et Mabs-R-Lsr2-mEos3.2). Les souches fluorescentes des deux morphotypes S et R de *M. abscessus* ont présenté un taux de croissance similaire aux souches sauvages S et R (Annexe 2). Avant acquisition, les échantillons ont été préparés de la manière suivante : les bactéries ont été prélevées pendant la phase de croissance exponentielle puis fixées à l'aide de formaldéhyde. Dans certains cas, un contremarquage du nucléoïde a été réalisé par incubation avec du Hoechst.

La comparaison des acquisitions faites à partir des lignées Mabs-Lsr2-mEos3.2 S et R et à l'aide des deux méthodes de microscopie n'a pas montré de différence significative. Nous avons donc choisi de privilégier l'utilisation de la combinaison microscopie confocale "spinning disk" + module LiveSR, permettant une acquisition et une analyse plus rapide des données que le PALM (Azuma and Kei, 2015). Cette étude a été réalisée avec l'aide d'un stagiaire de Master 1, Norman Partouche, qui a contribué à la préparation des lames, ainsi qu'à l'acquisition et l'analyse des images.

Les résultats obtenus ont montré que Lsr2-mEos3.2 se concentre dans un nombre limité de foyers, 2 à 3 par cellule, reliés en une structure très dense ressemblant à un « anneau » (**Figure 39A**). Cette observation a été faite dans la majorité des cellules observées, aussi bien dans le morphotype Mabs-S-Lsr2-mEos3.2 (**Figure 39B**) que dans le morphotype Mabs-R-Lsr2-mEos3.2 (**Figure 39C**). L'existence de ces foyers intenses pourrait être attribuée à des

interactions entre les oligomères de Lsr2, lesquels conduiraient à la formation de larges complexes nucléoprotéiques. Si le regroupement de protéines Lsr2 sous cette forme torique n'a pu être observé que chez *M. abscessus*, l'étude de sa distribution chez *M. smegmatis*, a aussi montré l'existence de 1 à 2 foyers très intenses de Lsr2 dans le cytoplasme de cette bactérie (Kołodziej, Trojanowski, *et al.*, 2021). Nous avons également comparé la localisation de Lsr2 avec celle du nucléoïde marqué au Hoechst lors d'expériences de colocalisation. La comparaison des profils d'intensité de fluorescence le long de la bactérie montre une colocalisation partielle entre le nucléoïde et Lsr2, (**Figure 39D et 39E**).

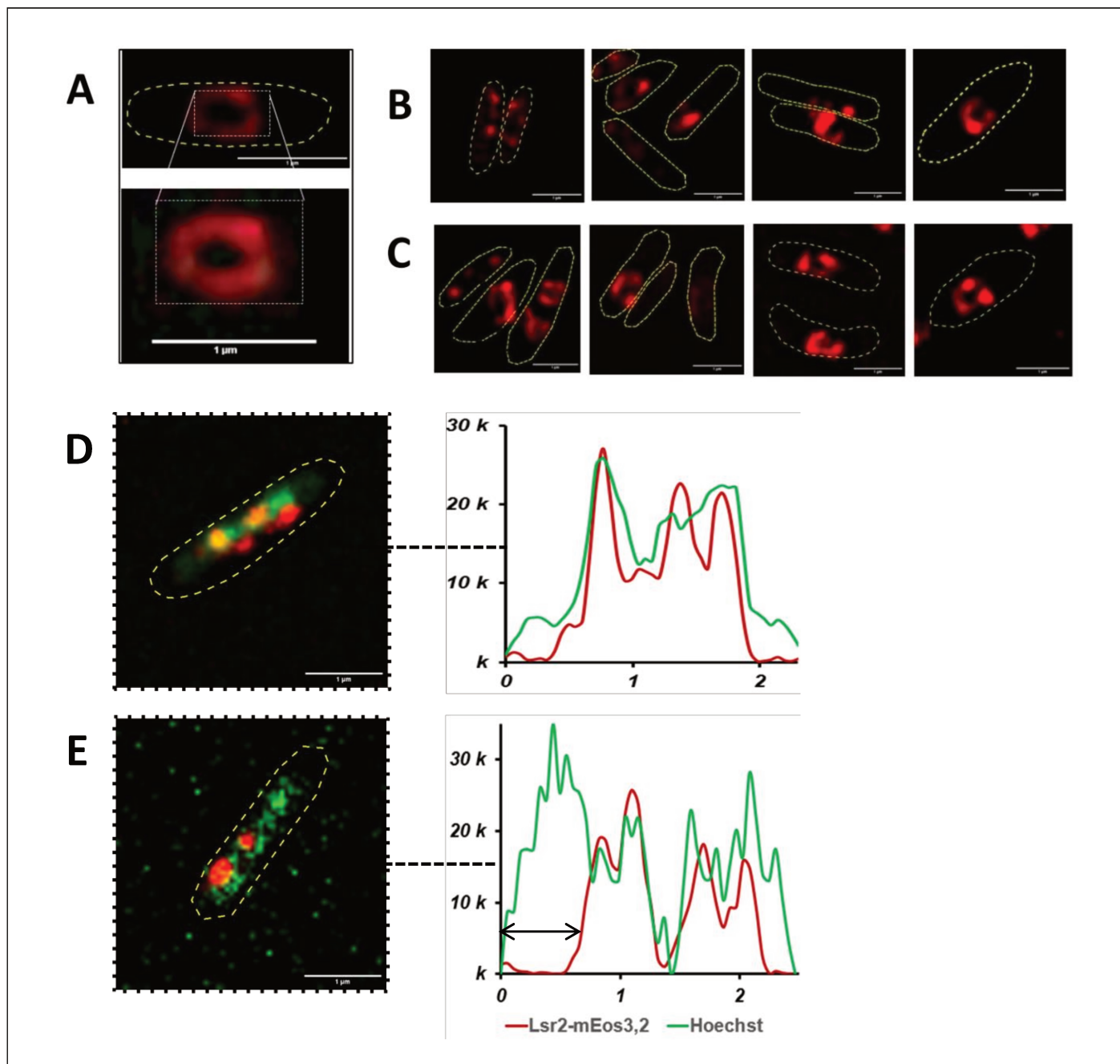


Figure 39 : Distribution subcellulaire de Lsr2-mEos3.2 chez les deux morphotypes S et R de *M. abscessus*. Le marquage par mEos3.2 (en rouge) témoigne d'un marquage circulaire

de Lsr2 dans chaque bactérie (échelle à 1 μm et objectif $\times 100$). **(A)** : Structure d'un anneau formé par Lsr2 chez Mabs-S-Lsr2-mEos3.2. Distribution subcellulaire de Lsr2 sous forme de 2 à 3 foyers lumineux denses chez Mabs-S-Lsr2-mEos3.2 **(B)** et Mabs-R-Lsr2-mEos3.2 **(C)**; observation constatée dans plusieurs bactéries prises dans différents champs. Profil de colocalisation entre Lsr2-mEos3.2 (rouge) et l'ADN (Hoechst, vert) et d'intensité de marquage pour Mabs-R-Lsr2-mEos3.2 **(D)** et Mabs-S-Lsr2-mEos3.2 **(E)**. L'axe des ordonnées correspond au niveau d'intensité du marquage en milliers (« k ») et l'axe des abscisses à la distance en μm . La flèche noire indique une distance en microns où Lsr2 et le nucléoïde ne semblent pas colocaliser.

2. Étude de la fixation de Lsr2 mutée au niveau de son domaine N-terminal par ChIP-seq

De précédentes études ont montré *in vitro* que le domaine N-terminal de Lsr2 est responsable de son oligomérisation, qui pourraient conduire, dans certains cas, à la formation de larges complexes nucléoprotéiques en reliant des fragments d'ADN distants (Chen *et al.*, 2008) (Summers *et al.*, 2012). Pour élucider le rôle du domaine N-terminal (NTD) *in vivo* dans la distribution de Lsr2 sur le génome de *M. abscessus*, ainsi que son importance dans la formation de ces longs domaines de liaison observés lors de nos analyses ChIP-seq (Gerges *et al.*, Partie I - Résultats), nous avons construit des morphotypes Mabs-S et Mabs-R exprimant la protéine Lsr2 tronquée au niveau du NTD et fusionnée à une étiquette de type FLAG (Mabs-S-Lsr2_{ΔNTD}-FLAG et Mabs-R-Lsr2_{ΔNTD}-FLAG). Nous avons conservé le domaine C-terminal (CTD), connu pour être impliqué dans la liaison à l'ADN. Nous avons ensuite étudié l'effet de la mutation du NTD sur la distribution de Lsr2 par ChIP-seq.

Pour la construction des souches ΔNTD, nous avons d'abord déterminé la séquence du domaine NTD de la protéine Lsr2 chez *M. abscessus*, conformément à l'étude publiée par Summers et ses collaborateurs (2012), montrant la structure du domaine d'oligomérisation de Lsr2 chez *M. tuberculosis* (Summers *et al.*, 2012). Chez *M. abscessus*, la protéine Lsr2 est composée de 114 acides aminés, dont les 60 premiers de sa séquence après la méthionine constituent le NTD (**Figure 40**).

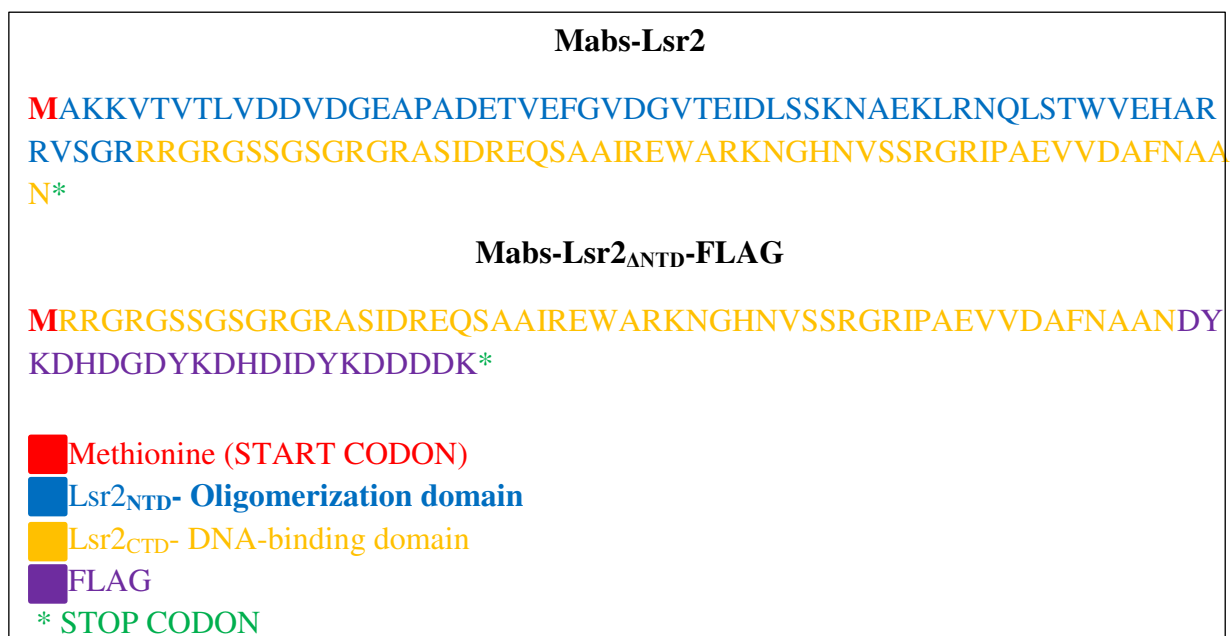


Figure 40 : Les séquences protéiques de Lsr2 de *M. abscessus* pour la souche sauvage (Mabs-Lsr2) et pour la souche mutante pour le domaine N-terminal de Lsr2, marquée par une étiquette FLAG (Mabs-Lsr2_{ΔNTD}-FLAG).

La séquence $Lsr2_{\Delta NTD}$ -FLAG, amplifiée par PCR, a été clonée dans le plasmide intégratif pMVH361, qui a été ensuite transformé par électroporation dans les souches Mabs-S et Mabs-R mutantes pour *lsr2* (Matériels et Méthodes). Après les manipulations génétiques, nous avons confirmé par RT-qPCR que les souches $Lsr2_{\Delta NTD}$ -FLAG et les souches $Lsr2$ -FLAG présentaient des niveaux d'expression similaires du gène *lsr2* pour la région codante du CTD (non significatif, ns) dans les deux morphotypes (**Figure 41A**). De plus, la RT-qPCR a également été utilisée pour confirmer l'absence totale des transcrits de la région NTD chez les deux souches Mabs-S- $Lsr2_{\Delta NTD}$ -FLAG et Mabs-R- $Lsr2_{\Delta NTD}$ -FLAG ($***P < 0.001$) (**Figure 41B**). L'étude de l'expression du gène *lsr2* pour les deux domaines, CTD et NTD, chez les souches $\Delta lsr2$ a servi de contrôle négatif pour les analyses de la RT-qPCR (**Figure 41A et 41B**). En parallèle, les souches $Lsr2_{\Delta NTD}$ -FLAG des deux morphotypes S et R de *M. abscessus* ont présenté un taux de croissance similaire aux souches $Lsr2$ -FLAG S et R (Annexe 2). Ces résultats confirment la réussite des constructions $Lsr2_{\Delta NTD}$ -FLAG, nous permettant de continuer avec les expériences de ChIP-seq.

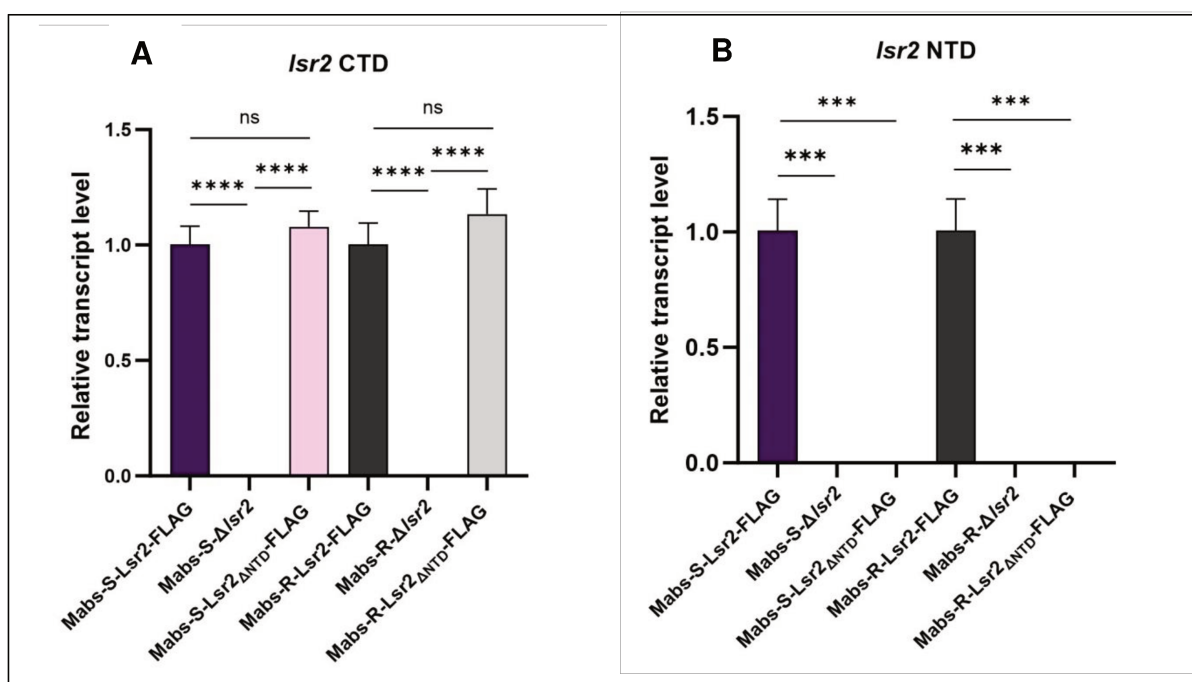


Figure 41 : Analyse comparative du niveau d'expression du gène *lsr2*, pour les domaines NTD et CTD par RT-qPCR. Quantification de l'expression relative du gène *lsr2* pour le CTD (A) et pour le NTD (B) chez Mabs-S-*Lsr2*-FLAG, Mabs-S- $\Delta lsr2$, Mabs-S- $Lsr2_{\Delta NTD}$ -FLAG, Mabs-R-*Lsr2*-FLAG, Mabs-R- $\Delta lsr2$ et Mabs-R- $Lsr2_{\Delta NTD}$ -FLAG. Les niveaux de transcrits *sigA* ont été utilisés pour la normalisation. La liste des amorces utilisées ainsi que leurs séquences figurent dans le **tableau 10 (Matériels et Méthodes)**. $n = 3$ et les barres d'erreur représentent l'erreur standard de la moyenne (SEM). ns, non-significatif, $***P < 0.001$, et $****P < 0.0001$ (Student's *t* test).

Les deux principales questions que nous avons posées sont les suivantes : l'élimination du domaine NTD affecte-t-elle la distribution de Lsr2 sous forme de longs domaines, ou affecte-t-elle également la distribution totale de la protéine ? Dans le premier cas, est-ce que le niveau d'expression d'un gène cible directement réprimé par la formation de longs domaines sera le même que dans une souche mutante pour *lsr2* ?

La détection des pics a montré que la mutation du NTD chez les deux morphotypes de *M. abscessus* abolit complètement la fixation de Lsr2 sur le génome, que ce soit sous forme de longs domaines ou sous forme d'un pic (**Figure 42**).

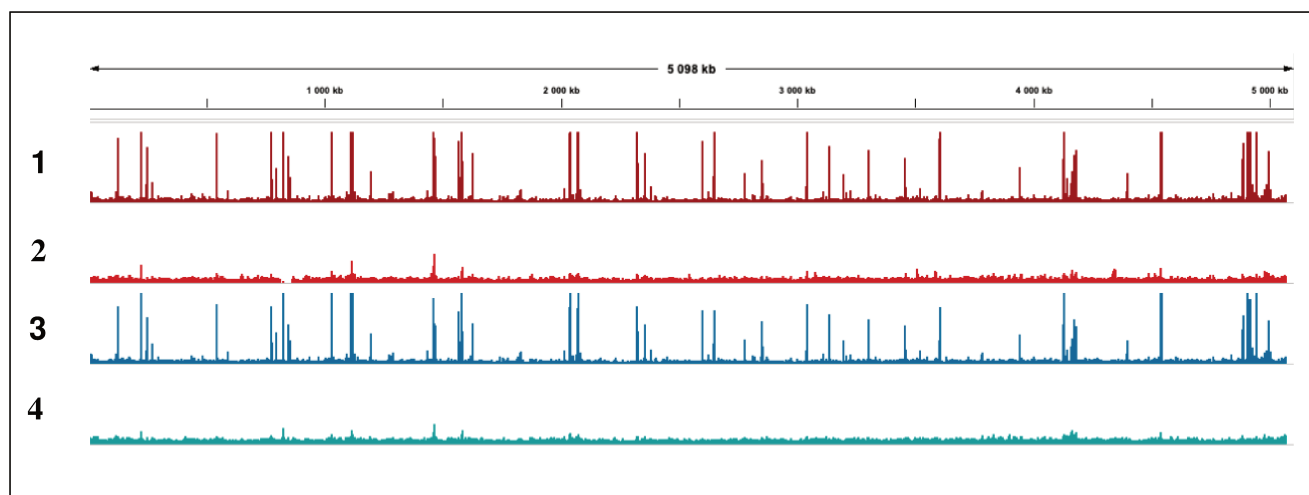


Figure 42 : Effet de la mutation NTD sur la fixation de Lsr2 au génome de *M. abscessus*. Comparaison de la répartition globale de Lsr2 sur le génome des souches Mabs-S-Lsr2-FLAG (1), Mabs-S-Lsr2 Δ NTD-FLAG (2), Mabs-R-Lsr2-FLAG (3), et Mabs-R-Lsr2 Δ NTD-FLAG (4). Le profil de fixation de Lsr2 est visualisé à l'aide du logiciel IGV.

Ce résultat suggère que le domaine CTD seul n'est pas suffisant pour maintenir la liaison de Lsr2 avec le génome. Il semble que la liaison de Lsr2 à l'ADN nécessite à la fois le CTD et le NTD. Cela a également été démontré chez *M. smegmatis* par microscopie PALM, où l'absence du NTD était associée à une mobilité très élevée des molécules de la protéine Lsr2 tronquée dans la cellule, par rapport à des molécules statiques de Lsr2 non tronquée liant fortement l'ADN (Kołodziej, Trojanowski, *et al.*, 2021).

Partie IV: Le Zafirlukast : Une molécule candidate pour cibler la protéine Lsr2 chez *M. abscessus* ?

1. Contexte

En plus de son rôle comme régulateur transcriptionnel, la contribution de Lsr2 pour la maintenance et l'organisation hiérarchique de l'ADN mycobactérien (Colangeli *et al.*, 2009) (Gordon *et al.*, 2010) en fait une cible prometteuse pour le développement de nouveaux agents antimicrobiens.

À ce jour, le zafirlukast est la seule molécule à visée thérapeutique qui a été montrée comme pouvant cibler directement Lsr2 (Pinault *et al.*, 2013). Ce composé utilisé comme traitement prophylactique de l'asthme appartient à la classe des antagonistes des récepteurs des leucotriènes et présente une remarquable sélectivité en tant qu'antagoniste compétitif du récepteur des leucotriènes cystéinyl-1 (CYSLTR1). En effet, le zafirlukast entre en compétition avec les leucotriènes cystéinyl pro-inflammatoires C4, D4 et E4 au niveau du CYSLTR1, ce qui permet d'empêcher efficacement l'inflammation induite par les leucotriènes (Dhaliwal and Bajaj, 2023). De même, une étude récente a souligné son rôle important dans l'inhibition de la prolifération et de la migration des cellules associées à l'adénocarcinome pulmonaire (Shi *et al.*, 2022).

Chez les bactéries, plusieurs études ont révélé que le zafirlukast présente un effet antibactérien potentiel sur des pathogènes oraux tels que *Porphyromonas gingivalis* et *Streptococcus mutans* (Gerits *et al.*, 2017) (Howard and Garneau-Tsodikova, 2022). Il a été démontré que cette molécule inhibe la formation de biofilms par les pathogènes tels que *S. mutans*, *Staphylococcus epidermidis* et *S. aureus*, ainsi que de *P. gingivalis*, et réduit également la viabilité des biofilms existants de ces pathogènes (Gerits *et al.*, 2017).

En ce qui concerne les mycobactéries, Pinault et ses collaborateurs (2013) ont démontré un effet potentiel du zafirlukast dans l'inhibition de la croissance de *M. tuberculosis* et de *M. smegmatis* (Pinault *et al.*, 2013). De manière intéressante, cette même étude a démontré *in vitro*, par des expériences de polarisation de fluorescence ainsi que par spectrométrie de masse MALDI-TOF, que le zafirlukast inhibe la formation du complexe entre Lsr2 et l'ADN. Il est important de noter que cette inhibition est dose-dépendante et résulte d'une interaction directe avec la protéine Lsr2 (Pinault *et al.*, 2013). En revanche, cette molécule n'a montré aucun effet dans l'inhibition de la croissance d'*E. coli*, ce qui a conduit à l'hypothèse que ce médicament est spécifique de Lsr2, et non de ses orthologues comme H-NS.

Pour évaluer l'existence d'un effet antimicrobien du zafirlukast contre *M. abscessus*, nous avons procédé à des tests de CMI, ainsi que des tests bactéricides/bactériostatiques. De plus, afin de tester son effet potentiel sur la fonction de Lsr2, nous avons étudié la fixation de cette dernière sur le génome de *M. abscessus* par ChIP-seq ainsi que le changement potentiel du niveau d'expression de certains de ses gènes cibles après traitement au zafirlukast.

2. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) du zafirlukast chez *M. abscessus*

Nous avons déterminé les valeurs des CMI du zafirlukast sur une gamme de concentrations allant de 1.5 µM à 200 µM pour les morphotypes Mabs-S et Mabs-R, en utilisant une culture bactérienne initiale de 5×10^5 CFU/mL (Colony Forming Units/mL) en phase de croissance exponentielle, conformément aux recommandations du CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) et comme précédemment décrit (Gerges *et al.*, Partie I - Résultats).

Les valeurs de CMI du zafirlukast obtenues après 3 à 5 jours d'incubation à 30°C pour les morphotypes Mabs-S et Mabs-R sont présentées dans le **Tableau 9**. Le morphotype Mabs-S démontre d'une CMI de 40 µM et le morphotype Mabs-R d'une CMI de 48 µM. Ces résultats démontrent donc une activité antibactérienne de cette molécule qui semble être similaire contre les deux morphotypes de *M. abscessus*. L'effet antimicrobien du zafirlukast est 4 à 5 fois plus important chez *M. smegmatis* (CMI : 10 µM) que chez *M. abscessus* (Pinault *et al.*, 2013).

Tableau 9 : Profil de susceptibilité au zafirlukast des souches Mabs-S et Mabs-R en µM et en µg/mL 3 à 5 jours d'incubation (n=3).

Souche	CMI (µM)	CMI (µg/mL)
Mabs-S	40	25
Mabs-R	48	30

3. Évaluation de l'activité antibactérienne du zafirlukast chez *M. abscessus*

Nous avons cherché à déterminer si le zafirlukast présente un effet bactériostatique ou bactéricide. Pour ce faire, nous avons incubé les morphotypes Mabs-S et Mabs-R, initialement à une concentration d'environ 5×10^5 CFU/mL, avec le zafirlukast à une concentration équivalant à 3 fois la CMI déterminée précédemment. Cette évaluation d'activité antibactérienne a été effectuée sur une période de 5 jours en parallèle d'un contrôle positif correspondant à la même concentration initiale de bactéries mais en absence de traitement.

Les résultats obtenus à la fois pour les deux morphotypes et durant 5 jours de culture montrent une inhibition de la croissance bactérienne sans réduction des CFUs (5.83 et 5.72 pour Log_{10} CFU/mL à jour 5 pour Mabs-S et Mabs-R, respectivement) par rapport aux témoins (9.14 et 9.26 pour Log_{10} CFU/mL à jour 5 pour Mabs-S et Mabs-R, respectivement) (**Figure 43**). Ces résultats mettent en évidence un effet bactériostatique du zafirlukast chez les deux morphotypes de *M. abscessus*. Contrairement à nos résultats, le zafirlukast présente une activité bactéricide chez *M. smegmatis* (Pinault *et al.*, 2013).

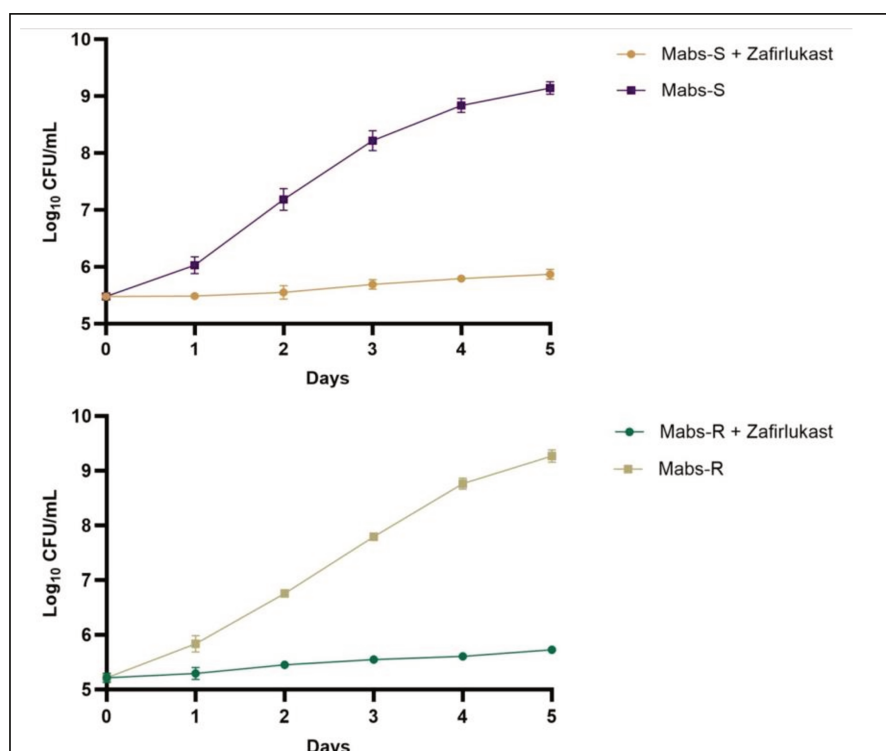


Figure 43 : Effet bactériostatique du zafirlukast sur Mabs-S et Mabs-R. Évaluation des CFUs (Log_{10} CFU/mL) sur une période de 5 jours après l'ajout de $3 \times \text{CMI}$ de zafirlukast à Mabs-S et Mabs-R, en parallèle d'un contrôle positif pour la croissance bactérienne (sans zafirlukast) pour Mabs-S et Mabs-R (n=3).

4. Étude de l'effet du zafirlukast sur la fixation de Lsr2 sur le génome de *M. abscessus*

Étant donné l'effet du zafirlukast sur l'inhibition *in vitro* de la formation du complexe Lsr2-ADN (Pinault *et al.*, 2013), nous avons souhaité déterminer son effet sur la fixation de Lsr2 sur le génome des deux morphotypes de *M. abscessus* par la méthode de ChIP-seq, en comparant ces données avec celles obtenues sur des souches sauvages cultivées en conditions contrôles (sans zafirlukast). Pour ce faire, nous avons incubé les bactéries Mabs-S-Lsr2-FLAG en phase de croissance exponentielle avec du zafirlukast à une concentration équivalant à 5 fois la CMI déterminée précédemment. Les expériences de ChIP-seq ont été réalisées avec trois réplicats biologiques (Gerges *et al.*, Partie I - Résultats).

De manière surprenante, nous n'avons observé aucun changement dans la distribution de Lsr2 après exposition au zafirlukast. En effet, le nombre de pics détectés pour Lsr2 en conditions de culture normale et en conditions de traitement par le zafirlukast pour Mabs-S-Lsr2-FLAG s'est révélé similaires (**Figure 44**).

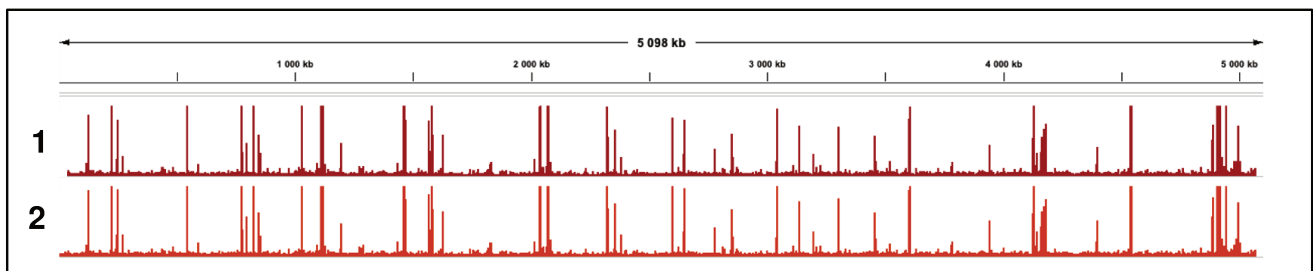


Figure 44 : Effet du zafirlukast sur la fixation de Lsr2 sur le génome de Mabs-S.

Analyse comparative de la répartition globale de Lsr2 sur le génome de Mabs-S-Lsr2-FLAG en absence (1), ou en présence (2) de zafirlukast par ChIP-seq. Les profils de fixation de Lsr2 sont visualisés à l'aide du logiciel IGV.

5. Étude de l'effet du zafirlukast sur l'expression des gènes cibles de Lsr2

Bien que les résultats de la ChIP-seq n'aient pas révélé de modification dans la répartition de Lsr2 suite à l'application de zafirlukast aux cultures de *M. abscessus*, nous avons tout de même souhaité mesurer son impact sur l'expression des gènes qui sont directement régulés par Lsr2 (suite à une fixation), ainsi que sur ceux qui le sont indirectement.

Dans ce contexte, nous avons incubé les morphotypes Mabs-S et Mabs-R en phase de croissance exponentielle avec du zafirlukast, à une concentration finale de 5x CMI pendant 16 heures à 37°C. Ensuite, nous avons réalisé les extractions des ARN de trois réplicats biologiques. Parallèlement, des extractions d'ARN ont été réalisées pour des cultures des mêmes morphotypes sans l'ajout de zafirlukast. Cette approche a été appliquée également aux morphotypes Mabs-S- Δ *lsr2* et Mabs-R- Δ *lsr2* dans des conditions identiques.

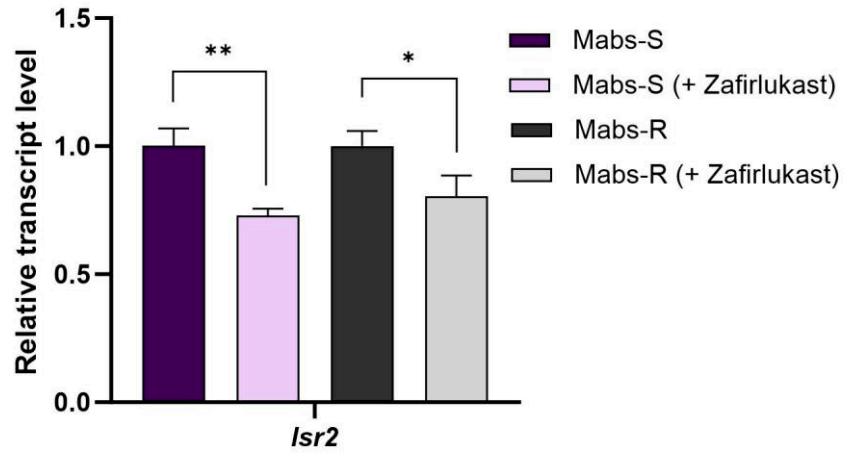
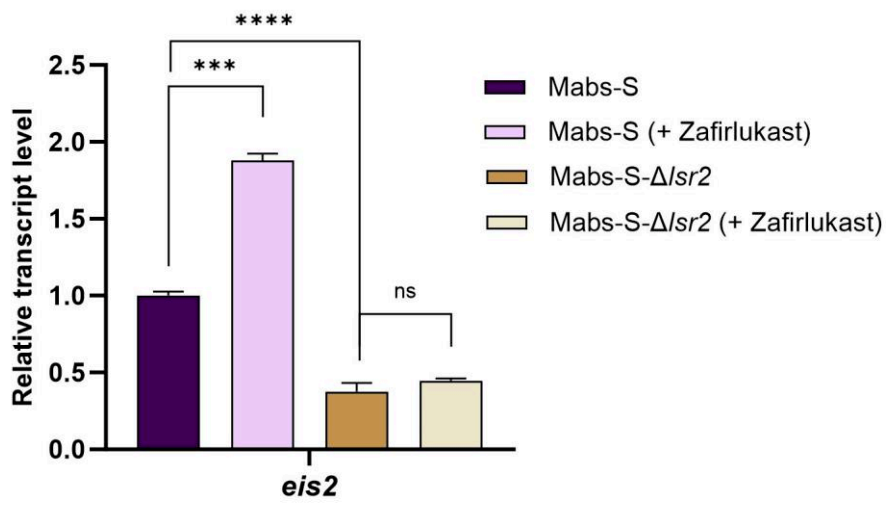
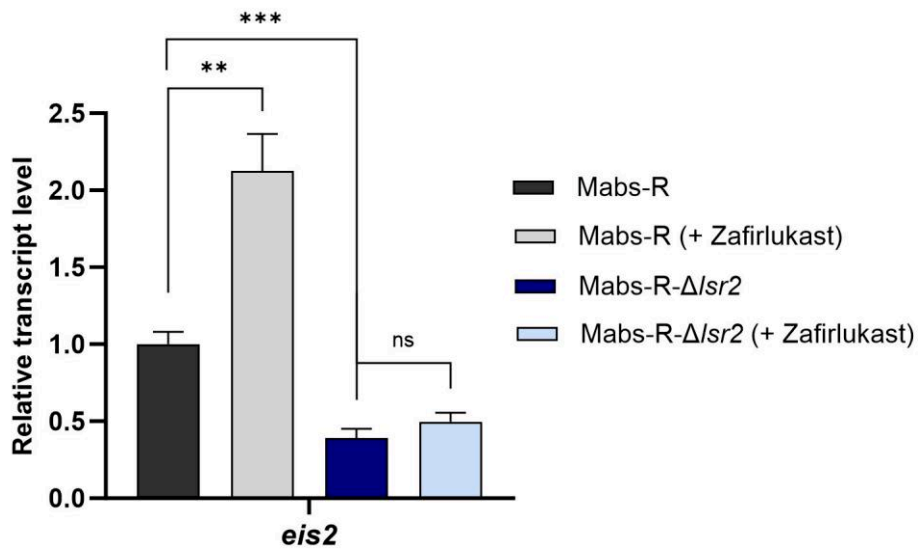
Deux gènes cibles de Lsr2 ont été choisis pour comparer leur niveau d'expression chez Mabs-S, Mabs-R, Mabs-S- Δ *lsr2* et Mabs-R- Δ *lsr2* après traitement zafirlukast.

- Le gène *eis2*, activé indirectement par Lsr2 dans les deux morphotypes de *M. abscessus* selon nos données, joue un rôle dans la croissance intracellulaire de *M. abscessus* ainsi que dans la résistance aux aminoglycosides (Rominski *et al.*, 2017) (Dubois *et al.*, 2019).
- Le gène *MAB_2037*, réprimé directement par Lsr2 dans les deux morphotypes de *M. abscessus*, code pour une protéine MmpL. Ce gène est impliqué dans la synthèse des acides mycoliques (Dubois *et al.*, 2019), ainsi qu'un rôle dans la virulence de *M. abscessus* dans les modèles murin et drosophile (résultats non publiés de notre équipe).
- Comme nos résultats de ChIP-seq ont montré que la protéine Lsr2 se lie à son propre gène, *lsr2*, les niveaux d'ARNm de ce gène ont également été quantifiés.

Les résultats obtenus montrent une diminution légère mais significative de l'expression de *lsr2* lors du traitement au zafirlukast, à la fois chez Mabs-S et Mabs-R ($*P < 0.05$, $**P < 0.01$, respectivement) (**Figure 45A**). Pour le gène *eis2*, une augmentation significative de son expression a été observée, environ deux fois plus élevée, chez les souches Mabs-S (**Figure 45B**) et Mabs-R (**Figure 45C**) par rapport aux conditions de culture normales ($**P < 0.01$, $***P < 0.001$, respectivement). Pour confirmer que l'augmentation de l'expression du gène *eis2* résulte de l'effet direct du zafirlukast sur l'activité de Lsr2, nous avons également comparé les niveaux d'expression d'*eis2* chez les mutants *lsr2* de *M. abscessus* après traitement. Les résultats indiquent qu'il n'existe pas de différence significative en ce qui

concerne le niveau d'expression du gène *eis2* entre les souches $\Delta lsr2$ traitées ou non avec le zafirlukast (**Figures 45B et 45C**). Ces résultats confirment que Lsr2 régule à la hausse l'expression du gène *eis2*, et que cette régulation est significativement renforcée sous traitement au zafirlukast. L'absence de différence significative entre les souches mutantes *lsr2* avec et sans zafirlukast suggère que l'effet du zafirlukast sur l'expression d'*eis2* est indirect, en perturbant l'activité régulatrice de Lsr2. De même, l'expression du gène *MAB_2037* est significativement plus élevée (x 3.7 fois) lors de l'ajout de zafirlukast dans les souches Mabs-S (**Figure 45D**) et Mabs-R (**Figure 45E**), par rapport aux souches non traitées ($***P < 0.001$). Cette augmentation montre une réduction significative de l'effet répresseur de Lsr2 sur ce gène en présence de zafirlukast. Cependant, il est important de noter que même si la souche Mabs-R- $\Delta lsr2$ (+ zafirlukast) montre également une augmentation de l'expression de *MAB_2037* par rapport à la souche Mabs-R- $\Delta lsr2$ sans traitement ($*P < 0.05$), le niveau d'expression reste nettement inférieur à celui de la souche sauvage (+ zafirlukast) (**Figure 45E**). En parallèle, aucune différence significative n'est observée dans l'expression du gène *MAB_2037* entre les souches Mabs-S- $\Delta lsr2$ (+ zafirlukast) et Mabs-S- $\Delta lsr2$ sans traitement (**Figure 45D**).

Dans l'ensemble, ces résultats suggèrent que le zafirlukast exerce un effet ciblé sur Lsr2, perturbant à la fois son expression et son activité régulatrice sur les gènes cibles, tout en réduisant son effet répressif.

A**B****C**

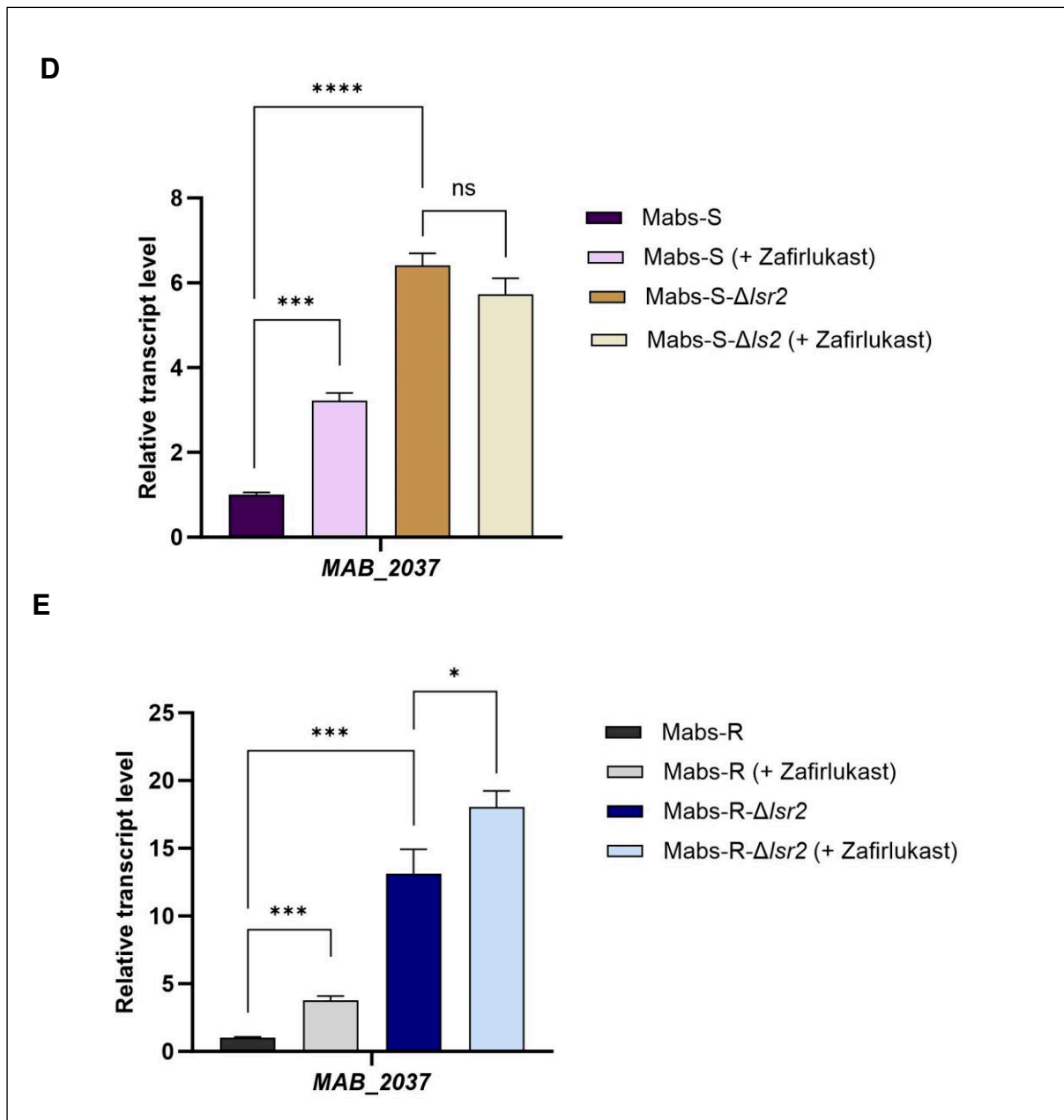


Figure 45 : Effet du zafirlukast sur le niveau d'expression des gènes *lsr2*, *eis2* et *MAB_2037*. Quantification de l'expression relative des gènes de *lsr2* (A), *eis2* (B et C), et *MAB_2037* (D et E) par RT-qPCR dans des conditions de croissance avec zafirlukast ou sans zafirlukast chez Mabs-S, Mabs-S- Δ lsr2, Mabs-R et Mabs-R- Δ lsr2. Les niveaux de transcrits *sigA* ont été utilisés pour la normalisation. La liste des amorces utilisées ainsi que leurs séquences figurent dans le **tableau 10 (Matériels et Méthodes)** n= 3. Les barres d'erreur représentent l'erreur standard de la moyenne (SEM). ns, non-significatif, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, et **** $P < 0.0001$ (Student's *t* test).

Partie V: Étude de l'effet des facteurs de stress sur la synthèse de Lsr2 et sa fixation chez *M. abscessus*

Compte tenu de son rôle dans la réponse au stress, il a été montré que le niveau d'expression de *lsr2* augmentait en cas de limitation des nutriments, de variations de température, d'augmentation du fer et d'hypoxie. Des observations similaires ont été rapportées à la fois chez *M. tuberculosis* (Bartek *et al.*, 2014) et *M. smegmatis* (Kołodziej, Łebkowski, *et al.*, 2021).

Nous avons mené une étude par ChIP-seq et par RT-qPCR pour évaluer l'impact de deux types de stress qui peuvent être rencontrés au cours de l'infection, l'amikacine et l' H_2O_2 , sur la fixation de Lsr2 sur le génome, ainsi que sur le niveau d'expression de son gène *lsr2*. En effet, les résultats précédemment obtenus ont montré que Lsr2 active l'expression des gènes impliqués dans la résistance de *M. abscessus* aux aminoglycosides (Gerges *et al.*, Partie I - Résultats), auxquels appartient l'amikacine, une molécule utilisée dans le traitement clinique contre cette mycobactérie (Illouz *et al.*, 2021). Par ailleurs, notre équipe a démontré le rôle de Lsr2 dans la défense contre les espèces réactives de l'oxygène (H_2O_2) chez le morphotype R (Le Moigne *et al.*, 2019). H_2O_2 (peroxyde d'hydrogène) fait partie des molécules anti-mycobactériennes les plus puissantes produites par l'hôte lors de l'infection intracellulaire des macrophages (Colangeli *et al.*, 2009).

Des données de ChIP-seq et RT-qPCR ont été collectées à partir de bactéries Mabs-R-Lsr2-FLAG exposées à une concentration d'amikacine équivalant à 3 fois la CMI précédemment déterminée (d'après Gerges *et al.*, Partie I - Résultats) pendant 16 heures à 37°C. Pour tester les effets d'une exposition à l' H_2O_2 , nous avons appliqué une concentration de 50 mM aux cultures de bactéries Mabs-R-Lsr2-FLAG pendant 4 heures à 37°C. Des expériences parallèles ont également été menées sans l'ajout d'amikacine ni d' H_2O_2 , permettant ainsi des comparaisons appropriées.

Comme dans le cas du traitement au zafirlukast, l'analyse des données de ChIP-seq n'a révélé aucun changement dans la distribution de Lsr2 le long du chromosome après traitement à l'amikacine (**Figure 46A**) et ou exposition à l' H_2O_2 (**Figure 46B**). Cependant, nous avons noté une augmentation significative du niveau d'expression de *lsr2*, soit 1.7 fois et 1.6 fois plus élevée suite à l'exposition à l'amikacine pour Mabs-S et Mabs-R, respectivement, par rapport aux souches non exposées à l'antibiotique (** $P < 0.01$). De même, en ce qui concerne l' H_2O_2 , nous avons observé une augmentation significative de l'expression de *lsr2*, soit 4 fois et 3 fois plus élevée pour Mabs-S (**Figure 47A**) et Mabs-R (**Figure 47B**),

respectivement, suite à l'exposition à cette molécule par rapport aux conditions de culture sans ajout d' H_2O_2 (** $P < 0.01$).

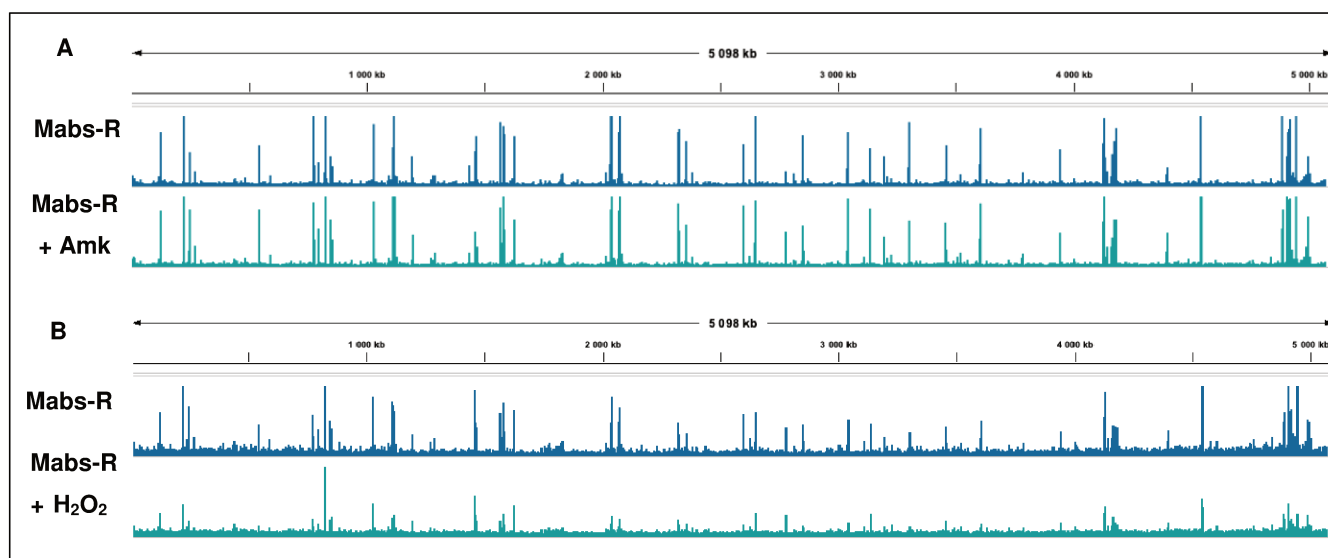


Figure 46 : Effet de l'amikacine et de l' H_2O_2 sur la fixation de Lsr2 sur le génome de Mabs-R. Comparaison de la répartition globale de Lsr2 sur le génome de Mabs-R en présence ou en absence d'amikacine (amk) (A) et en présence ou en absence d' H_2O_2 (B). Le profil de fixation de Lsr2 est visualisé à l'aide du logiciel IGV.

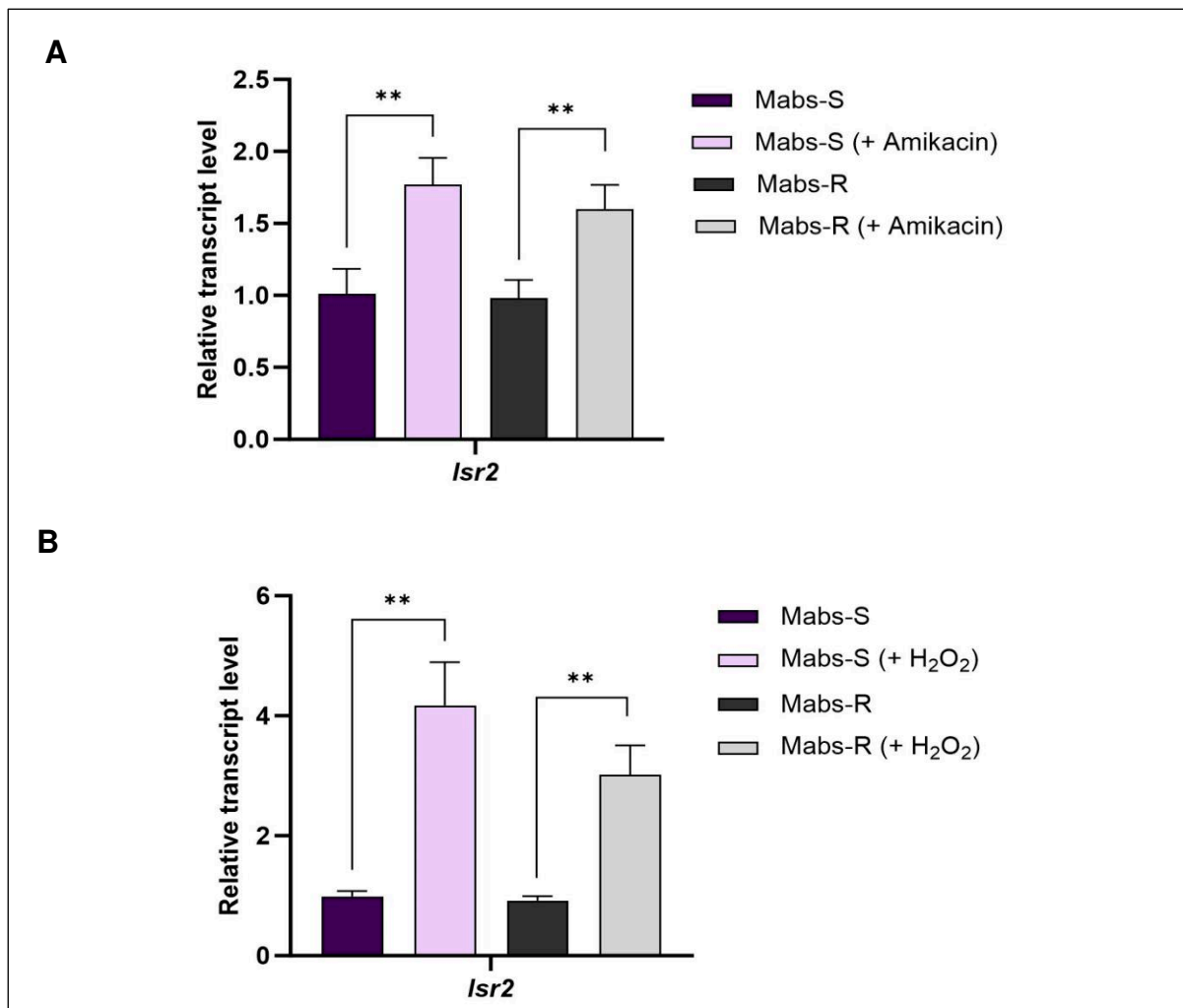


Figure 47 : Effet de l'amikacine et de l'H₂O₂ sur le niveau d'expression du gène *lsr2*. Quantification de l'expression relative du gène de *lsr2* suite à l'exposition à l'amikacine (3x CMI) (A) et à l'H₂O₂ (50 mM) (B) par RT-qPCR chez Mabs-S et Mabs-R, en comparant au niveau d'expression du gène *lsr2* en l'absence d'amikacine et d'H₂O₂. Les niveaux de transcripts *sigA* ont été utilisés pour la normalisation. La liste des amorces utilisées ainsi que leurs séquences figurent dans le **tableau 10 (Matériels et Méthodes)**. n= 3 et les barres d'erreur représentent l'erreur standard de la moyenne (SEM). ***P* < 0.01 (Student's *t* test).

Pour conclure, la fixation de Lsr2 reste stable aussi bien dans des conditions de stress que dans des conditions normales au niveau du génome de *M. abscessus*. L'implication de Lsr2 dans la réponse au stress chez les deux morphotypes de *M. abscessus* se manifeste par une augmentation de son niveau d'expression, ainsi que par une modification de son effet régulateur sur ses gènes cibles, à l'instar de ce qui est observé chez d'autres espèces de mycobactéries.

Discussion Générale - Perspectives

L'émergence de pathogènes opportunistes, tels que *M. abscessus*, pose un véritable problème de santé publique à l'échelle mondiale. Cette bactérie intracellulaire est reconnue comme l'espèce mycobactérienne la plus pathogène parmi les MNT, en particulier chez les individus atteints de mucoviscidose. Les infections à *M. abscessus* sont associées à un net déclin de la fonction pulmonaire, rappelant les infections à mycobactéries tuberculeuses (Qvist *et al.*, 2016). En parallèle, l'hétérogénéité phénotypique observée chez les deux morphotypes Mabs-S et Mabs-R est notamment attribuée à une hyper-virulence du morphotype R, confirmée dans différents modèles cellulaires et animaux (Bernut *et al.*, 2014) (Roux *et al.*, 2016). L'identification du gène *MAB_0545*, codant pour la protéine Lsr2, comme étant différentiellement exprimé au cours de la transition S/R a non seulement attiré l'intérêt de notre équipe pour étudier sa contribution dans la virulence de *M. abscessus* (Pawlik *et al.*, 2013) (Le Moigne *et al.*, 2019), mais elle nous a également incité à une étude plus approfondie visant à caractériser son rôle moléculaire chez les deux morphotypes de *M. abscessus*.

Depuis sa découverte chez *M. leprae* en 1991 en tant que antigène immunodominant, Lsr2 a été étudiée et caractérisée comme une protéine liant l'ADN (NAP), jouant un rôle non seulement dans la topologie de l'ADN, mais également dans divers processus cellulaires et moléculaires clés au sein de la famille des actinomycètes (Laal *et al.*, 1991) (Gordon *et al.*, 2008) (Bartek *et al.*, 2014). Chez *M. abscessus*, cette protéine joue un rôle dans la résistance aux dérivés oxydés, dans la survie et la croissance intracellulaire ainsi que dans la persistance de l'infection dans les poumons (Le Moigne *et al.*, 2019). Étant donné son rôle en tant que régulateur global de la transcription (Gordon *et al.*, 2010) (Bartek *et al.*, 2014) (Kołodziej, Łebkowski, *et al.*, 2021), notre objectif dans ce travail était de comprendre comment Lsr2 contribue à la physiopathologie de *M. abscessus* en explorant son rôle moléculaire. Pour ce faire, nous avons adopté une approche intégrative basée sur trois méthodes de génomique fonctionnelle (RNA-Seq, ChIP-Seq, Hi-C) associées à des expériences de microscopie à super-résolution. De plus, nous avons étudié le rôle de Lsr2 dans la résistance aux antibiotiques en menant des expériences d'infection de macrophages et en utilisant des souches mutantes pour *lsr2* dans des conditions de traitement antibiotique.

Lsr2 : un régulateur transcriptionnel pléiotropique chez *M. abscessus*

Par le biais du RNA-seq, nous avons tout d'abord démontré le rôle régulateur important de Lsr2 dans l'expression de nombreux gènes impliqués dans divers processus liés à l'adaptation à l'hôte et la résistance aux antibiotiques à la fois chez Mabs-S et Mabs-R. Le rôle répresseur de Lsr2, tel qu'il a été démontré chez d'autres mycobactéries (Bartek *et al.*, 2014) (Kołodziej, Łebkowski, *et al.*, 2021), a également été confirmé par notre étude transcriptomique chez *M. abscessus*. Plus de 55% et 70% des gènes régulés par Lsr2, ont montré une surexpression en absence de *lsr2* chez Mabs-S et Mabs-R, respectivement. Bien que son effet régulateur ait été observé à la fois chez Mabs-S et Mabs-R, le nombre de gènes régulés par Lsr2 varie selon le morphotype. Seuls 126 gènes sont régulés de manière similaire, tandis que 67.2 % et 41.4 % des gènes dérégulés sont spécifiques à Mabs-S et Mabs-R, respectivement. Ces résultats nous ont permis de mettre en évidence un rôle régulateur différent pour Lsr2 en fonction de la physiologie du morphotype. A ce titre, la possibilité d'étudier les variations fonctionnelles de Lsr2 en fonction du morphotype se révèle un avantage significatif, contrairement aux autres mycobactéries, telles que *M. tuberculosis*, qui ne présente qu'un seul morphotype rugueux.

Les analyses que nous avons menées pour caractériser le rôle de Lsr2 ont révélé sa contribution à la régulation de l'expression des gènes liés à la croissance et à la survie intracellulaire, à la virulence et à la pathogénicité. De plus, nous avons confirmé le rôle de Lsr2 dans la biosynthèse et le transport des GPLs, la résistance aux antimicrobiens, ainsi que la régulation des protéines transporteuses. Un effet significatif de Lsr2 sur le transport de divers substrats tels que la méthionine, le soufre et le fer a été démontré par une analyse GO (Gene Ontology) à la fois chez Mabs-S et Mabs-R. Cependant, un impact spécifique de Lsr2 sur l'activité métabolique des lipides a été observé chez Mabs-S, reflétant la différence de régulation des gènes entre Mabs-S et Mabs-R en ce qui concerne la composition de leur paroi cellulaire en ces composés. De plus, par une analyse KEGG, nous avons mis en évidence un rôle régulateur de Lsr2 dans le métabolisme énergétique de *M. abscessus*, avec un impact plus marqué sur la bêta-oxydation des acides gras, et la dégradation des acides aminés. Conformément à une étude antérieure menée par l'équipe (Dubois *et al.*, 2019), il a été démontré que lors de l'infection des macrophages, *M. abscessus* effectue une transition métabolique, passant de l'utilisation du glucose à l'utilisation des acides gras comme source de carbone. Ces résultats suggèrent un lien entre ce changement métabolique observé et le rôle régulateur de Lsr2.

En accord avec les précédents résultats du laboratoire démontrant l'effet de Lsr2 dans la survie et la croissance intracellulaire de *M. abscessus* durant sa vie intracellulaire dans les

amibes et les macrophages, ainsi que dans la résistance aux ROS (Le Moigne *et al.*, 2019), notre analyse révèle l'implication de Lsr2 dans le contrôle de l'expression de plusieurs gènes impliqués dans ces processus. Parmi eux, nous retrouvons *eis2* (Dubois *et al.*, 2019), *MAB_4324c* (Alsarraf *et al.*, 2022) et les gènes *paa* (Hunt *et al.*, 2004) (Hooppaw *et al.*, 2022). Notre équipe avait déjà mesuré une hausse d'expression du gène *eis2* pendant la croissance intracellulaire de la bactérie (Dubois *et al.*, 2019). L'inactivation de ce gène a montré un défaut de survie intracellulaire de *M. abscessus* après phagocytose par les macrophages. De même, la perte d'*eis2* rend *M. abscessus* plus sensible aux ROS, en particulier à l'H₂O₂, et entraîne son incapacité à endommager la membrane phagosomale afin d'établir le contact entre phagosome et cytosol (Dubois *et al.*, 2019). En outre, au sein de cette même catégorie de gènes liés à la croissance intracellulaire, les gènes *nrdE* et *nrdF* voient leur expression régulée de manière opposée par Lsr2 (activée chez Mabs-R et réprimée chez Mabs-S). Les gènes du locus *nrd* sont connus pour leur implication dans la voie du métabolisme des nucléotides ainsi que dans la persistance des mycobactéries au sein des phagolysosomes. Pawlik et ses collaborateurs (2013) ont montré que les gènes *nrd* figurent parmi les gènes les plus exprimés durant la transition S/R (Pawlik *et al.*, 2013). Cette observation suggère que Lsr2 jouerait un rôle précoce dans cette différence d'expression entre les deux morphotypes de *M. abscessus*.

Notre analyse a aussi montré une différence dans la régulation de l'expression des gènes *mce* par Lsr2 entre Mabs-S et Mabs-R. Ces gènes sont impliqués dans les mécanismes d'invasion des mycobactéries et de reconnaissance des cellules hôtes (El-Shazly *et al.*, 2007) (Stavrum *et al.*, 2012). En effet, les gènes *mceA*, *mceB* et *mceC* font partie des gènes dont l'expression est uniquement activée par Lsr2 chez Mabs-S. Cette régulation spécifique chez le morphotype S s'explique par le fait que ce dernier est la forme infectante, responsable de l'invasion des cellules hôtes, soulignant ainsi l'importance du rôle régulateur de Lsr2 dans processus d'invasion.

Le transport à travers la membrane bactérienne est un processus essentiel pour la régulation des flux de composés tels que les toxines, les vitamines et les antibiotiques, la communication intercellulaire et le maintien de l'homéostasie (Thomas and Tampé, 2020). Chez les mycobactéries, ce processus physiologique est essentiellement assuré par les protéines MmpL. Selon notre étude transcriptomique, plusieurs de ces protéines sont des cibles de Lsr2, à la fois chez Mabs-S et Mabs-R. Parmi celles-ci, nous avons identifié la protéine MmpL8, dont la production est différenciellement régulée par Lsr2 entre Mabs-S (activation) et Mabs-R (répression). En plus de son rôle dans la croissance intracellulaire de *M. abscessus*

et dans la virulence chez les modèles murins et les poissons-zèbres, la protéine MmpL8 est impliquée dans la synthèse d'un glycopeptidolipide (GDND), dont le rôle biologique demeure encore inconnu à ce jour (Dubois *et al.*, 2018). Nous ignorons les conséquences de ce rôle antagoniste de Lsr2 dans la régulation de l'expression du gène *mmpL8* entre les deux morphotypes. Etant donné que MmpL8 est impliquée dans la production du GDND, nous supposons que Lsr2 joue un rôle majeur dans la régulation de la production de ce composé au niveau de la membrane de *M. abscessus*, qui pourrait également être un déterminant important de la transition S/R. D'autres expériences seront nécessaires afin de déterminer l'effet de la mutation de *lsr2* sur la production de GDND chez Mabs-S et Mabs-R. D'autres gènes codant des MmpLs, tels que *MAB_2037* et *MAB_2075*, sont notamment régulés par Lsr2 qui réprime leur expression chez Mabs-S et Mabs-R. Ces gènes semblent également jouer un rôle dans la virulence de *M. abscessus*, comme le suggèrent les résultats préliminaires de notre équipe, tant chez la souris que chez les macrophages.

Plusieurs études ont mis en évidence le rôle de Lsr2 dans la régulation des gènes responsables de la synthèse et le transport des GPLs, ces lipides pariétaux complexes principalement retrouvés chez les MNT. La délétion de *lsr2* conduit à une augmentation de la production des GPLs chez *M. smegmatis* (Chen *et al.*, 2006). Ces composés lipidiques, en quantité importante, jouent un rôle majeur dans la structuration de la paroi des MNT. Leur présence ou absence, qui conditionne respectivement l'existence de formes lisses ou rugueuses, affecte la motilité, la capacité de formation de biofilm, ainsi que la virulence (Gutiérrez *et al.*, 2018). Notre équipe a déjà montré que Lsr2 peut lier le promoteur de l'opéron *mps*, impliqué dans la biosynthèse des GPLs chez *M. abscessus* (Le Moigne *et al.*, 2019), résultat confirmé également par notre étude de ChIP-seq. Cependant, la mutation de *lsr2* n'a pas rétabli la production de GPLs chez Mabs-R. Ces résultats coïncident avec l'identification d'une insertion CG dans la région 5' du gène *mps1* du génome des souches CIP, qui a pour conséquence l'abolition complète de la production de transcrits de l'opéron *mps1-mps2-gap* dans ce morphotype (Pawlik *et al.*, 2013). Remarquablement, nos données de RNA-seq ont démontré que la délétion de *lsr2* peut rétablir l'élongation de ce transcrit chez Mabs-R à des niveaux comparables à ceux observés dans Mabs-S. Néanmoins, la présence de cette insertion est susceptible de résulter en une protéine non fonctionnelle, empêchant ainsi la bactérie de revenir à un morphotype lisse. Ce résultat suggère néanmoins un rôle probable pour Lsr2 dans le mécanisme du dégradosome de l'ARN (Płociński *et al.*, 2019) chez Mabs-R en régulant les enzymes appartenant au complexe du dégradosome qui agissent sur la cinétique d'élongation du transcrit de l'opéron *mps1*, favorisant ainsi son élimination. D'autres hypothèses qui pourraient expliquer cette observation incluent un rôle pour Lsr2 dans la

régulation de la dynamique de la transcription et de l'avancement de l'ARN polymérase, en agissant par le biais du pontage ou par des modifications de la topologie locale de l'ADN. Étant donné que la progression de l'ARN polymérase est fortement influencée par le niveau de surenroulement de l'ADN (Peter *et al.*, 2004), il est envisageable que Lsr2 participe au maintien des contraintes sur l'ADN chez Mabs-R, tel qu'il a aussi été proposé pour d'autres NAPs, comme son orthologue H-NS (Arold *et al.*, 2010). En l'absence de *lsr2*, ces contraintes pourraient se relâcher, ce qui faciliterait à nouveau l'élongation du transcript *mps1* par l'ARN polymérase.

M. abscessus se distingue par sa grande résistance à un large éventail d'antibiotiques, rendant les infections à cette mycobactérie extrêmement difficile à traiter. Cette résistance en fait un agent infectieux nosocomial majeur, responsable de nombreuses épidémies lors de pratiques cliniques avec des matériaux contaminés (Chopra *et al.*, 2011). En effet, le traitement de 60% des cas d'infections suite à une résistance inductible aux macrolides se solde par un échec (Daley *et al.*, 2020) (Illouz *et al.*, 2021). Le rôle de Lsr2 comme modulatrice de la résistance aux antibiotiques a été déjà démontré chez d'autres mycobactéries (Colangeli *et al.*, 2007) (Kołodziej, Łebkowski, *et al.*, 2021). Les résultats de notre étude transcriptomique ont mis en évidence une augmentation de l'expression de certains gènes (*eis2*, *erm41*, *MAB_2355*, *MAB_1409*) associés à la résistance aux macrolides et aux aminoglycosides dans les souches sauvages de Mabs-S et Mabs-R par rapport aux souches mutantes *lsr2*. Ces deux familles d'antibiotiques sont parmi les plus utilisées dans le traitement clinique contre *M. abscessus* (Illouz *et al.*, 2021). La détermination des CMI pour l'amikacine, la tobramycine et la clarithromycine a permis de confirmer le précédent résultat en montrant une sensibilité accrue des souches mutantes pour *lsr2*. La tobramycine ne peut être utilisée lors du traitement, car *M. abscessus* présente une résistance particulièrement importante pour cette molécule (Yakrus *et al.*, 2001). L'absence de *lsr2* entraîne une réduction de la CMI d'un facteur de dilution pour cette molécule par rapport aux souches sauvages. Nous avons comparé la survie et la croissance intracellulaire des souches sauvages et mutantes pour *lsr2* après infection des macrophages et traitement avec de l'amikacine liposomale et de la clarithromycine. Nous avons observé que la mutation de *lsr2* entraîne une sensibilité significativement accrue aux deux antibiotiques testés, et ce pour les deux morphotypes à partir du troisième jour post-traitement. Cette sensibilité accrue aux antibiotiques en l'absence de *lsr2* s'explique, d'une part, par la hausse de l'expression des gènes *eis2*, *erm41*, *MAB_2355* et *MAB_1409*, comme le montre notre étude, et d'autre part, par un effet indirect de Lsr2 dans la régulation de la transcription de certains gènes codant pour des enzymes liées au métabolisme des lipides de la paroi cellulaire, modifiant ainsi sa perméabilité, comme cela a déjà été suggéré par

Kołodziej et ses collaborateurs (2021). Ces auteurs ont en effet observé une sensibilité accrue des cellules à l'acide nalidixique et à la rifampicine, ainsi qu'une augmentation de la perméabilité de la vancomycine à travers la paroi cellulaire après avoir muté *lsr2* (Kołodziej, Łebkowski, *et al.*, 2021). Pour conclure, l'ensemble de ces résultats témoigne clairement d'un rôle majeur de Lsr2 dans l'infectiosité et la persistance de *M. abscessus* lors de sa phase de vie intracellulaire. Le rôle de Lsr2 comme régulateur transcriptionnel global a aussi été bien étudié chez *M. tuberculosis*, qui joue principalement un rôle dans la régulation des gènes impliqués dans la persistance de l'infection et dans l'adaptation aux conditions extrêmes, telles que la diminution de la disponibilité en oxygène (Bartek *et al.*, 2014).

Analyse de la distribution génomique et de la localisation subcellulaire de Lsr2 chez *M. abscessus*

L'étude de la fixation des NAPs en tant que facteurs de transcription sur le chromosome bactérien a révélé leur capacité à lier une partie importante du génome bactérien (Gordon *et al.*, 2010) (Kahramanoglou *et al.*, 2011) (Prieto *et al.*, 2012). A la suite de notre étude transcriptomique, nous avons évalué la distribution de la protéine Lsr2 sur les génomes de Mabs-S et Mabs-R en utilisant la méthode de ChIP-seq. Nous avons mesuré un enrichissement global pour Lsr2 sur 7% des gènes, chiffre sensiblement moins important que les 21% et 13% détectés chez *M. tuberculosis* (Gordon *et al.*, 2010) et *M. smegmatis* (Kołodziej, Łebkowski, *et al.*, 2021), respectivement. En ce qui concerne les modalités de fixation de Lsr2, nous avons d'abord démontré une distribution sous forme de longs domaines de liaison, pouvant s'étendre jusqu'à 6 kb dans certaines régions du génome, notamment celles comprenant les gènes codant pour les protéines MmpL et pour les gènes ribosomiaux. Cette caractéristique s'expliquerait par la capacité de la protéine à s'oligomériser, une caractéristique déjà démontrée *in vitro* (Chen *et al.*, 2008) et confirmée par ChIP-seq chez *M. tuberculosis* (Gordon *et al.*, 2010b). Le même type de fixation a été aussi décrite pour son orthologue H-NS chez *E. coli* (Kahramanoglou *et al.*, 2011). De même, nous avons confirmé chez *M. abscessus* la préférence de Lsr2 à lier les séquences riches en AT (43 % en moyenne), par rapport à la teneur moyenne en AT observée dans le génome de *M. abscessus* (35.9 %) (Ripoll *et al.*, 2009). Il a été suggéré que comme H-NS, Lsr2 jouerait un rôle en tant que répresseur xénogénique de régions acquises par transfert horizontal, souvent riches en AT (Navarre *et al.*, 2006) (Gordon *et al.*, 2011). Cependant, notre étude n'a pas montré de fixation préférentielle de Lsr2 sur ces régions. Nous avons enfin tenté de déterminer une séquence spécifique de liaison Lsr2 par analyse de motif à partir de nos données de ChIP-seq. Malheureusement, aucun motif statistiquement significatif n'est ressorti de cette analyse.

Ceci tend à confirmer les résultats obtenus chez *M. tuberculosis* et *M. smegmatis*, qui suggèrent que la fixation de Lsr2 ne serait pas spécifique, contrairement à d'autres NAPs tel que H-NS (Bouffartigues *et al.*, 2007), Fis (Kahramanoglou *et al.*, 2011) et IHF (Prieto *et al.*, 2012). De façon surprenante, cette distribution est entièrement similaire entre Mabs-S et Mabs-R, résultats confirmés par une comparaison statistique des pics à l'aide du paquet R « Diffbind ». Lsr2 se fixe à plusieurs catégories de gènes chez *M. abscessus*, notamment ceux liés au métabolisme, à la respiration, à l'immunogénicité et aux facteurs de transcription. Il est important de noter des différences significatives dans les fixations de Lsr2 chez *M. abscessus* et *M. tuberculosis*, où nous n'ont révélé ni une fixation et ni un effet régulateur sur les gènes codant les protéines impliquées dans les systèmes de sécrétion de types VII ou des protéines PE/PPE, comme il a été observé chez ce dernier (Gordon *et al.*, 2010). Ces observations mettent en évidence le fait que les cibles de Lsr2 ne sont pas conservées entre les différentes espèces de mycobactéries. En parallèle, nous avons complété notre analyse par ChIP-seq en étudiant la localisation subcellulaire de Lsr2 à l'échelle de la cellule à l'aide de deux lignées Mabs-S-Lsr2-mEos3.2 et Mabs-R-Lsr2-mEos3.2 par microscopie confocale "spinning disk". Nous avons observé que, chez Mabs-S et Mabs-R, Lsr2 adopte une structure en forme d'anneau entourant le nucléoïde, avec uniquement deux à trois foyers intenses. Cette observation semble diverger des résultats obtenus par ChIP-seq concernant la répartition de Lsr2 le long du chromosome. Des résultats similaires ont été rapportés pour *M. smegmatis*, où Lsr2 est observée sous forme d'un ou deux foyers majeurs discrets et lumineux (Kołodziej, Trojanowski, *et al.*, 2021). Cette étude a expliqué cette divergence par la formation de grands complexes nucléoprotéiques dynamiques par Lsr2 qui seront responsable de ces foyers intenses, et a proposé que le domaine d'oligomérisation N-terminal de Lsr2 soit essentiel à la formation de ces foyers. La localisation de Lsr2 chez *M. smegmatis* en tant qu'un seul complexe nucléoprotéique proche de la région oriC a été étroitement associée aux réplisomes, suggérant ainsi son implication potentielle dans la régulation de la réplication de l'ADN (Kołodziej, Trojanowski, *et al.*, 2021). De plus, la division du complexe unique en deux parties qui se dirigent vers les pôles cellulaires opposés en coordination avec les ségrosomes démontre ainsi l'implication de Lsr2 dans le processus de ségrégation des chromosomes. Si pour H-NS, il avait été faussement décrit comme étant capable de former des foyers discrets en utilisant des protéines fluorescentes qui s'agrégeaient, une étude plus récente menée par la même équipe en utilisant mEos3.2 a contredit les résultats antérieurs et a révélé que H-NS apparaît beaucoup plus dispersée et uniformément répartie dans les nucléoïdes (Wang *et al.*, 2014). Cette observation met en évidence une différence fondamentale entre la localisation subcellulaire de Lsr2 et celle de son orthologue H-NS à l'ADN, malgré leurs modalités de

fixation similaires. Pourtant, nos observations montrant une concentration de Lsr2 dans des foyers discrets et colocalisés avec le nucléoïde de *M. abscessus* semblent être loin d'un artefact. Dans nos expériences, nous avons employé la protéine mEos3.2, connue pour être monomérique (Zhang *et al.*, 2012), et que nous avons inséré au niveau même endogène de Lsr2, afin de prévenir tout problème de surexpression et d'agrégation. Cependant, l'obtention de nouvelles lignées dans lesquelles Lsr2 sera fusionné avec d'autres protéines fluorescentes à nouveau en C-terminal, mais aussi du côté N-terminal de Lsr2 permettront de définitivement confirmer ce patron d'expression. Afin d'évaluer l'impact du domaine N-terminal sur l'oligomérisation de Lsr2 chez *M. abscessus in vivo*, nous avons mené des expériences de ChIP-seq après l'avoir délété son gène dans des souches Mabs-S-Lsr2_{ΔNTD}-FLAG et Mabs-R-Lsr2_{ΔNTD}-FLAG. Les résultats obtenus ont clairement montré une absence totale de fixation de Lsr2 sur le génome. L'élimination du domaine N-terminal de Lsr2 chez *M. smegmatis* a conduit à une modification de sa localisation sous forme d'un signal de fluorescence diffus le long de la cellule entière (Kołodziej, Trojanowski, *et al.*, 2021). Ces résultats viennent confirmer le rôle majeur du domaine N-terminal dans la fixation ainsi que la formation de complexes nucléoprotéiques impliquant Lsr2 et observés *in vivo*. Pour H-NS, il a été rapporté que le site 2 du domaine N-terminal jouait un rôle spécifique dans l'oligomérisation, tandis que le site 1 était impliqué dans sa dimérisation (Yamanaka *et al.*, 2018). Ceci ouvre la voie à d'autres constructions possibles pour Lsr2 dans lesquelles seul le site 2 du domaine N-terminal serait muté pour inhiber son oligomérisation, tout en lui permettant de continuer à se lier à l'ADN en tant que dimères.

Analyse intégrative RNA-seq et ChIP-seq

Afin d'approfondir notre étude du rôle transcriptionnel de Lsr2 chez *M. abscessus*, nous avons réalisé une analyse intégrative des données obtenues par RNA-seq et ChIP-seq. Celle-ci nous a permis de confirmer le rôle répressif de Lsr2, où les gènes cibles directs sont plus fortement réprimés par rapport à l'ensemble des gènes régulés. Cette activité de répression se manifeste principalement au niveau des régions codantes des gènes (CDS), avec Lsr2 présentant une préférence plus marquée pour fixer le corps, plus que le promoteur de ces gènes cibles. Nous avons constaté que les gènes cibles directs de Lsr2, liés par de longs domaines de liaison de plus de 1 kb, sont les plus fortement réprimés. Le rôle de l'oligomérisation de H-NS ainsi que le pontage de l'ADN dans le mécanisme de répression a été clairement démontré *in vitro* en perturbant l'élongation des transcrits suite à la réduction la processivité de l'ARN polymérase et à l'augmentation de ses pauses passage (Kotlajich *et al.*, 2015) (Wade and Grainger, 2018). Cependant, le rôle de Lsr2 demeure indéterminé et

nécessite davantage d'études chez les mycobactéries. Nous supposons que Lsr2 pourrait utiliser un mécanisme de répression similaire à celui observé avec H-NS. Les expériences de retard sur gel, d'AFM (Chen *et al.*, 2008) et de microscopie électronique menées *in vitro* sur Lsr2 (Colangeli *et al.*, 2009) ont montré sa capacité d'oligomérisation et son effet dans le pontage de l'ADN. Finalement, nous avons constaté que de nombreux gènes régulés par Lsr2 ne présentent aucune modification d'expression chez les mutants. Cette observation nous amène à envisager l'hypothèse que l'activité de pontage médiée par Lsr2 et son influence sur la structure de l'ADN pourraient jouer un rôle dans la régulation de la transcription.

Etude 3D du chromosome de *M. abscessus* par Hi-C et 3C-qPCR

Pendant les dix dernières années, la méthode de Hi-C a permis de résoudre la conformation 3D d'un nombre croissant de génomes bactériens. Ces travaux ont permis par exemple la caractérisation de grands domaines topologiques, les CID, qui représentent un niveau crucial dans l'organisation hiérarchique du chromosome (Le *et al.*, 2013) (Lioy *et al.*, 2018). De même, le rôle des NAPs en tant qu'organiseurs architecturaux du chromosome a déjà été démontré à travers leur capacité à médier des contacts à courtes (H-NS, Fis) ou même longues distances (HU, MatP), comme cela l'a été montré le génome d'*E. coli* (Lioy *et al.*, 2018), ainsi que dans la délimitation des domaines d'interactions chromosomiques, tel qu'établi pour Rok chez *B. subtilis* (Marbouty *et al.*, 2015). Pendant ma thèse j'ai mené des expériences de Hi-C à fin d'étudier la conformation 3D du chromosome des morphotypes S et R de *M. abscessus* et de mieux comprendre le rôle de Lsr2 dans son organisation. Nos résultats montrent la présence d'une deuxième diagonale sur l'ensemble de nos matrices de contact. Celles-ci sont caractéristiques d'interactions longues distances entre locus génomiques localisés sur les bras opposés du chromosome, une signature aujourd'hui bien connues de la disposition longitudinale du chromosome au sein de *M. abscessus*. Une configuration similaire a été mise en évidence chez d'autres bactéries, telles que *B. subtilis* et *C. crescentus* (Le *et al.*, 2013) (Marbouty *et al.*, 2015), mais pas chez *E. coli* (Lioy *et al.*, 2018). En revanche, quoique suggérés dans nos matrices de contact, l'identification précise des CIDs et de leurs frontières n'a pas été possible durant le cours de mon travail.

La mise en évidence d'un rôle de Lsr2 dans la formation de contacts au niveau du génome de *M. abscessus*, à l'instar d'autres NAPs, s'est aussi avérée difficile durant ma thèse. A plus long terme, il reste pertinent de tester l'effet de l'absence de Lsr2 par une analyse comparative de matrices de contact issues de souches sauvages et des souches mutantes pour ce gène. Cette approche demeure intéressante, notamment compte tenu de la capacité d'oligomérisation de Lsr2, ainsi que de sa capacité à réaliser des pontages de l'ADN observés

in vitro (Chen *et al.*, 2008). Ces caractéristiques pour Lsr2 pourraient potentiellement expliquer la formation de boucles chromosomiques, qui contribueraient à la création de domaines topologiques chez *M. abscessus*.

En parallèle, nous souhaitons tester par 3C-qPCR si les variations d'expression entre certains gènes cibles directs de Lsr2, observées malgré une fixation similaire sur les génomes de Mabs-S et Mabs-R, seraient dues à une différence de son activité dans l'organisation de la topologie de l'ADN. Nous avons choisi le locus *mmpL8* comme exemple de locus présentant une différence dans sa régulation par Lsr2 entre Mabs-S (activation) et Mabs-R (répression) afin d'évaluer la fréquence d'interaction physique entre les séquences d'ADN présentant un enrichissement pour Lsr2. Nos analyses ont révélé une interaction physique plus importante chez Mabs-R, soit 2.4 fois supérieure à celle observée chez Mabs-S pour ce locus. Il est important de noter que l'absence de *lsr2* n'a pas conduit à une perte des interactions entre les régions testées, à la fois chez les deux morphotypes. Chez Mabs-R, la mutation de *lsr2* a entraîné une diminution significative des interactions physiques entre les fragments d'ADN, tandis qu'une augmentation significative des interactions a été observée chez la souche Mabs-S- Δ *lsr2*. Ces observations suggèrent fortement un rôle de Lsr2 dans la modulation de ces interactions. Chez Mabs-R, Lsr2 favorise les interactions, ce qui peut augmenter la répression du locus *mmpL8*. En revanche, Lsr2 prévient la formation de boucles chez Mabs-S, ce qui pourrait positivement affecter la transcription de ce locus en inhibant les interactions entre les fragments d'ADN. Ces données montrent que bien que Lsr2 ne soit pas directement responsable de la formation de boucles dans cette région du génome, elle semble jouer un rôle dans la modulation des interactions, avec des effets différents chez les deux morphotypes. Cela suggère que d'autres protéines pourraient être impliquées dans la formation de ces boucles, ce qui rendrait intéressant d'étudier les déterminants qui conduisent à leur formation, y compris d'autres NAPs. Il est essentiel de souligner que ces observations n'ont, à ce jour, été réalisées que pour ce locus particulier. Cependant, notre équipe est en train de tester par 3C-qPCR d'autres loci, tels que le locus *GPL* et le locus *MAB_2037* pour parvenir à une conclusion définitive concernant le rôle du pontage de Lsr2 *in vivo* dans le mécanisme de répression.

Le zafirlukast : un médicament pour cibler Lsr2 ?

Lsr2, en tant que facteur transcriptionnel global chez les mycobactéries, constitue une cible médicamenteuse prometteuse contre les mycobactéries pathogènes. L'étude pionnière qui a testé l'effet du zafirlukast, une molécule thérapeutique pour l'asthme, sur l'activité de Lsr2 a montré un effet perturbateur sur l'interaction entre cette protéine avec l'ADN, avec pour conséquence une modification de la transcription des gènes ainsi que sur la croissance de *M. tuberculosis* (Pinault *et al.*, 2013). Nous avons entrepris d'évaluer l'effet du zafirlukast chez *M. abscessus* et plus particulièrement examiné son potentiel en tant que cible contre notre protéine d'intérêt. Nos résultats montrent que cette molécule est capable d'inhiber la prolifération de la croissance de *M. abscessus*. Des observations similaires ont aussi pu être faites chez *M. smegmatis* et *M. tuberculosis* ainsi que chez d'autres pathogènes oraux comme tels que *P. gingivalis* et *S. mutans* (Gerits *et al.*, 2017) (Howard and Garneau-Tsodikova, 2022). De manière surprenante, si des expériences *in vitro* ont montré une diminution de l'affinité de Lsr2 à l'ADN en présence de zafirlukast chez *M. tuberculosis* (Pinault *et al.*, 2013), nos expériences *in vivo* de ChIP-seq n'ont pas montré une perturbation de la fixation de Lsr2 sur le génome de *M. abscessus*. Nous avons aussi testé par RT-qPCR le niveau d'expression de *lsr2* ainsi que de certains de ses gènes cibles, suite à l'exposition de Mabs-S et Mabs-R au zafirlukast. Nos observations par rapport aux conditions de culture normales révèlent que l'expression de *lsr2* diminue, tandis que celle de son gène cible *eis2* augmente, et que l'effet répressif sur le gène cible *MAB_2037* semble partiellement levé. Ces résultats peuvent s'expliquer de deux manières : premièrement, le zafirlukast cible directement la protéine Lsr2, inhibant ainsi sa fonction et provoquant une perte progressive de son effet répresseur. Cela expliquerait l'augmentation significative de l'expression de ces gènes cibles. Notre deuxième explication repose sur le fait que ce composé stimule la protéine Lsr2, laquelle agit en augmentant son effet répressif, entraînant ainsi une répression plus marquée des répresseurs des gènes. Effectivement, *eis2* joue un rôle essentiel dans la croissance intracellulaire de *M. abscessus* et est un acteur clé dans la résistance aux antimicrobiens (Dubois *et al.*, 2019) (Ung *et al.*, 2019), d'où l'importance d'une augmentation de son niveau d'expression en conditions de stress. De plus, *MAB_2037* est un gène impliqué dans la synthèse et le transport des acides mycoliques, des composants majeurs de la paroi cellulaire des mycobactéries, conférant une résistance aux agents chimiques et aux environnements hostiles (Takayama, *et al.*, 2005). Par conséquent, le maintien de son expression à haut niveau demeure essentiel dans de telles conditions. Comparativement à ce qui avait été observé lors du traitement de *M. tuberculosis* par le zafirlukast, l'étude de l'expression des gènes *otsA*, *fbpC* et *sodA*, qui sont directement régulés par Lsr2 et jouent un rôle crucial dans la synthèse de la membrane

externe ainsi que dans la virulence, a révélé une augmentation significative de leur niveau d'expression (Pinault *et al.*, 2013). En résumé, l'effet de ce composé sur l'inhibition complète de la croissance de *M. tuberculosis*, *M. smegmatis* et *M. abscessus* pourrait découler de la surexpression de gènes considérés comme "toxiques" en raison de l'inhibition de l'activité de Lsr2. Toutefois, d'autres études *in vitro* et *in vivo* seront nécessaires pour évaluer l'effet de ce médicament sur la protéine Lsr2 chez d'autres espèces de mycobactéries pathogènes, ainsi que pour révéler son potentiel thérapeutique dans la lutte contre les infections bactériennes.

Conclusion :

Cette thèse a permis de mettre en lumière le rôle moléculaire de Lsr2 à la fois chez Mabs-S et Mabs-R en tant que protéine associée au nucléoïde. Nos résultats ont révélé que Lsr2 exerce une influence significative sur l'expression de nombreux gènes impliqués dans divers aspects de l'adaptation à l'hôte, la résistance aux antibiotiques, la croissance intracellulaire, ainsi que la régulation métabolique, en particulier le métabolisme des lipides, aussi bien *in vitro* que lors d'infections cellulaires. La mutation de *lsr2* entraîne une sensibilité accrue aux antibiotiques à la fois lors de cultures planctoniques, ainsi que lors de la croissance intracellulaire. De manière intéressante, son rôle en tant que facteur de transcription peut évoluer en réponse à des conditions de stress, telles que l'exposition à des molécules antimicrobiennes comme le zafirlukast, l'amikacine, et l' H_2O_2 , ce qui est essentiel pour la survie et l'adaptation de *M. abscessus* dans des environnements changeants. De plus, la distribution pangénomique de Lsr2 dans le génome de *M. abscessus* a montré une préférence pour l'ADN riche en AT, avec une activité répressive liée à sa capacité d'oligomérisation au niveau des promoteurs et des CDS. L'observation d'une structure en forme d'anneau pour Lsr2 dans une région contrainte du nucléoïde révèle sa capacité à former des complexes nucléoprotéiques jouant un rôle dans l'organisation du nucléoïde. Les analyses 3C ont révélé des interactions physiques dépendantes de Lsr2, notamment au locus *mmpL8*, suggérant un rôle clé dans la régulation de l'expression des gènes. Les expériences Hi-C ont fourni des informations préliminaires sur la structure tridimensionnelle et la disposition du chromosome de *M. abscessus*, mise en évidence par des interactions inter-bras. Dans l'ensemble, nos résultats suggèrent que Lsr2 pourrait être une excellente cible médicamenteuse, dont l'inhibition pourrait contribuer à une réduction de la résistance aux antibiotiques et à l'éradication de *M. abscessus*, en particulier chez les patients les plus susceptibles, tels que ceux atteints de mucoviscidose.

Matériels et Méthodes

Cette section contient les matériels et méthodes des parties II, III, IV et V des résultats. Le manuscrit (partie I - résultats) contient ses propres matériels et méthodes.

Préparation des banques Hi-C, séquençage Illumina et analyse des données.

Les bactéries Mabs-S et Mabs-R ont été cultivées à 37°C en condition aérobie dans du milieu Middlebrook 7H9 (Sigma-Aldrich) additionné de 1% de glucose, 0.2% de glycérol et 0.05% de Tween 80 (pour Mabs-R). Environ 2.4×10^8 cellules ($DO_{600} = 0.6$) sont d'abord fixées avec 3% de formaldéhyde (Sigma-Aldrich) pendant 30 minutes à température ambiante. La réticulation est arrêtée avec de la glycine (2.5M) et les bactéries sont lavées avec du tampon phosphate-saline (PBS), puis lysées à l'aide d'un homogénéiseur « Precellys » (3 cycles : 8 700 rpm - 3 x 20 s ON/60 s OFF) (Bertin Technologies). Le génome bactérien est ensuite digéré avec l'enzyme de restriction SalI (20 unités) (New England Biolabs, NEB) à 37°C pendant 16 heures (900 rpm, 30s on, 4 min off). Les extrémités des fragments digérés sont ensuite remplies à l'aide du fragment Kleenow de l'ADN polymérase I (30 U) (NEB) en présence des quatre nucléotides, dont le dCTP marqué à la biotine, pendant 4 h à 23 °C (900 rpm, 30s on, 4 min off). La réaction de ligation est réalisée dans un volume de 1 mL en utilisant la T4 DNA ligase (6000 U) (NEB), pendant 16 heures à 16 °C. Après réversion de la fixation à 65 °C pendant 4 heures à 450 rpm en présence de protéinase K (Qiagen) et de NaCl, l'échantillon subit un traitement exonucléasique avec la T4 DNA polymérase (NEB) à 16 °C pendant 3 heures à 450 rpm. L'ADN est ensuite purifié en utilisant le kit « Genomic DNA Clean & Concentrator kit » (Ozyme), puis fragmenté enzymatiquement (Ultra II FS, NEB) pendant 10 minutes à 37 °C. Un « pull-down » est effectué en utilisant des billes magnétiques couplées à de la streptavidine (MyOne Streptavidin C1 beads – Invitrogen) pendant 15 minutes à température ambiante. La banque ainsi obtenue est ensuite préparée pour le séquençage haut-débit à l'aide du kit « NEBNext® Ultra™ II FS DNA Library Prep Kit for Illumina (NEB) » et séquencée en « paired-end » sur une plateforme Illumina Next-seq500 (UFR Sciences de la Santé, Montigny-le-Bretonneux). Enfin, les lectures sont alignées sur le génome de référence de *M. abscessus* ATCC 19977 (numéro d'accession NCBI NC_010397), et les données de séquençage sont analysées grâce à le pipeline *hicstuff* (doi: 10.1007/978-1-0716-1390-0_1).

Préparation des banques 3C et analyse 3C-qPCR

Les banques 3C pour les souches Mabs-S, Mabs-S- Δ l sr 2, Mabs-R et Mabs-R- Δ l sr 2 (en trois réplicats) ont été construites comme décrit dans la partie préparation des banques Hi-C, pour les étapes de culture, fixation, digestion (BstYI (25 U)) et ligation. Pour la banque des jonctions (banque contrôle), les fragments d'ADN I+II, I+III et I+IV ont été synthétisés par PCR d'extension par chevauchement puis purifiés sur colonne (QIAquick PCR Purification Kit, Qiagen). Les amorces désignées sont à environ 50 pb en amont du site de restriction BstYI pour chaque fragment d'intérêt et les produits de PCR ont généralement une taille d'environ 100 à 200 pb. Une banque de contrôle contenant ces quatre fragments (1 pmol de chaque fragment) a été préparée à une concentration de départ de 10.0 fmol/ μ L, puis elle a été diluée jusqu'à atteindre une concentration de 10^{-6} fmol/ μ L. Cette banque d'ADN a été ensuite utilisée lors des tests de 3C-qPCR pour tracer les courbes d'étalonnage et normaliser l'efficacité d'amplification des différentes paires d'amorces. Les expériences 3C-qPCR ont été réalisées en utilisant la qPCR basée sur la sonde Taqman. Pour chaque banque 3C à tester, 5 ng d'ADN sont amplifiés par réaction. Les tests 3C-qPCR pour chaque interaction ont été effectués en trois réplicats techniques et trois réplicats biologiques à l'aide d'un thermocycleur CFX396 (Bio-Rad), en utilisant le kit iTaq Universal Probes Mix (Bio-Rad). Finalement, la fréquence relative des interactions à tester (I+II et I+IV) chez les 4 souches de *M. abscessus* a été déterminée en calculant le rapport entre la quantité initiale (Starting Quantity ou SQ) de l'ADN cible de chaque fragment test et le SQ de l'ADN cible du fragment de contrôle interne (I+III). Les séquences des amorces et de la sonde utilisées pour les expériences 3C-qPCR sont illustrées dans le **tableau 10**.

Construction des souches transgéniques Mabs-Lsr2-mEos3.2 et Mabs-Lsr2 $_{\Delta$ NTD-FLAG

Les souches de Mabs-Lsr2-mEos3.2 ont été construites par recombinaison homologue en remplaçant la séquence du gène qui code pour Lsr2 par la séquence d'ADN codante pour Lsr2-mEos3.2 au même locus endogène. Ces constructions ont été réalisées comme décrit précédemment dans notre article de recherche (Gerges *et al.*, Partie I - Résultats) pour la construction des souches Mabs-Lsr2-FLAG.

Pour la construction des souches Mabs-Lsr2 $_{\Delta$ NTD-FLAG, le plasmide pUC19-Lsr2-FLAG lequel a été employé dans la construction des souches Mabs-Lsr2-FLAG a été utilisé pour amplifier la région Lsr2 $_{\Delta$ NTD-FLAG. Par la suite, le produit PCR contenant Lsr2 $_{\Delta$ NTD-FLAG a été cloné dans le plasmide intégratif pMVH361, par une réaction de Gibson (NEB), dont l'expression du gène *lsr2* est régulée par son propre promoteur. Le produit du Gibson a été électroporé dans *E. coli* suivi d'une purification du plasmide. Le plasmide purifié a été

ensuite intégré dans les souches Mabs-S- Δ lsr2 et Mabs-R- Δ lsr2 au niveau de la région *attB* (site d'intégration dans le génome de *M. abscessus*) par électroporation. Les clones ont été sélectionnés sur milieu 7H11 (Sigma-Aldrich) contenant de l'hygromycine (Mylan) (500 μ g/ml), étant donné que le plasmide pMVH361 comporte une cassette de résistance à l'hygromycine. Ils ont ensuite été criblés par PCR, suivi d'une vérification de séquences (absence du domaine NTD et présence du domaine CTD) par séquençage de Sanger (Eurofins Scientific, Allemagne), et enfin par RT-qPCR. Les séquences des amorces utilisées pour la construction des souches sont illustrées dans le **tableau 10**.

Marquage des échantillons, microscopie confocale "spinning disk" et analyse d'images

Les bactéries ont été prélevées à une DO_{600} de 0.6 et fixées à l'aide de formaldéhyde 4% (Sigma-Aldrich) pendant 30 min. Le nucléoïde des bactéries a été marqué par du Hoechst 33342 (ThermoFisher) à 1 μ g/mL. Finalement, avant visualisation, les échantillons ont été ajoutés sur lame et immobilisés à l'aide d'un pad d'agarose 1%. Les acquisitions ont été réalisées avec un microscope Nikon Eclipse Ti E associé à un module confocal de type "Spinning Disk" (Yokogawa) et à un système à super-résolution Live SR 3D (Gataca systems). La capture des images a été effectuée avec un objectif 100x APO TIRF (Nikon) et une caméra Prime 95B (Photometrics) à l'aide du logiciel MetaMorph. L'ensemble des analyses d'images a été réalisé avec le logiciel Fiji2. Les profils de fluorescence ont été obtenus à l'aide du plugin Broadly Applicable Routines (BAR).

Test de l'activité bactéricide/bactériostatique du zafirlukast

Environ 5×10^5 CFU/mL de bactéries en phase de croissance exponentielle (DO_{600} : 0.4) ont été incubées avec le zafirlukast (Euromedex) à une concentration équivalant à 3 fois la CMI, soit 120 μ M et 144 μ M pour Mabs-S et Mabs-R, respectivement. L'évaluation de l'activité antimicrobienne du zafirlukast a été effectuée sur une période de 5 jours dans des plaques de 48 puits, pour trois réplicats biologiques pour chaque souche et avec une incubation des plaques à 30°C. Du jour 1 au jour 5, nous avons déterminé les CFUs sur des boîtes COS, en parallèle d'un contrôle positif correspondant à la même concentration initiale de bactéries mais sans l'ajout de traitement. Pour le jour 0, les CFUs ont été déterminées sans ajout de zafirlukast, après la préparation des dilutions de bactéries visant à obtenir une concentration d'environ 5×10^5 CFU/mL. Pour la détermination des CMIs, les tests ont été réalisés conformément aux recommandations du CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) et d'après (Gerges *et al.*, Partie I - Résultats).

Conditions de culture des bactéries pour les expériences de ChIP-seq et les extractions d'ARN (RT-qPCR) (traitements au zafirlukast, à l'amikacine et à l'H₂O₂)

Pour les expériences de ChIP-seq et d'extraction d'ARN (RT-qPCR), les bactéries ont été prélevées à une DO₆₀₀ de 0.6 puis traitées avec du zafirlukast à une concentration finale de 200 µM (5×CMI) et de l'amikacine (Mylan) à une concentration finale de 46.5 µg/mL (3×CMI) pendant 16 heures à 37°C. Pour le traitement à l'H₂O₂ (Sigma-Aldrich), les bactéries ont été incubées avec 50 mM d'H₂O₂ pendant 4 heures à 37°C. En parallèle, des bactéries ont été prélevées dans les mêmes conditions, mais sans traitement, afin de servir de conditions de contrôle. Les expériences de ChIP-seq, les extractions d'ARN, ainsi que les tests de RT-qPCR ont été menés conformément à notre étude (Gerges *et al.*, Partie I - Résultats).

Analyses statistiques

Les données recueillies ont été traitées à l'aide du logiciel GraphPad Prism 10.0.0 pour Windows (GraphPad Software Inc, États-Unis). Les valeurs de P pour les analyses de RT-qPCR ont été déterminées à l'aide du test de Student (*Student's t-test*). Avec ns (non significatif), * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ et **** $P < 0.0001$.

Tableau 10 : Liste des amorces utilisées dans les parties résultats II, III, IV et V, ainsi que leurs séquences.

Amorce	Séquence
5' Homology <i>lsr2</i> _region_Fwd	5'-aatgtatccgctcgttgcagaag-3'
5' Homology <i>lsr2</i> _region_Rev	5'-gttggccgcgttgaacgc-3'
<i>mEos3.2</i> _Fwd	5'-atgagtgcgattaagccagac-3'
<i>mEos3.2</i> _Rev	5'-tcgtcttcattgtcaggc-3'
<i>bleoR</i> _Fwd	5'-taggttaactagcgtacgatcgac-3'
<i>bleoR</i> _Rev	5'-ggctctgacgctcagtgggac-3'
3' Homology <i>lsr2</i> _region_Fwd	5'-tacgttcccgggacaatttc-3'
3' Homology <i>lsr2</i> _region_Rwd	5'-ctcgaatcaccgcggtag-3'
<i>lsr2</i> _{ΔNTD} _region_Fwd	5'-gaaatctagaaatgtatccgctcgttgcag-3'
<i>lsr2</i> _{ΔNTD} _region_Rev	5'-ttgatgcctgctacttgcctcgtcgtcc-3'
pMVH361_Fwd	5'-acgacaagtagcaggcatcaataaacgaaag-3'
pMVH361_Rev	5'-cggatacatttctagatttctggcgggaac-3'
<i>lsr2</i> _{NTD} _qPCR_Fwd	5'-gagaccgttgaattcgggtg-3'
<i>lsr2</i> _{NTD} _qPCR_Rev	5'-gctgattacgcagcttctcc-3'
<i>lsr2</i> _{CTD} _qPCR_Fwd	5'-gttgaacgcgtcgtcgacaact-3'
<i>lsr2</i> _{CTD} _qPCR_Rev	5'-acgtaagaacgggcacaatg-3'
<i>eis2</i> _qPCR_Fwd	5'-gtgttgtagcgtatcgcgac-3'
<i>eis2</i> _qPCR_Rev	5'-cggaaagaaagtcgtcgggtca-3'
<i>MAB_2037</i> _qPCR_Fwd	5'-gcagacacgcgatggcattaagt-3'
<i>MAB_2037</i> _qPCR_Rev	5'-gaaaccgtagagcgacctgaaagt-3'
<i>sigA</i> _Fwd	5'-tccgagaaagacaaggcttc-3'
<i>sigA</i> _Rev	5'-ccagctcgacttctcttcg-3'
Frag_I_eoPCR_Fwd	5'-gattccccccagctatcagcaagcccagcatctgcgc-3'
Frag_I_eoPCR_Rev	5'-gatctcgataggagcgcagatgctgggcttgct-3'
Frag_II_eoPCR_Fwd	5'-tctgcgtcctatcgagatcccacttctcatgactgccgc-3'
Frag_II_eoPCR_Rev	5'-catcgatgctcctcctggagcgcgcggcagtcaggaagtg-3'
Frag_III_eoPCR_Fwd	5'-atctgcgtcctatcgagatctggcctgctccttggctttcggttg-3'
Frag_III_eoPCR_Rev	5'-atcggcaggagtcaaccagggggcgcacaaaccgaaagccaaggag-3'
Frag_IV_eoPCR_Fwd	5'-tctgcgtcctatcgagatcccgatcaatcggacgctgtgggtatacat-3'
Frag_IV_eoPCR_Rev	5'-cttttattgcatggcgagcgattatgtatacccacagcgtcc-3'
Frag_I_qPCR	5'-gattccccccagctatcagca-3'
Frag_II_qPCR	5'-catcgatgctcctcctgg-3'
Frag_III_qPCR	5'-cttttattgcatggcgagcga-3'
Frag_IV_qPCR	5'-catcgatgctcctcctgg-3'
<i>mmpL8</i> _taqman_probe	5'-/56-FAM/ATCTCGATA/ZEN/GGAGCGCAGATGCT/3IABRFQ/-3'

Références Bibliographiques

Abidin, N.Z. *et al.* (2021) ‘Trends in nontuberculous mycobacteria infection in children and young people with cystic fibrosis’, *Journal of Cystic Fibrosis*, 20(5), pp. 737–741. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2020.09.007>.

Adékambi, T. *et al.* (2006) ‘rpoB gene sequence-based characterization of emerging non-tuberculous mycobacteria with descriptions of *Mycobacterium bolletii* sp. nov., *Mycobacterium phocaicum* sp. nov. and *Mycobacterium aubagnense* sp. nov.’, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56(Pt 1), pp. 133–143. Available at: <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63969-0>.

Adékambi, T. and Drancourt, M. (2004) ‘Dissection of phylogenetic relationships among 19 rapidly growing *Mycobacterium* species by 16S rRNA, hsp65, sodA, recA and rpoB gene sequencing’, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54(Pt 6), pp. 2095–2105. Available at: <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63094-0>.

Adjemian, J., Olivier, K.N. and Prevots, D.R. (2018) ‘Epidemiology of Pulmonary Nontuberculous Mycobacterial Sputum Positivity in Patients with Cystic Fibrosis in the United States, 2010-2014’, *Annals of the American Thoracic Society*, 15(7), pp. 817–826. Available at: <https://doi.org/10.1513/AnnalsATS.201709-727OC>.

Agustí, G. *et al.* (2008) ‘Surface spreading motility shown by a group of phylogenetically related, rapidly growing pigmented mycobacteria suggests that motility is a common property of mycobacterial species but is restricted to smooth colonies’, *Journal of Bacteriology*, 190(20), pp. 6894–6902. Available at: <https://doi.org/10.1128/JB.00572-08>.

Aitken, M.L. *et al.* (2012) ‘Respiratory outbreak of *Mycobacterium abscessus* subspecies *massiliense* in a lung transplant and cystic fibrosis center’, *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 185(2), pp. 231–232. Available at: <https://doi.org/10.1164/ajrccm.185.2.231>.

Akram, S.M., Rathish, B. and Saleh, D. (2023) ‘*Mycobacterium chelonae* Infection’, in *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK430806/> (Accessed: 18 July 2023).

Akrami, S., Dokht Khosravi, A. and Hashemzadeh, M. (2023) ‘Drug resistance profiles and related gene mutations in slow-growing non-tuberculous mycobacteria isolated in regional tuberculosis reference laboratories of Iran: a three year cross-sectional study’, *Pathogens and Global Health*, 117(1), pp. 52–62. Available at: <https://doi.org/10.1080/20477724.2022.2049029>.

de Alba, C.F. *et al.* (2011) ‘Essential residues in the H-NS binding site of Hha, a co-regulator of horizontally acquired genes in Enterobacteria’, *FEBS letters*, 585(12), pp. 1765–1770. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2011.05.024>.

de Alcântara, N.R. *et al.* (2020) ‘Dps protein is related to resistance of *Mycobacterium abscessus* subsp. *massiliense* against stressful conditions’, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(11), pp. 5065–5080. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10586-z>.

- Aldawood, E. and Roberts, I.S. (2022) 'Regulation of Escherichia coli Group 2 Capsule Gene Expression: A Mini Review and Update', *Frontiers in Microbiology*, 13, p. 858767. Available at: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.858767>.
- Ali, B.M. *et al.* (2001) 'Compaction of single DNA molecules induced by binding of integration host factor (IHF)', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(19), pp. 10658–10663. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.181029198>.
- Al-Mashdali, A.F. *et al.* (2022) 'Mycobacterium abscessus urinary tract infection in an immunocompetent host: A case report and literature review', *IDCases*, 29, p. e01538. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.idcr.2022.e01538>.
- Al-Obaidi, M.M.J. and Desa, M.N.M. (2018) 'Mechanisms of Blood Brain Barrier Disruption by Different Types of Bacteria, and Bacterial–Host Interactions Facilitate the Bacterial Pathogen Invading the Brain', *Cellular and Molecular Neurobiology*, 38(7), pp. 1349–1368. Available at: <https://doi.org/10.1007/s10571-018-0609-2>.
- Alqaseer, K. *et al.* (2019) 'Protein kinase B controls Mycobacterium tuberculosis growth via phosphorylation of the transcriptional regulator Lsr2 at threonine 112', *Molecular Microbiology*, 112(6), pp. 1847–1862. Available at: <https://doi.org/10.1111/mmi.14398>.
- Alsarraf, H.M.A.B. *et al.* (2022) 'Biochemical, structural, and functional studies reveal that MAB_4324c from Mycobacterium abscessus is an active tandem repeat N-acetyltransferase', *FEBS letters*, 596(12), pp. 1516–1532. Available at: <https://doi.org/10.1002/1873-3468.14360>.
- Amemiya, H.M., Schroeder, J. and Freddolino, P.L. (2021) 'Nucleoid-associated proteins shape chromatin structure and transcriptional regulation across the bacterial kingdom', *Transcription*, 12(4), pp. 182–218. Available at: <https://doi.org/10.1080/21541264.2021.1973865>.
- Amit, R., Oppenheim, A.B. and Stavans, J. (2003) 'Increased bending rigidity of single DNA molecules by H-NS, a temperature and osmolarity sensor', *Biophysical Journal*, 84(4), pp. 2467–2473. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(03\)75051-6](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(03)75051-6).
- Angenent, L.T. *et al.* (2005) 'Molecular identification of potential pathogens in water and air of a hospital therapy pool', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(13), pp. 4860–4865. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.0501235102>.
- Araj, G.F. *et al.* (2019) 'Non-tuberculous mycobacteria profiles and their anti-mycobacterial resistance at a major medical center in Lebanon', *Journal of Infection in Developing Countries*, 13(7), pp. 612–618. Available at: <https://doi.org/10.3855/jidc.11028>.
- Ares, M.A. *et al.* (2016) 'H-NS Nucleoid Protein Controls Virulence Features of Klebsiella pneumoniae by Regulating the Expression of Type 3 Pili and the Capsule Polysaccharide', *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 6, p. 13. Available at: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2016.00013>.
- Arold, S.T. *et al.* (2010) 'H-NS forms a superhelical protein scaffold for DNA condensation', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(36), pp. 15728–15732. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.1006966107>.

- Arora, K. *et al.* (2008) 'Inactivation of *lsr2* results in a hypermotile phenotype in *Mycobacterium smegmatis*', *Journal of Bacteriology*, 190(12), pp. 4291–4300. Available at: <https://doi.org/10.1128/JB.00023-08>.
- Arteta, A.A., Arias, L.F. and Cadavid, C.E. (2022) 'Ziehl-Neelsen stain in the pathology laboratory: Performance and diagnostic aid for mycobacteria in bronchoalveolar lavage', *Biomedica: Revista Del Instituto Nacional De Salud*, 42(3), pp. 460–469. Available at: <https://doi.org/10.7705/biomedica.6347>.
- Ates, L.S. (2020) 'New insights into the mycobacterial PE and PPE proteins provide a framework for future research', *Molecular Microbiology*, 113(1), pp. 4–21. Available at: <https://doi.org/10.1111/mmi.14409>.
- Ayala, J.C. *et al.* (2015) 'RNA-Seq analysis and whole genome DNA-binding profile of the *Vibrio cholerae* histone-like nucleoid structuring protein (H-NS)', *Genomics Data*, 5, pp. 147–150. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.gdata.2015.05.039>.
- Azam, T.A. and Ishihama, A. (1999) 'Twelve species of the nucleoid-associated protein from *Escherichia coli*. Sequence recognition specificity and DNA binding affinity', *The Journal of Biological Chemistry*, 274(46), pp. 33105–33113. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.274.46.33105>.
- Azuma, T. and Kei, T. (2015) 'Super-resolution spinning-disk confocal microscopy using optical photon reassignment', *Optics Express*, 23(11), pp. 15003–15011. Available at: <https://doi.org/10.1364/OE.23.015003>.
- Bailo, R., Bhatt, A. and Aínsa, J.A. (2015) 'Lipid transport in *Mycobacterium tuberculosis* and its implications in virulence and drug development', *Biochemical Pharmacology*, 96(3), pp. 159–167. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2015.05.001>.
- Bakala N'Goma, J.C. *et al.* (2015) 'Mycobacterium abscessus phospholipase C expression is induced during coculture within amoebae and enhances M. abscessus virulence in mice', *Infection and Immunity*, 83(2), pp. 780–791. Available at: <https://doi.org/10.1128/IAI.02032-14>.
- Bartek, I.L. *et al.* (2014) 'Mycobacterium tuberculosis *Lsr2* is a global transcriptional regulator required for adaptation to changing oxygen levels and virulence', *mBio*, 5(3), pp. e01106-01114. Available at: <https://doi.org/10.1128/mBio.01106-14>.
- Beckham, K.S.H. *et al.* (2017) 'Structure of the mycobacterial ESX-5 type VII secretion system membrane complex by single-particle analysis', *Nature Microbiology*, 2, p. 17047. Available at: <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2017.47>.
- Behra, P.R.K. *et al.* (2022) 'Comparative genome analysis of mycobacteria focusing on tRNA and non-coding RNA', *BMC genomics*, 23(1), p. 704. Available at: <https://doi.org/10.1186/s12864-022-08927-5>.
- Belon, C. *et al.* (2014) 'Mycobacterium marinum *MgtC* plays a role in phagocytosis but is dispensable for intracellular multiplication', *PloS One*, 9(12), p. e116052. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0116052>.
- Benwill, J.L. and Wallace, R.J. (2014) 'Mycobacterium abscessus: challenges in diagnosis and treatment', *Current Opinion in Infectious Diseases*, 27(6), pp. 506–510. Available at: <https://doi.org/10.1097/QCO.0000000000000104>.

Bernatoniene, J. *et al.* (2008) 'Induction of CC and CXC chemokines in human antigen-presenting dendritic cells by the pneumococcal proteins pneumolysin and CbpA, and the role played by toll-like receptor 4, NF-kappaB, and mitogen-activated protein kinases', *The Journal of Infectious Diseases*, 198(12), pp. 1823–1833. Available at: <https://doi.org/10.1086/593177>.

Bernut, A. *et al.* (2014) 'Mycobacterium abscessus cording prevents phagocytosis and promotes abscess formation', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(10), pp. E943–E952. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.1321390111>.

Bernut, A. *et al.* (2016) 'Insights into the smooth-to-rough transitioning in *Mycobacterium boletii* unravels a functional Tyr residue conserved in all mycobacterial MmpL family members', *Molecular Microbiology*, 99(5), pp. 866–883. Available at: <https://doi.org/10.1111/mmi.13283>.

Bernut, A. *et al.* (2017) 'The Diverse Cellular and Animal Models to Decipher the Physiopathological Traits of *Mycobacterium abscessus* Infection', *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7, p. 100. Available at: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00100>.

Bernut, A. *et al.* (2019) 'CFTR Protects against *Mycobacterium abscessus* Infection by Fine-Tuning Host Oxidative Defenses', *Cell Reports*, 26(7), pp. 1828–1840.e4. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.01.071>.

Betts, J.C. *et al.* (2002) 'Evaluation of a nutrient starvation model of *Mycobacterium tuberculosis* persistence by gene and protein expression profiling', *Molecular Microbiology*, 43(3), pp. 717–731. Available at: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.02779.x>.

Betzig, E. *et al.* (2006) 'Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution', *Science (New York, N.Y.)*, 313(5793), pp. 1642–1645. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.1127344>.

Bhowmick, T. *et al.* (2014) 'Targeting *Mycobacterium tuberculosis* nucleoid-associated protein HU with structure-based inhibitors', *Nature Communications*, 5, p. 4124. Available at: <https://doi.org/10.1038/ncomms5124>.

Bi, H. and Zhang, C. (2014) 'Integration host factor is required for the induction of acid resistance in *Escherichia coli*', *Current Microbiology*, 69(2), pp. 218–224. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00284-014-0595-7>.

Blanchard, A.C. and Waters, V.J. (2019) 'Microbiology of Cystic Fibrosis Airway Disease', *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*, 40(6), pp. 727–736. Available at: <https://doi.org/10.1055/s-0039-1698464>.

Blasco, B. *et al.* (2011) 'Atypical DNA recognition mechanism used by the EspR virulence regulator of *Mycobacterium tuberculosis*', *Molecular Microbiology*, 82(1), pp. 251–264. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07813.x>.

Blasco, B. *et al.* (2012) 'Virulence regulator EspR of *Mycobacterium tuberculosis* is a nucleoid-associated protein', *PLoS pathogens*, 8(3), p. e1002621. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002621>.

Blauwendraat, C. *et al.* (2012) 'The use of a two-gene sequencing approach to accurately distinguish between the species within the *Mycobacterium abscessus* complex and

- Mycobacterium chelonae', *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases: Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology*, 31(8), pp. 1847–1853. Available at: <https://doi.org/10.1007/s10096-011-1510-9>.
- Blot, N. *et al.* (2006) 'Homeostatic regulation of supercoiling sensitivity coordinates transcription of the bacterial genome', *EMBO reports*, 7(7), pp. 710–715. Available at: <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400729>.
- Bouffartigues, E. *et al.* (2007) 'H-NS cooperative binding to high-affinity sites in a regulatory element results in transcriptional silencing', *Nature Structural & Molecular Biology*, 14(5), pp. 441–448. Available at: <https://doi.org/10.1038/nsmb1233>.
- Bouzeyen, R. and Javid, B. (2022) 'Therapeutic Vaccines for Tuberculosis: An Overview', *Frontiers in Immunology*, 13, p. 878471. Available at: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.878471>.
- Brennan, P.J. and Nikaido, H. (1995) 'The envelope of mycobacteria', *Annual Review of Biochemistry*, 64, pp. 29–63. Available at: <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.64.070195.000333>.
- Brown-Elliott, B.A. and Philley, J.V. (2017) 'Rapidly Growing Mycobacteria', *Microbiology Spectrum*, 5(1). Available at: <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.TNMI7-0027-2016>.
- Bryant, J.M. *et al.* (2013) 'Whole-genome sequencing to identify transmission of Mycobacterium abscessus between patients with cystic fibrosis: a retrospective cohort study', *Lancet (London, England)*, 381(9877), pp. 1551–1560. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)60632-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)60632-7).
- Bryant, J.M. *et al.* (2016) 'Emergence and spread of a human-transmissible multidrug-resistant nontuberculous mycobacterium', *Science (New York, N.Y.)*, 354(6313), pp. 751–757. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.aaf8156>.
- Bryant, J.M. *et al.* (2021) 'Stepwise pathogenic evolution of Mycobacterium abscessus', *Science (New York, N.Y.)*, 372(6541), p. eabb8699. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.abb8699>.
- Buchmeier, N. *et al.* (2000) 'A parallel intraphagosomal survival strategy shared by mycobacterium tuberculosis and Salmonella enterica', *Molecular Microbiology*, 35(6), pp. 1375–1382. Available at: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.01797.x>.
- Bürmann, F. *et al.* (2013) 'An asymmetric SMC-kleisin bridge in prokaryotic condensin', *Nature Structural & Molecular Biology*, 20(3), pp. 371–379. Available at: <https://doi.org/10.1038/nsmb.2488>.
- Byrd, T.F. and Lyons, C.R. (1999) 'Preliminary Characterization of a Mycobacterium abscessus Mutant in Human and Murine Models of Infection', *Infection and Immunity*, 67(9), pp. 4700–4707.
- Cafiero, J.H. *et al.* (2018) 'A Bordetella pertussis MgtC homolog plays a role in the intracellular survival', *PloS One*, 13(8), p. e0203204. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0203204>.
- Calamita, H. *et al.* (2005) 'The Mycobacterium tuberculosis SigD sigma factor controls the expression of ribosome-associated gene products in stationary phase and is required for full

virulence', *Cellular Microbiology*, 7(2), pp. 233–244. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2004.00454.x>.

Cameron, A.D.S. and Dorman, C.J. (2012) 'A fundamental regulatory mechanism operating through OmpR and DNA topology controls expression of Salmonella pathogenicity islands SPI-1 and SPI-2', *PLoS genetics*, 8(3), p. e1002615. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002615>.

Cao, J. *et al.* (2011) 'Modulation of human bronchial epithelial cells by pneumococcal choline binding protein A', *Human Immunology*, 72(1), pp. 37–46. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2010.10.007>.

Casanova, J.-L. and Abel, L. (2022) 'From rare disorders of immunity to common determinants of infection: Following the mechanistic thread', *Cell*, 185(17), pp. 3086–3103. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.07.004>.

Catherinot, E. *et al.* (2007) 'Hypervirulence of a rough variant of the Mycobacterium abscessus type strain', *Infection and Immunity*, 75(2), pp. 1055–1058. Available at: <https://doi.org/10.1128/IAI.00835-06>.

Catherinot, E. *et al.* (2009) 'Acute respiratory failure involving an R variant of Mycobacterium abscessus', *Journal of Clinical Microbiology*, 47(1), pp. 271–274. Available at: <https://doi.org/10.1128/JCM.01478-08>.

Catherinot, E. *et al.* (2013) 'Mycobacterium avium and Mycobacterium abscessus complex target distinct cystic fibrosis patient subpopulations', *Journal of Cystic Fibrosis: Official Journal of the European Cystic Fibrosis Society*, 12(1), pp. 74–80. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2012.06.009>.

Caverly, L.J. *et al.* (2015) 'Mycobacterium abscessus morphotype comparison in a murine model', *PloS One*, 10(2), p. e0117657. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0117657>.

Chen, J.M. *et al.* (2006) 'Roles of Lsr2 in colony morphology and biofilm formation of Mycobacterium smegmatis', *Journal of Bacteriology*, 188(2), pp. 633–641. Available at: <https://doi.org/10.1128/JB.188.2.633-641.2006>.

Chen, J.M. *et al.* (2008) 'Lsr2 of Mycobacterium tuberculosis is a DNA-bridging protein', *Nucleic Acids Research*, 36(7), pp. 2123–2135. Available at: <https://doi.org/10.1093/nar/gkm1162>.

Chen, T. *et al.* (2013) 'The Mycobacterium DosR regulon structure and diversity revealed by comparative genomic analysis', *Journal of Cellular Biochemistry*, 114(1), pp. 1–6. Available at: <https://doi.org/10.1002/jcb.24302>.

Chen, Y. *et al.* (2022) 'Sequence, structure, and function of the Dps DNA-binding protein from Deinococcus wulumuqiensis R12', *Microbial Cell Factories*, 21(1), p. 132. Available at: <https://doi.org/10.1186/s12934-022-01857-7>.

Chen, Z. *et al.* (2016) 'Mycobacterial WhiB6 Differentially Regulates ESX-1 and the Dos Regulon to Modulate Granuloma Formation and Virulence in Zebrafish', *Cell Reports*, 16(9), pp. 2512–2524. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.07.080>.

- Chiancone, E. and Ceci, P. (2010) ‘The multifaceted capacity of Dps proteins to combat bacterial stress conditions: Detoxification of iron and hydrogen peroxide and DNA binding’, *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1800(8), pp. 798–805. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2010.01.013>.
- Chintakayala, K. *et al.* (2015) ‘DNA recognition by Escherichia coli CbpA protein requires a conserved arginine–minor-groove interaction’, *Nucleic Acids Research*, 43(4), pp. 2282–2292. Available at: <https://doi.org/10.1093/nar/gkv012>.
- Cho, Y.-J. *et al.* (2013) ‘The genome sequence of “Mycobacterium massiliense” strain CIP 108297 suggests the independent taxonomic status of the Mycobacterium abscessus complex at the subspecies level’, *PLoS One*, 8(11), p. e81560. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0081560>.
- Choo, S.W. *et al.* (2014) ‘Genomic reconnaissance of clinical isolates of emerging human pathogen Mycobacterium abscessus reveals high evolutionary potential’, *Scientific Reports*, 4, p. 4061. Available at: <https://doi.org/10.1038/srep04061>.
- Chopra, S. *et al.* (2011) ‘Identification of antimicrobial activity among FDA-approved drugs for combating Mycobacterium abscessus and Mycobacterium chelonae’, *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66(7), pp. 1533–1536. Available at: <https://doi.org/10.1093/jac/dkr154>.
- Clayton, L.A. *et al.* (2012) ‘Mycobacterium abscessus pneumonia in an Atlantic bottlenose dolphin (Tursiops truncatus)’, *Journal of Zoo and Wildlife Medicine: Official Publication of the American Association of Zoo Veterinarians*, 43(4), pp. 961–965. Available at: <https://doi.org/10.1638/2012-0110R.1>.
- Cobbett, L. (1918) ‘AN ACID-FAST BACILLUS OBTAINED FROM A PUSTULAR ERUPTION’, *British Medical Journal*, 2(3007), pp. 158–159. Available at: <https://doi.org/10.1136/bmj.2.3007.158-a>.
- Cockram, C., Thierry, A. and Koszul, R. (2021) ‘Generation of gene-level resolution chromosome contact maps in bacteria and archaea’, *STAR Protocols*, 2(2), p. 100512. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.xpro.2021.100512>.
- Colangeli, R. *et al.* (2007) ‘Transcriptional regulation of multi-drug tolerance and antibiotic-induced responses by the histone-like protein Lsr2 in M. tuberculosis’, *PLoS pathogens*, 3(6), p. e87. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0030087>.
- Colangeli, R. *et al.* (2009) ‘The multifunctional histone-like protein Lsr2 protects mycobacteria against reactive oxygen intermediates’, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(11), pp. 4414–4418. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.0810126106>.
- Cole, S.T. *et al.* (2001) ‘Massive gene decay in the leprosy bacillus’, *Nature*, 409(6823), pp. 1007–1011. Available at: <https://doi.org/10.1038/35059006>.
- Collins, F.M. (1989) ‘Mycobacterial disease, immunosuppression, and acquired immunodeficiency syndrome’, *Clinical Microbiology Reviews*, 2(4), pp. 360–377. Available at: <https://doi.org/10.1128/CMR.2.4.360>.
- Cortes, M.A.M., Nessar, R. and Singh, A.K. (2010) ‘Laboratory maintenance of Mycobacterium abscessus’, *Current Protocols in Microbiology*, Chapter 10, p. Unit 10D.1. Available at: <https://doi.org/10.1002/9780471729259.mc10d01s18>.

- Cowman, S. *et al.* (2019) 'Non-tuberculous mycobacterial pulmonary disease', *The European Respiratory Journal*, 54(1), p. 1900250. Available at: <https://doi.org/10.1183/13993003.00250-2019>.
- Craig, N.L. and Nash, H.A. (1984) 'E. coli integration host factor binds to specific sites in DNA', *Cell*, 39(3 Pt 2), pp. 707–716. Available at: [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(84\)90478-1](https://doi.org/10.1016/0092-8674(84)90478-1).
- Crémazy, F.G. *et al.* (2018) 'Determination of the 3D Genome Organization of Bacteria Using Hi-C', *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1837, pp. 3–18. Available at: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8675-0_1.
- Cullen, A.R. *et al.* (2000) 'Mycobacterium abscessus infection in cystic fibrosis. Colonization or infection?', *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 161(2 Pt 1), pp. 641–645. Available at: <https://doi.org/10.1164/ajrccm.161.2.9903062>.
- Daffé, M. (2015) 'The cell envelope of tubercle bacilli', *Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)*, 95 Suppl 1, pp. S155-158. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.tube.2015.02.024>.
- Dages, S., Zhi, X. and Leng, F. (2020) 'Fis protein forms DNA topological barriers to confine transcription-coupled DNA supercoiling in Escherichia coli', *FEBS letters*, 594(5), pp. 791–798. Available at: <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13643>.
- Daley, C.L. *et al.* (2020) 'Treatment of Nontuberculous Mycobacterial Pulmonary Disease: An Official ATS/ERS/ESCMID/IDSA Clinical Practice Guideline', *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 71(4), pp. e1–e36. Available at: <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa241>.
- Dame, R.T. *et al.* (2005) 'DNA Bridging: a Property Shared among H-NS-Like Proteins', *Journal of Bacteriology*, 187(5), pp. 1845–1848. Available at: <https://doi.org/10.1128/JB.187.5.1845-1848.2005>.
- Dame, R.T., Noom, M.C. and Wuite, G.J.L. (2006) 'Bacterial chromatin organization by H-NS protein unravelled using dual DNA manipulation', *Nature*, 444(7117), pp. 387–390. Available at: <https://doi.org/10.1038/nature05283>.
- Dame, R.T., Rashid, F.-Z.M. and Grainger, D.C. (2019) 'Chromosome organization in bacteria: mechanistic insights into genome structure and function', *Nature Reviews Genetics*, pp. 1–16. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41576-019-0185-4>.
- Dame, R.T., Rashid, F.-Z.M. and Grainger, D.C. (2020) 'Chromosome organization in bacteria: mechanistic insights into genome structure and function', *Nature Reviews. Genetics*, 21(4), pp. 227–242. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41576-019-0185-4>.
- Datta, C. *et al.* (2019) 'Physical and functional interaction between nucleoid-associated proteins HU and Lsr2 of Mycobacterium tuberculosis: altered DNA binding and gene regulation', *Molecular Microbiology*, 111(4), pp. 981–994. Available at: <https://doi.org/10.1111/mmi.14202>.
- David, A. *et al.* (2014) 'The two Cis-acting sites, parS1 and oriC1, contribute to the longitudinal organisation of Vibrio cholerae chromosome I', *PLoS genetics*, 10(7), p. e1004448. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004448>.

- Dedrick, R.M. *et al.* (2019) 'Engineered bacteriophages for treatment of a patient with a disseminated drug-resistant *Mycobacterium abscessus*', *Nature Medicine*, 25(5), pp. 730–733. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41591-019-0437-z>.
- Dedrick, R.M. *et al.* (2023) 'Phage Therapy of *Mycobacterium* Infections: Compassionate Use of Phages in 20 Patients With Drug-Resistant Mycobacterial Disease', *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 76(1), pp. 103–112. Available at: <https://doi.org/10.1093/cid/ciac453>.
- Degiacomi, G. *et al.* (2019) 'Mycobacterium abscessus, an Emerging and Worrisome Pathogen among Cystic Fibrosis Patients', *International Journal of Molecular Sciences*, 20(23), p. 5868. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms20235868>.
- Dekker, J. *et al.* (2002) 'Capturing chromosome conformation', *Science (New York, N.Y.)*, 295(5558), pp. 1306–1311. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.1067799>.
- Dekker, J. (2006) 'The three "C" s of chromosome conformation capture: controls, controls, controls', *Nature Methods*, 3(1), pp. 17–21. Available at: <https://doi.org/10.1038/nmeth823>.
- Devaraj, A. *et al.* (2015) 'DNABII proteins play a central role in UPEC biofilm structure', *Molecular Microbiology*, 96(6), pp. 1119–1135. Available at: <https://doi.org/10.1111/mmi.12994>.
- Devulder, G., de Montclos, M.P. and Flandrois, J.P. (2005) 'A multigene approach to phylogenetic analysis using the genus *Mycobacterium* as a model', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55(Pt 1), pp. 293–302. Available at: <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63222-0>.
- Dhaliwal, A. and Bajaj, T. (2023) 'Zafirlukast', in *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557844/> (Accessed: 3 October 2023).
- Dillon, S.C. and Dorman, C.J. (2010) 'Bacterial nucleoid-associated proteins, nucleoid structure and gene expression', *Nature Reviews. Microbiology*, 8(3), pp. 185–195. Available at: <https://doi.org/10.1038/nrmicro2261>.
- Dorman, C.J. (2004) 'H-NS: a universal regulator for a dynamic genome', *Nature Reviews. Microbiology*, 2(5), pp. 391–400. Available at: <https://doi.org/10.1038/nrmicro883>.
- Dorman, C.J. (2009) 'Global regulators and environmental adaptation in Gram-negative pathogens', *Clinical Microbiology and Infection*, 15, pp. 47–50. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2008.02684.x>.
- Dorman, C.J. (2019) 'DNA supercoiling and transcription in bacteria: a two-way street', *BMC Molecular and Cell Biology*, 20, p. 26. Available at: <https://doi.org/10.1186/s12860-019-0211-6>.
- Dorman, C.J. and Deighan, P. (2003) 'Regulation of gene expression by histone-like proteins in bacteria', *Current Opinion in Genetics & Development*, 13(2), pp. 179–184. Available at: [https://doi.org/10.1016/s0959-437x\(03\)00025-x](https://doi.org/10.1016/s0959-437x(03)00025-x).
- Draper, P. (1998) 'The outer parts of the mycobacterial envelope as permeability barriers', *Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library*, 3, pp. D1253-1261. Available at: <https://doi.org/10.2741/a360>.

- Drlica, K. and Rouviere-Yaniv, J. (1987) 'Histonelike proteins of bacteria', *Microbiological Reviews*, 51(3), pp. 301–319. Available at: <https://doi.org/10.1128/mr.51.3.301-319.1987>.
- Duan, B. *et al.* (2021) 'Xenogeneic Silencing and Bacterial Genome Evolution: Mechanisms for DNA Recognition Imply Multifaceted Roles of Xenogeneic Silencers', *Molecular Biology and Evolution*, 38(10), pp. 4135–4148. Available at: <https://doi.org/10.1093/molbev/msab136>.
- Dubois, V. *et al.* (2018) 'MmpL8MAB controls Mycobacterium abscessus virulence and production of a previously unknown glycolipid family', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(43), pp. E10147–E10156. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.1812984115>.
- Dubois, V. *et al.* (2019) 'Mycobacterium abscessus virulence traits unraveled by transcriptomic profiling in amoeba and macrophages', *PLoS pathogens*, 15(11), p. e1008069. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008069>.
- Dugar, G. *et al.* (2022) 'A chromosomal loop anchor mediates bacterial genome organization', *Nature Genetics*, 54(2), pp. 194–201. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41588-021-00988-8>.
- Dulberger, C.L. *et al.* (2023) 'Mycobacterial nucleoid-associated protein Lsr2 is required for productive mycobacteriophage infection', *Nature Microbiology*, 8(4), pp. 695–710. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41564-023-01333-x>.
- Duprey, A., Reverchon, S. and Nasser, W. (2014) 'Bacterial virulence and Fis: adapting regulatory networks to the host environment', *Trends in Microbiology*, 22(2), pp. 92–99. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.tim.2013.11.008>.
- Eijkelkamp, B.A. *et al.* (2013) 'H-NS Plays a Role in Expression of Acinetobacter baumannii Virulence Features', *Infection and Immunity*, 81(7), pp. 2574–2583. Available at: <https://doi.org/10.1128/IAI.00065-13>.
- El Amrani, M.H. *et al.* (2010) 'Upper extremity Mycobacterium marinum infection', *Orthopaedics & traumatology, surgery & research: OTSR*, 96(6), pp. 706–711. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.otsr.2010.02.016>.
- El-Etr, S.H. and Cirillo, J.D. (2001) 'Entry mechanisms of mycobacteria', *Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library*, 6, pp. D737-747. Available at: <https://doi.org/10.2741/sahar>.
- El-Shazly, S. *et al.* (2007) 'Internalization by HeLa cells of latex beads coated with mammalian cell entry (Mce) proteins encoded by the mce3 operon of Mycobacterium tuberculosis', *Journal of Medical Microbiology*, 56(Pt 9), pp. 1145–1151. Available at: <https://doi.org/10.1099/jmm.0.47095-0>.
- Erkelens, A.M. *et al.* (2022) 'The B. subtilis Rok protein is an atypical H-NS-like protein irresponsive to physico-chemical cues', *Nucleic Acids Research*, 50(21), pp. 12166–12185. Available at: <https://doi.org/10.1093/nar/gkac1064>.
- Fahlen, T.F. *et al.* (2001) 'Hha Is a Negative Modulator of Transcription of hila, the Salmonella enterica Serovar Typhimurium Invasion Gene Transcriptional Activator', *Journal of Bacteriology*, 183(22), pp. 6620–6629. Available at: <https://doi.org/10.1128/JB.183.22.6620-6629.2001>.

- Falkinham, J.O. *et al.* (2008) ‘Mycobacterium avium in a shower linked to pulmonary disease’, *Journal of Water and Health*, 6(2), pp. 209–213. Available at: <https://doi.org/10.2166/wh.2008.032>.
- Falkinham, J.O. (2011) ‘Nontuberculous mycobacteria from household plumbing of patients with nontuberculous mycobacteria disease’, *Emerging Infectious Diseases*, 17(3), pp. 419–424. Available at: <https://doi.org/10.3201/eid1703.101510>.
- Fedrizzi, T. *et al.* (2017) ‘Genomic characterization of Nontuberculous Mycobacteria’, *Scientific Reports*, 7, p. 45258. Available at: <https://doi.org/10.1038/srep45258>.
- Fenn, K., Wong, C.T. and Darbari, V.C. (2020) ‘Mycobacterium tuberculosis Uses Mce Proteins to Interfere With Host Cell Signaling’, *Frontiers in Molecular Biosciences*, 6, p. 149. Available at: <https://doi.org/10.3389/fmolb.2019.00149>.
- Fernández-Caso, B. *et al.* (2020) ‘Prevalence and importance of non-tuberculous mycobacteria in adult patients with cystic fibrosis in a hospital in Madrid’, *Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica (English Ed.)*, 38(7), pp. 323–326. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2019.09.007>.
- Ferrándiz, M.-J. *et al.* (2018) ‘HU of Streptococcus pneumoniae Is Essential for the Preservation of DNA Supercoiling’, *Frontiers in Microbiology*, 9, p. 493. Available at: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00493>.
- Finke, S. *et al.* (2019) ‘Bacillus thuringiensis CbpA is a collagen binding cell surface protein under c-di-GMP control’, *The Cell Surface*, 5, p. 100032. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.tcs.2019.100032>.
- Floto, R.A. *et al.* (2016) ‘US Cystic Fibrosis Foundation and European Cystic Fibrosis Society consensus recommendations for the management of non-tuberculous mycobacteria in individuals with cystic fibrosis’, *Thorax*, 71 Suppl 1(Suppl 1), pp. i1-22. Available at: <https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2015-207360>.
- Forrellad, M.A. *et al.* (2013) ‘Virulence factors of the Mycobacterium tuberculosis complex’, *Virulence*, 4(1), pp. 3–66. Available at: <https://doi.org/10.4161/viru.22329>.
- Gehrke, E.J. *et al.* (2019) ‘Silencing cryptic specialized metabolism in Streptomyces by the nucleoid-associated protein Lsr2’, *eLife*, 8, p. e47691. Available at: <https://doi.org/10.7554/eLife.47691>.
- Gerits, E. *et al.* (2017) ‘In vitro activity of the antiasthmatic drug zafirlukast against the oral pathogens Porphyromonas gingivalis and Streptococcus mutans’, *FEMS microbiology letters*, 364(2). Available at: <https://doi.org/10.1093/femsle/fnx005>.
- Gerstel, U., Park, C. and Römling, U. (2003) ‘Complex regulation of csgD promoter activity by global regulatory proteins’, *Molecular Microbiology*, 49(3), pp. 639–654. Available at: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03594.x>.
- Ghosh, S., Indi, S.S. and Nagaraja, V. (2013) ‘Regulation of lipid biosynthesis, sliding motility, and biofilm formation by a membrane-anchored nucleoid-associated protein of Mycobacterium tuberculosis’, *Journal of Bacteriology*, 195(8), pp. 1769–1778. Available at: <https://doi.org/10.1128/JB.02081-12>.

- Gomes, S.C. *et al.* (2021) 'A Histone-Like Nucleoid Structuring Protein Regulates Several Virulence Traits in *Burkholderia multivorans*', *Applied and Environmental Microbiology*, 87(14), p. e0036921. Available at: <https://doi.org/10.1128/AEM.00369-21>.
- Gopalaswamy, R. *et al.* (2020) 'Of tuberculosis and non-tuberculous mycobacterial infections - a comparative analysis of epidemiology, diagnosis and treatment', *Journal of Biomedical Science*, 27(1), p. 74. Available at: <https://doi.org/10.1186/s12929-020-00667-6>.
- Gordon, B.R.G. *et al.* (2008) 'Lsr2 of *Mycobacterium* represents a novel class of H-NS-like proteins', *Journal of Bacteriology*, 190(21), pp. 7052–7059. Available at: <https://doi.org/10.1128/JB.00733-08>.
- Gordon, B.R.G. *et al.* (2010) 'Lsr2 is a nucleoid-associated protein that targets AT-rich sequences and virulence genes in *Mycobacterium tuberculosis*', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(11), pp. 5154–5159. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.0913551107>.
- Gordon, B.R.G. *et al.* (2011) 'Structural basis for recognition of AT-rich DNA by unrelated xenogeneic silencing proteins', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(26), pp. 10690–10695. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.1102544108>.
- Griffith, D.E. (2003) 'Emergence of nontuberculous mycobacteria as pathogens in cystic fibrosis', *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 167(6), pp. 810–812. Available at: <https://doi.org/10.1164/rccm.2301001>.
- Griffith, D.E. *et al.* (2007) 'An official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases', *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 175(4), pp. 367–416. Available at: <https://doi.org/10.1164/rccm.200604-571ST>.
- Griffith, D.E. and Daley, C.L. (2022) 'Treatment of *Mycobacterium abscessus* Pulmonary Disease', *Chest*, 161(1), pp. 64–75. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.chest.2021.07.035>.
- Griffith, J.D. (1976) 'Visualization of prokaryotic DNA in a regularly condensed chromatin-like fiber.', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 73(2), pp. 563–567. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.73.2.563>.
- Gruber, S. (2014) 'Multilayer chromosome organization through DNA bending, bridging and extrusion', *Current Opinion in Microbiology*, 22, pp. 102–110. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.mib.2014.09.018>.
- Gruber, S. (2018) 'SMC complexes sweeping through the chromosome: going with the flow and against the tide', *Current Opinion in Microbiology*, 42, pp. 96–103. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.mib.2017.10.004>.
- Gulvady, R. *et al.* (2018) 'A single molecule analysis of H-NS uncouples DNA binding affinity from DNA specificity', *Nucleic Acids Research*, 46(19), pp. 10216–10224. Available at: <https://doi.org/10.1093/nar/gky826>.
- Gupta, M. *et al.* (2014) 'HupB, a nucleoid-associated protein of *Mycobacterium tuberculosis*, is modified by serine/threonine protein kinases *in vivo*', *Journal of Bacteriology*, 196(14), pp. 2646–2657. Available at: <https://doi.org/10.1128/JB.01625-14>.

- Gutiérrez, A.V. *et al.* (2018) ‘Glycopeptidolipids, a Double-Edged Sword of the *Mycobacterium abscessus* Complex’, *Frontiers in Microbiology*, 9, p. 1145. Available at: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01145>.
- Hagège, H. *et al.* (2007) ‘Quantitative analysis of chromosome conformation capture assays (3C-qPCR)’, *Nature Protocols*, 2(7), pp. 1722–1733. Available at: <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.243>.
- Hammerschmidt, S. *et al.* (1997) ‘SpsA, a novel pneumococcal surface protein with specific binding to secretory immunoglobulin A and secretory component’, *Molecular Microbiology*, 25(6), pp. 1113–1124. Available at: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1997.5391899.x>.
- Hancock, S.P. *et al.* (2016) ‘DNA Sequence Determinants Controlling Affinity, Stability and Shape of DNA Complexes Bound by the Nucleoid Protein Fis’, *PloS One*, 11(3), p. e0150189. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0150189>.
- Harms, A. *et al.* (2013) ‘Tracking of chromosome and replisome dynamics in *Myxococcus xanthus* reveals a novel chromosome arrangement’, *PLoS genetics*, 9(9), p. e1003802. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003802>.
- Hartkoorn, R.C., Uplekar, S. and Cole, S.T. (2014) ‘Cross-resistance between clofazimine and bedaquiline through upregulation of MmpL5 in *Mycobacterium tuberculosis*’, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(5), pp. 2979–2981. Available at: <https://doi.org/10.1128/AAC.00037-14>.
- Hołówka, J. *et al.* (2023) ‘Mycobacterial IHF is a highly dynamic nucleoid-associated protein that assists HupB in organizing chromatin’, *Frontiers in Microbiology*, 14, p. 1146406. Available at: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1146406>.
- Hołówka, J. and Zakrzewska-Czerwińska, J. (2020) ‘Nucleoid Associated Proteins: The Small Organizers That Help to Cope With Stress’, *Frontiers in Microbiology*, 11, p. 590. Available at: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00590>.
- Hooppaw, A.J. *et al.* (2022) ‘The Phenylacetic Acid Catabolic Pathway Regulates Antibiotic and Oxidative Stress Responses in *Acinetobacter*’, *mBio*, 13(3), p. e0186321. Available at: <https://doi.org/10.1128/mbio.01863-21>.
- Howard, K.C. and Garneau-Tsodikova, S. (2022) ‘Selective Inhibition of the Periodontal Pathogen *Porphyromonas gingivalis* by Third-Generation Zafirlukast Derivatives’, *Journal of Medicinal Chemistry*, 65(21), pp. 14938–14956. Available at: <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.2c01471>.
- Howard, S.T. *et al.* (2006) ‘Spontaneous reversion of *Mycobacterium abscessus* from a smooth to a rough morphotype is associated with reduced expression of glycopeptidolipid and reacquisition of an invasive phenotype’, *Microbiology (Reading, England)*, 152(Pt 6), pp. 1581–1590. Available at: <https://doi.org/10.1099/mic.0.28625-0>.
- Huang, F. *et al.* (2020) ‘The H-NS Regulator Plays a Role in the Stress Induced by Carbapenemase Expression in *Acinetobacter baumannii*’, *mSphere*, 5(4), pp. e00793-20. Available at: <https://doi.org/10.1128/mSphere.00793-20>.
- Huang, Y.-F. *et al.* (2023) ‘High-Resolution 3D Genome Map of *Brucella* Chromosomes in Exponential and Stationary Phases’, *Microbiology Spectrum*, 11(2), p. e0429022. Available at: <https://doi.org/10.1128/spectrum.04290-22>.

- Hunt, T.A. *et al.* (2004) 'Identification of Burkholderia cenocepacia genes required for bacterial survival in vivo', *Infection and Immunity*, 72(7), pp. 4010–4022. Available at: <https://doi.org/10.1128/IAI.72.7.4010-4022.2004>.
- Hurst-Hess, K., Rudra, P. and Ghosh, P. (2017) 'Mycobacterium abscessus WhiB7 Regulates a Species-Specific Repertoire of Genes To Confer Extreme Antibiotic Resistance', *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 61(11), pp. e01347-17. Available at: <https://doi.org/10.1128/AAC.01347-17>.
- Illouz, M. *et al.* (2021) '[Mycobacterium abscessus, a model of resistance to multiple antibiotic classes]', *Medecine Sciences: M/S*, 37(11), pp. 993–1001. Available at: <https://doi.org/10.1051/medsci/2021164>.
- Ishikawa, J. *et al.* (2004) 'The complete genomic sequence of Nocardia farcinica IFM 10152', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(41), pp. 14925–14930. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.0406410101>.
- Isom, G.L. *et al.* (2017) 'MCE domain proteins: conserved inner membrane lipid-binding proteins required for outer membrane homeostasis', *Scientific Reports*, 7(1), p. 8608. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-09111-6>.
- Jackson, M. (2014) 'The mycobacterial cell envelope-lipids', *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 4(10), p. a021105. Available at: <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a021105>.
- Jaiswal, S. *et al.* (2016) 'The Hha-TomB Toxin-Antitoxin System Shows Conditional Toxicity and Promotes Persister Cell Formation by Inhibiting Apoptosis-Like Death in S. Typhimurium', *Scientific Reports*, 6, p. 38204. Available at: <https://doi.org/10.1038/srep38204>.
- Janulczyk, R. *et al.* (2000) 'Hic, a novel surface protein of Streptococcus pneumoniae that interferes with complement function', *The Journal of Biological Chemistry*, 275(47), pp. 37257–37263. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M004572200>.
- Jassies-van der Lee, A. *et al.* (2009) 'Localised pyogranulomatous dermatitis due to Mycobacterium abscessus in a cat: a case report', *Veterinary Journal (London, England: 1997)*, 179(2), pp. 304–306. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2007.08.026>.
- Johansen, M.D. *et al.* (2020) 'Rifabutin Is Bactericidal against Intracellular and Extracellular Forms of Mycobacterium abscessus', *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 64(11), pp. e00363-20. Available at: <https://doi.org/10.1128/AAC.00363-20>.
- Johansen, M.D., Herrmann, J.-L. and Kremer, L. (2020) 'Non-tuberculous mycobacteria and the rise of Mycobacterium abscessus', *Nature Reviews Microbiology*, 18(7), pp. 392–407. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0331-1>.
- Jönsson, B., Ridell, M. and Wold, A.E. (2013) 'Phagocytosis and cytokine response to rough and smooth colony variants of Mycobacterium abscessus by human peripheral blood mononuclear cells', *APMIS: acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica*, 121(1), pp. 45–55. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2012.02932.x>.

- Jönsson, B.E. *et al.* (2007) 'Molecular epidemiology of Mycobacterium abscessus, with focus on cystic fibrosis', *Journal of Clinical Microbiology*, 45(5), pp. 1497–1504. Available at: <https://doi.org/10.1128/JCM.02592-06>.
- Julián, E. *et al.* (2010) 'Microscopic Cords, a Virulence-Related Characteristic of Mycobacterium tuberculosis, Are Also Present in Nonpathogenic Mycobacteria', *Journal of Bacteriology*, 192(7), pp. 1751–1760. Available at: <https://doi.org/10.1128/jb.01485-09>.
- Jurcisek, J.A. *et al.* (2017) 'Nontypeable Haemophilus influenzae releases DNA and DNABII proteins via a T4SS-like complex and ComE of the type IV pilus machinery', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(32), pp. E6632–E6641. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.1705508114>.
- Kahramanoglou, C. *et al.* (2011) 'Direct and indirect effects of H-NS and Fis on global gene expression control in Escherichia coli', *Nucleic Acids Research*, 39(6), pp. 2073–2091. Available at: <https://doi.org/10.1093/nar/gkq934>.
- Kar, S., Edgar, R. and Adhya, S. (2005) 'Nucleoid remodeling by an altered HU protein: reorganization of the transcription program', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(45), pp. 16397–16402. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.0508032102>.
- Karas, V.O., Westerlaken, I. and Meyer, A.S. (2015) 'The DNA-Binding Protein from Starved Cells (Dps) Utilizes Dual Functions To Defend Cells against Multiple Stresses', *Journal of Bacteriology*, 197(19), pp. 3206–3215. Available at: <https://doi.org/10.1128/JB.00475-15>.
- Kerem, B. *et al.* (1989) 'Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis', *Science (New York, N.Y.)*, 245(4922), pp. 1073–1080. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.2570460>.
- Kim, B.J. *et al.* (1999) 'Identification of mycobacterial species by comparative sequence analysis of the RNA polymerase gene (rpo À ce jour, six NAPs sont décrites : EspR, HupB, mIHF, NapM, MDP2 et Lsr2', *Journal of Clinical Microbiology*, 37(6), pp. 1714–1720. Available at: <https://doi.org/10.1128/JCM.37.6.1714-1720.1999>.
- Kim, J.-S. *et al.* (2015) 'Essential engagement of Toll-like receptor 2 in initiation of early protective Th1 response against rough variants of Mycobacterium abscessus', *Infection and Immunity*, 83(4), pp. 1556–1567. Available at: <https://doi.org/10.1128/IAI.02853-14>.
- Kim, N. *et al.* (2002) 'Proteins released by Helicobacter pylori in vitro', *Journal of Bacteriology*, 184(22), pp. 6155–6162. Available at: <https://doi.org/10.1128/JB.184.22.6155-6162.2002>.
- Kim, S.-J. *et al.* (2008) 'Genomic analysis of polycyclic aromatic hydrocarbon degradation in Mycobacterium vanbaalenii PYR-1', *Biodegradation*, 19(6), pp. 859–881. Available at: <https://doi.org/10.1007/s10532-008-9189-z>.
- Kim, S.-Y. *et al.* (2021) 'Association between 16S rRNA gene mutations and susceptibility to amikacin in Mycobacterium avium Complex and Mycobacterium abscessus clinical isolates', *Scientific Reports*, 11(1), p. 6108. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41598-021-85721-5>.

Klepp, L.I., Sabio Y Garcia, J. and FabianaBigi, null (2022) 'Mycobacterial MCE proteins as transporters that control lipid homeostasis of the cell wall', *Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)*, 132, p. 102162. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.tube.2021.102162>.

Kocíncová, D. *et al.* (2008) 'Spontaneous transposition of IS1096 or ISMsm3 leads to glycopeptidolipid overproduction and affects surface properties in *Mycobacterium smegmatis*', *Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)*, 88(5), pp. 390–398. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.tube.2008.02.005>.

Koh, W.-J., Stout, J.E. and Yew, W.-W. (2014) 'Advances in the management of pulmonary disease due to *Mycobacterium abscessus* complex', *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease: The Official Journal of the International Union Against Tuberculosis and Lung Disease*, 18(10), pp. 1141–1148. Available at: <https://doi.org/10.5588/ijtld.14.0134>.

Kołodziej, M., Trojanowski, D., *et al.* (2021) 'Lsr2, a nucleoid-associated protein influencing mycobacterial cell cycle', *Scientific Reports*, 11(1), p. 2910. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41598-021-82295-0>.

Kołodziej, M., Łebkowski, T., *et al.* (2021) 'Lsr2 and Its Novel Parologue Mediate the Adjustment of *Mycobacterium smegmatis* to Unfavorable Environmental Conditions', *mSphere*, 6(3), pp. e00290-21. Available at: <https://doi.org/10.1128/mSphere.00290-21>.

Kothavade, R.J. *et al.* (2013) 'Clinical and laboratory aspects of the diagnosis and management of cutaneous and subcutaneous infections caused by rapidly growing mycobacteria', *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases: Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology*, 32(2), pp. 161–188. Available at: <https://doi.org/10.1007/s10096-012-1766-8>.

Kotlajich, M.V. *et al.* (2015) 'Bridged filaments of histone-like nucleoid structuring protein pause RNA polymerase and aid termination in bacteria', *eLife*, 4, p. e04970. Available at: <https://doi.org/10.7554/eLife.04970>.

Kriel, N.L. *et al.* (2018) 'Mycobacterial nucleoid associated proteins: An added dimension in gene regulation', *Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)*, 108, pp. 169–177. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.tube.2017.12.004>.

Krin, E., Danchin, A. and Soutourina, O. (2010) 'Decrypting the H-NS-dependent regulatory cascade of acid stress resistance in *Escherichia coli*', *BMC Microbiology*, 10, p. 273. Available at: <https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-273>.

Kubica, G.P. *et al.* (1972) 'A co-operative numerical analysis of rapidly growing mycobacteria', *Journal of General Microbiology*, 73(1), pp. 55–70. Available at: <https://doi.org/10.1099/00221287-73-1-55>.

Kumar, A. *et al.* (2005) 'Comparison of mammalian cell entry operons of mycobacteria: in silico analysis and expression profiling', *FEMS immunology and medical microbiology*, 43(2), pp. 185–195. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.femsim.2004.08.013>.

Kumar, C. *et al.* (2021) 'Skin and soft-tissue infections due to rapidly growing mycobacteria: An overview', *International Journal of Mycobacteriology*, 10(3), pp. 293–300. Available at: https://doi.org/10.4103/ijmy.ijmy_110_21.

- Kusunoki, S. and Ezaki, T. (1992) 'Proposal of *Mycobacterium peregrinum* sp. nov., nom. rev., and elevation of *Mycobacterium chelonae* subsp. abscessus (Kubica et al.) to species status: *Mycobacterium abscessus* comb. nov', *International Journal of Systematic Bacteriology*, 42(2), pp. 240–245. Available at: <https://doi.org/10.1099/00207713-42-2-240>.
- Kwak, N. *et al.* (2019) 'Mycobacterium abscessus pulmonary disease: individual patient data meta-analysis', *European Respiratory Journal*, 54(1). Available at: <https://doi.org/10.1183/13993003.01991-2018>.
- Laal, S. *et al.* (1991) 'Recombinant fusion protein identified by lepromatous sera mimics native *Mycobacterium leprae* in T-cell responses across the leprosy spectrum', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(3), pp. 1054–1058. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.88.3.1054>.
- Laencina, L. *et al.* (2018) 'Identification of genes required for *Mycobacterium abscessus* growth in vivo with a prominent role of the ESX-4 locus', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(5), pp. E1002–E1011. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.1713195115>.
- Lagune, M. *et al.* (2021) 'Conserved and specialized functions of Type VII secretion systems in non-tuberculous mycobacteria', *Microbiology (Reading, England)*, 167(7). Available at: <https://doi.org/10.1099/mic.0.001054>.
- Lagune, M. *et al.* (2022) 'The ESX-4 substrates, EsxU and EsxT, modulate *Mycobacterium abscessus* fitness', *PLoS pathogens*, 18(8), p. e1010771. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1010771>.
- Lambert, P.A. (2002) 'Cellular impermeability and uptake of biocides and antibiotics in Gram-positive bacteria and mycobacteria', *Journal of Applied Microbiology*, 92 Suppl, pp. 46S–54S.
- Lammens, A., Schele, A. and Hopfner, K.-P. (2004) 'Structural biochemistry of ATP-driven dimerization and DNA-stimulated activation of SMC ATPases', *Current biology: CB*, 14(19), pp. 1778–1782. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cub.2004.09.044>.
- Lau, G.W. *et al.* (2004) 'The role of pyocyanin in *Pseudomonas aeruginosa* infection', *Trends in Molecular Medicine*, 10(12), pp. 599–606. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2004.10.002>.
- Lavollay, M. *et al.* (2011) 'The peptidoglycan of *Mycobacterium abscessus* is predominantly cross-linked by L,D-transpeptidases', *Journal of Bacteriology*, 193(3), pp. 778–782. Available at: <https://doi.org/10.1128/JB.00606-10>.
- Le Moigne, V. *et al.* (2016) 'MgtC as a Host-Induced Factor and Vaccine Candidate against *Mycobacterium abscessus* Infection', *Infection and Immunity*, 84(10), pp. 2895–2903. Available at: <https://doi.org/10.1128/IAI.00359-16>.
- Le Moigne, V. *et al.* (2019) 'Lsr2 Is an Important Determinant of Intracellular Growth and Virulence in *Mycobacterium abscessus*', *Frontiers in Microbiology*, 10, p. 905. Available at: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00905>.
- Le Run, E., Arthur, M. and Mainardi, J.-L. (2018) 'In Vitro and Intracellular Activity of Imipenem Combined with Rifabutin and Avibactam against *Mycobacterium abscessus*',

Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 62(8), pp. e00623-18. Available at: <https://doi.org/10.1128/AAC.00623-18>.

Le, T.B. and Laub, M.T. (2016) 'Transcription rate and transcript length drive formation of chromosomal interaction domain boundaries', *The EMBO journal*, 35(14), pp. 1582–1595. Available at: <https://doi.org/10.15252/embj.201593561>.

Le, T.B.K. *et al.* (2013) 'High-resolution mapping of the spatial organization of a bacterial chromosome', *Science (New York, N.Y.)*, 342(6159), pp. 731–734. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.1242059>.

Leao, S.C. *et al.* (2011) 'Proposal that *Mycobacterium massiliense* and *Mycobacterium bolletii* be united and reclassified as *Mycobacterium abscessus* subsp. *bolletii* comb. nov., designation of *Mycobacterium abscessus* subsp. *abscessus* subsp. nov. and emended description of *Mycobacterium abscessus*', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 61(Pt 9), pp. 2311–2313. Available at: <https://doi.org/10.1099/ijs.0.023770-0>.

Lee, E.-H. *et al.* (2006) 'Integration Host Factor is required for FarR repression of the farAB-encoded efflux pump of *Neisseria gonorrhoeae*', *Molecular Microbiology*, 60(6), pp. 1381–1400. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05185.x>.

Lee, J.H. and Zhao, Y. (2016) 'Integration Host Factor Is Required for RpoN-Dependent hrpL Gene Expression and Controls Motility by Positively Regulating rsmB sRNA in *Erwinia amylovora*', *Phytopathology*, 106(1), pp. 29–36. Available at: <https://doi.org/10.1094/PHYTO-07-15-0170-R>.

Lee, M.-R. *et al.* (2015) 'Mycobacterium abscessus Complex Infections in Humans', *Emerging Infectious Diseases*, 21(9), pp. 1638–1646. Available at: <https://doi.org/10.3201/2109.141634>.

Leite, B. *et al.* (2017) 'Integration host factor is important for biofilm formation by *Salmonella enterica* Enteritidis', *Pathogens and Disease*, 75(6). Available at: <https://doi.org/10.1093/femspd/ftx074>.

Lenz, D.H. and Bassler, B.L. (2007) 'The small nucleoid protein Fis is involved in *Vibrio cholerae* quorum sensing', *Molecular Microbiology*, 63(3), pp. 859–871. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05545.x>.

Levings, D., Shaw, K.E. and Lacher, S.E. (2020) 'Genomic Resources for Dissecting the Role of Non-Protein Coding Variation in Gene-Environment Interactions', *Toxicology*, 441, p. 152505. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.tox.2020.152505>.

Liao, C.-H. *et al.* (2004) 'Discontinuation of secondary prophylaxis in AIDS patients with disseminated non-tuberculous mycobacteria infection', *Journal of Microbiology, Immunology, and Infection = Wei Mian Yu Gan Ran Za Zhi*, 37(1), pp. 50–56.

Lieberman-Aiden, E. *et al.* (2009) 'Comprehensive mapping of long-range interactions reveals folding principles of the human genome', *Science (New York, N.Y.)*, 326(5950), pp. 289–293. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.1181369>.

Liebeskind, D.S. *et al.* (2001) 'Neurologic manifestations of disseminated infection with *Mycobacterium abscessus*', *Neurology*, 56(6), pp. 810–813. Available at: <https://doi.org/10.1212/wnl.56.6.810>.

- Lin, J. *et al.* (2012) ‘Physical organization of DNA by multiple non-specific DNA-binding modes of integration host factor (IHF)’, *PLoS One*, 7(11), p. e49885. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0049885>.
- Lioy, V.S. *et al.* (2018) ‘Multiscale Structuring of the E. coli Chromosome by Nucleoid-Associated and Condensin Proteins’, *Cell*, 172(4), pp. 771–783.e18. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.12.027>.
- Lioy, V.S., Junier, I. and Boccard, F. (2021) ‘Multiscale Dynamic Structuring of Bacterial Chromosomes’, *Annual Review of Microbiology*, 75(1), pp. 541–561. Available at: <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-033021-113232>.
- Liu, J. and Gordon, B.R.G. (2012) ‘Targeting the global regulator Lsr2 as a novel approach for anti-tuberculosis drug development’, *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 10(9), pp. 1049–1053. Available at: <https://doi.org/10.1586/eri.12.86>.
- Liu, T.-T. *et al.* (2016) ‘Nontuberculous mycobacterial infection with concurrent IgG4-related lymphadenopathy’, *APMIS: acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica*, 124(3), pp. 216–220. Available at: <https://doi.org/10.1111/apm.12492>.
- Liu, Y. *et al.* (2010) ‘A divalent switch drives H-NS/DNA-binding conformations between stiffening and bridging modes’, *Genes & Development*, 24(4), pp. 339–344. Available at: <https://doi.org/10.1101/gad.1883510>.
- Liu, Y. *et al.* (2016) ‘NapM, a new nucleoid-associated protein, broadly regulates gene expression and affects mycobacterial resistance to anti-tuberculosis drugs’, *Molecular Microbiology*, 101(1), pp. 167–181. Available at: <https://doi.org/10.1111/mmi.13383>.
- Liu, Y. *et al.* (2019) ‘NapM enhances the survival of Mycobacterium tuberculosis under stress and in macrophages’, *Communications Biology*, 2, p. 65. Available at: <https://doi.org/10.1038/s42003-019-0314-9>.
- Long, Y. *et al.* (2020) ‘Fis Contributes to Resistance of Pseudomonas aeruginosa to Ciprofloxacin by Regulating Pyocin Synthesis’, *Journal of Bacteriology*, 202(11), pp. e00064–20. Available at: <https://doi.org/10.1128/JB.00064-20>.
- Lopeman, R.C. *et al.* (2019) ‘Mycobacterium abscessus: Environmental Bacterium Turned Clinical Nightmare’, *Microorganisms*, 7(3), p. 90. Available at: <https://doi.org/10.3390/microorganisms7030090>.
- Luijsterburg, M.S. *et al.* (2006) ‘The architectural role of nucleoid-associated proteins in the organization of bacterial chromatin: a molecular perspective’, *Journal of Structural Biology*, 156(2), pp. 262–272. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2006.05.006>.
- Luijsterburg, M.S. *et al.* (2008) ‘The major architects of chromatin: architectural proteins in bacteria, archaea and eukaryotes’, *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 43(6), pp. 393–418. Available at: <https://doi.org/10.1080/10409230802528488>.
- Luthra, S., Rominski, A. and Sander, P. (2018) ‘The Role of Antibiotic-Target-Modifying and Antibiotic-Modifying Enzymes in Mycobacterium abscessus Drug Resistance’, *Frontiers in Microbiology*, 9, p. 2179. Available at: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02179>.
- Madrid, C., Nieto, J.M. and Juárez, A. (2002) ‘Role of the Hha/YmoA family of proteins in the thermoregulation of the expression of virulence factors’, *International journal of medical*

microbiology: IJMM, 291(6–7), pp. 425–432. Available at: <https://doi.org/10.1078/1438-4221-00149>.

Máiz, L. *et al.* (2016) ‘Prevalence and factors associated with nontuberculous mycobacteria in non-cystic fibrosis bronchiectasis: a multicenter observational study’, *BMC infectious diseases*, 16(1), p. 437. Available at: <https://doi.org/10.1186/s12879-016-1774-x>.

Malik, M. *et al.* (1996) ‘Histone-like protein HU and bacterial DNA topology: suppression of an HU deficiency by gyrase mutations’, *Journal of Molecular Biology*, 256(1), pp. 66–76. Available at: <https://doi.org/10.1006/jmbi.1996.0068>.

Malouf, M.A. and Glanville, A.R. (1999) ‘The spectrum of mycobacterial infection after lung transplantation’, *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 160(5 Pt 1), pp. 1611–1616. Available at: <https://doi.org/10.1164/ajrccm.160.5.9808113>.

Mangan, M.W. *et al.* (2006) ‘The integration host factor (IHF) integrates stationary-phase and virulence gene expression in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium’, *Molecular Microbiology*, 59(6), pp. 1831–1847. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05062.x>.

Mangan, M.W. *et al.* (2011) ‘Nucleoid-associated protein HU controls three regulons that coordinate virulence, response to stress and general physiology in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium’, *Microbiology (Reading, England)*, 157(Pt 4), pp. 1075–1087. Available at: <https://doi.org/10.1099/mic.0.046359-0>.

Manganelli, R. (2014) ‘Sigma Factors: Key Molecules in *Mycobacterium tuberculosis* Physiology and Virulence’, *Microbiology Spectrum*, 2(1), pp. MGM2-0007–2013. Available at: <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.MGM2-0007-2013>.

Marbouty, M. *et al.* (2014) ‘Metagenomic chromosome conformation capture (meta3C) unveils the diversity of chromosome organization in microorganisms’, *eLife*, 3, p. e03318. Available at: <https://doi.org/10.7554/eLife.03318>.

Marbouty, M. *et al.* (2015) ‘Condensin- and Replication-Mediated Bacterial Chromosome Folding and Origin Condensation Revealed by Hi-C and Super-resolution Imaging’, *Molecular Cell*, 59(4), pp. 588–602. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.07.020>.

Marquis, H. and Hager, E.J. (2000) ‘pH-regulated activation and release of a bacteria-associated phospholipase C during intracellular infection by *Listeria monocytogenes*’, *Molecular Microbiology*, 35(2), pp. 289–298. Available at: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.01708.x>.

Marras, T.K. *et al.* (2013) ‘Pulmonary nontuberculous mycobacterial disease, Ontario, Canada, 1998–2010’, *Emerging Infectious Diseases*, 19(11), pp. 1889–1891. Available at: <https://doi.org/10.3201/eid1911.130737>.

Martínez, E., Campos-Gómez, J. and Barre, F.-X. (2016) ‘CTX ϕ : Exploring new alternatives in host factor-mediated filamentous phage replications’, *Bacteriophage*, 6(2), p. e1128512. Available at: <https://doi.org/10.1080/21597081.2015.1128512>.

Martínez-Santos, V.I. *et al.* (2012) ‘Transcriptional regulation of the *ecp* operon by EcpR, IHF, and H-NS in attaching and effacing *Escherichia coli*’, *Journal of Bacteriology*, 194(18), pp. 5020–5033. Available at: <https://doi.org/10.1128/JB.00915-12>.

- Matthey-Doret, C. *et al.* (2022) 'Normalization of Chromosome Contact Maps: Matrix Balancing and Visualization', *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 2301, pp. 1–15. Available at: https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1390-0_1.
- Medjahed, H., Gaillard, J.-L. and Reyrat, J.-M. (2010) 'Mycobacterium abscessus: a new player in the mycobacterial field', *Trends in Microbiology*, 18(3), pp. 117–123. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.tim.2009.12.007>.
- Medjahed, H. and Reyrat, J.-M. (2009) 'Construction of Mycobacterium abscessus defined glycopeptidolipid mutants: comparison of genetic tools', *Applied and Environmental Microbiology*, 75(5), pp. 1331–1338. Available at: <https://doi.org/10.1128/AEM.01914-08>.
- Mercier, R. *et al.* (2008) 'The MatP/matS site-specific system organizes the terminus region of the E. coli chromosome into a macrodomain', *Cell*, 135(3), pp. 475–485. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.08.031>.
- Mercier, R., Espéli, O. and Boccard, F. (2009) '[Bacterial chromosome organization]', *Medecine Sciences: M/S*, 25(11), pp. 885–887. Available at: <https://doi.org/10.1051/medsci/20092511885>.
- Meyer, A.S. and Grainger, D.C. (2013) 'The Escherichia coli Nucleoid in Stationary Phase', *Advances in Applied Microbiology*, 83, pp. 69–86. Available at: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407678-5.00002-7>.
- Mishra, A. *et al.* (2013) 'Integration host factor of Mycobacterium tuberculosis, mIHF, compacts DNA by a bending mechanism', *PloS One*, 8(7), p. e69985. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069985>.
- Moore, M. and Frerichs, J.B. (1953) 'An unusual acid-fast infection of the knee with subcutaneous, abscess-like lesions of the gluteal region; report of a case with a study of the organism, Mycobacterium abscessus, n. sp', *The Journal of Investigative Dermatology*, 20(2), pp. 133–169. Available at: <https://doi.org/10.1038/jid.1953.18>.
- Mooren, V.H.J.F. *et al.* (2017) 'Disseminated Mycobacterium abscessus infection in a peritoneal dialysis patient', *IDCases*, 9, pp. 6–7. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.idcr.2017.05.001>.
- Moorthy, R.S., Valluri, S. and Rao, N.A. (2012) 'Nontuberculous mycobacterial ocular and adnexal infections', *Survey of Ophthalmology*, 57(3), pp. 202–235. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.survophthal.2011.10.006>.
- Morales, P., Gil, A. and Santos, M. (2010) 'Mycobacterium abscessus infection in transplant recipients', *Transplantation Proceedings*, 42(8), pp. 3058–3060. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2010.08.004>.
- Mougari, F. *et al.* (2016) 'Infections caused by Mycobacterium abscessus: epidemiology, diagnostic tools and treatment', *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 14(12), pp. 1139–1154. Available at: <https://doi.org/10.1080/14787210.2016.1238304>.
- Mufti, A.H. *et al.* (2005) 'Mycobacterium abscessus infection after use of tumor necrosis factor alpha inhibitor therapy: case report and review of infectious complications associated with tumor necrosis factor alpha inhibitor use', *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 53(3), pp. 233–238. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2005.06.006>.

- Murtin, C. *et al.* (1998) 'A quantitative UV laser footprinting analysis of the interaction of IHF with specific binding sites: re-evaluation of the effective concentration of IHF in the cell', *Journal of Molecular Biology*, 284(4), pp. 949–961. Available at: <https://doi.org/10.1006/jmbi.1998.2256>.
- Nakano, S. *et al.* (2022) 'A case of a preschool child with a successful kidney transplant following the long-term administration of antibiotics to treat peritoneal dialysis-related ESI/peritonitis by Mycobacterium abscessus', *CEN case reports*, 11(4), pp. 408–411. Available at: <https://doi.org/10.1007/s13730-022-00689-z>.
- Nash, K.A., Brown-Elliott, B.A. and Wallace, R.J. (2009) 'A novel gene, erm(41), confers inducible macrolide resistance to clinical isolates of Mycobacterium abscessus but is absent from Mycobacterium chelonae', *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(4), pp. 1367–1376. Available at: <https://doi.org/10.1128/AAC.01275-08>.
- Navarre, W.W. *et al.* (2006) 'Selective silencing of foreign DNA with low GC content by the H-NS protein in Salmonella', *Science (New York, N.Y.)*, 313(5784), pp. 236–238. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.1128794>.
- Navarre, W.W. *et al.* (2007) 'Silencing of xenogeneic DNA by H-NS-facilitation of lateral gene transfer in bacteria by a defense system that recognizes foreign DNA', *Genes & Development*, 21(12), pp. 1456–1471. Available at: <https://doi.org/10.1101/gad.1543107>.
- Nick, J.A. *et al.* (2022) 'Case Study: Host and Pathogen Response to Bacteriophage Engineered Against Mycobacterium abscessus Lung Infection', *Cell*, 185(11), pp. 1860–1874.e12. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.04.024>.
- Nielsen, H.J. *et al.* (2006) 'The Escherichia coli chromosome is organized with the left and right chromosome arms in separate cell halves', *Molecular Microbiology*, 62(2), pp. 331–338. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05346.x>.
- Nieto, J.M. *et al.* (1991) 'The hha gene modulates haemolysin expression in Escherichia coli', *Molecular Microbiology*, 5(5), pp. 1285–1293. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1991.tb01902.x>.
- Niki, H., Yamaichi, Y. and Hiraga, S. (2000) 'Dynamic organization of chromosomal DNA in Escherichia coli', *Genes & Development*, 14(2), pp. 212–223. Available at: <https://doi.org/10.1101/gad.14.2.212>.
- van Noort, J. *et al.* (2004) 'Dual architectural roles of HU: formation of flexible hinges and rigid filaments', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(18), pp. 6969–6974. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.0308230101>.
- Nordlund, P. and Reichard, P. (2006) 'Ribonucleotide reductases', *Annual Review of Biochemistry*, 75, pp. 681–706. Available at: <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.75.103004.142443>.
- Oberto, J. *et al.* (2009) 'The HU Regulon Is Composed of Genes Responding to Anaerobiosis, Acid Stress, High Osmolarity and SOS Induction', *PLoS ONE*, 4(2). Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004367>.
- Odermatt, N.T. *et al.* (2017) 'Rv3852 (H-NS) of Mycobacterium tuberculosis Is Not Involved in Nucleoid Compaction and Virulence Regulation', *Journal of Bacteriology*, 199(16), pp. e00129–17. Available at: <https://doi.org/10.1128/JB.00129-17>.

- Odermatt, N.T. *et al.* (2018) 'Essential Nucleoid Associated Protein mIHF (Rv1388) Controls Virulence and Housekeeping Genes in *Mycobacterium tuberculosis*', *Scientific Reports*, 8(1), p. 14214. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41598-018-32340-2>.
- Oftung, F., Mustafa, A.S. and Wiker, H.G. (2000) 'Extensive sequence homology between the mycobacterium leprae LSR (12 kDa) antigen and its *Mycobacterium tuberculosis* counterpart', *FEMS immunology and medical microbiology*, 27(1), pp. 87–89. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2000.tb01416.x>.
- Ogura, T. *et al.* (1990) 'Maintenance of plasmids in HU and IHF mutants of *Escherichia coli*', *Molecular & general genetics: MGG*, 220(2), pp. 197–203. Available at: <https://doi.org/10.1007/BF00260482>.
- Ojha, A. *et al.* (2005) 'GroEL1: a dedicated chaperone involved in mycolic acid biosynthesis during biofilm formation in mycobacteria', *Cell*, 123(5), pp. 861–873. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.09.012>.
- Olekhovich, I.N. and Kadner, R.J. (2007) 'Role of nucleoid-associated proteins Hha and H-NS in expression of *Salmonella enterica* activators HilD, HilC, and RtsA required for cell invasion', *Journal of Bacteriology*, 189(19), pp. 6882–6890. Available at: <https://doi.org/10.1128/JB.00905-07>.
- Olivier, K.N. *et al.* (2003) 'Nontuberculous mycobacteria. I: multicenter prevalence study in cystic fibrosis', *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 167(6), pp. 828–834. Available at: <https://doi.org/10.1164/rccm.200207-678OC>.
- Ong, T. and Ramsey, B.W. (2023) 'Cystic Fibrosis: A Review', *JAMA*, 329(21), pp. 1859–1871. Available at: <https://doi.org/10.1001/jama.2023.8120>.
- Orihuela, C.J. *et al.* (2009) 'Laminin receptor initiates bacterial contact with the blood brain barrier in experimental meningitis models', *The Journal of Clinical Investigation*, 119(6), pp. 1638–1646. Available at: <https://doi.org/10.1172/JCI36759>.
- Ose, N. *et al.* (2019) 'Nontuberculous mycobacterial infection after lung transplantation: a report of four cases', *Surgical Case Reports*, 5(1), p. 11. Available at: <https://doi.org/10.1186/s40792-019-0565-1>.
- Ovrutsky, A.R. *et al.* (2013) 'Cooccurrence of free-living amoebae and nontuberculous *Mycobacteria* in hospital water networks, and preferential growth of *Mycobacterium avium* in *Acanthamoeba lenticulata*', *Applied and Environmental Microbiology*, 79(10), pp. 3185–3192. Available at: <https://doi.org/10.1128/AEM.03823-12>.
- Paino, A. *et al.* (2012) 'Interleukin-1 β is internalised by viable *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* biofilm and locates to the outer edges of nucleoids', *Cytokine*, 60(2), pp. 565–574. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2012.07.024>.
- Pandey, S.D. *et al.* (2014) 'Iron-Regulated Protein HupB of *Mycobacterium tuberculosis* Positively Regulates Siderophore Biosynthesis and Is Essential for Growth in Macrophages', *Journal of Bacteriology*, 196(10), pp. 1853–1865. Available at: <https://doi.org/10.1128/JB.01483-13>.
- Park, I.K. *et al.* (2015) 'Clonal Diversification and Changes in Lipid Traits and Colony Morphology in *Mycobacterium abscessus* Clinical Isolates', *Journal of Clinical Microbiology*, 53(11), pp. 3438–3447. Available at: <https://doi.org/10.1128/JCM.02015-15>.

- Park, Y. *et al.* (2022) ‘Nontuberculous mycobacterial infection after lung transplantation: A single-center experience in South Korea’, *Journal of Microbiology, Immunology, and Infection = Wei Mian Yu Gan Ran Za Zhi*, 55(1), pp. 123–129. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2020.08.021>.
- Parmar, S. and Tocheva, E.I. (2023) ‘The cell envelope of *Mycobacterium abscessus* and its role in pathogenesis’, *PLoS pathogens*, 19(5), p. e1011318. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1011318>.
- Parte, A.C. (2014) ‘LPSN--list of prokaryotic names with standing in nomenclature’, *Nucleic Acids Research*, 42(Database issue), pp. D613–616. Available at: <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1111>.
- Paul, P. *et al.* (2022) ‘The Hha–TomB toxin–antitoxin module in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium limits its intracellular survival profile and regulates host immune response’, *Cell Biology and Toxicology*, 38(1), pp. 111–127. Available at: <https://doi.org/10.1007/s10565-021-09587-z>.
- Pawlik, A. *et al.* (2013) ‘Identification and characterization of the genetic changes responsible for the characteristic smooth-to-rough morphotype alterations of clinically persistent *Mycobacterium abscessus*’, *Molecular Microbiology*, 90(3), pp. 612–629. Available at: <https://doi.org/10.1111/mmi.12387>.
- Pedulla, M.L. *et al.* (1996) ‘A novel host factor for integration of mycobacteriophage L5’, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(26), pp. 15411–15416. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.93.26.15411>.
- Pelletier, J. *et al.* (2012) ‘Physical manipulation of the *Escherichia coli* chromosome reveals its soft nature’, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(40), pp. E2649–2656. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.1208689109>.
- Perez-Rueda, E. and Ibarra, J.A. (2015) ‘Distribution of putative xenogeneic silencers in prokaryote genomes’, *Computational Biology and Chemistry*, 58, pp. 167–172. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.compbiolchem.2015.06.007>.
- Peter, B.J. *et al.* (2004) ‘Genomic transcriptional response to loss of chromosomal supercoiling in *Escherichia coli*’, *Genome Biology*, 5(11), p. R87. Available at: <https://doi.org/10.1186/gb-2004-5-11-r87>.
- Peters, J.M. *et al.* (2012) ‘Rho and NusG suppress pervasive antisense transcription in *Escherichia coli*’, *Genes & Development*, 26(23), pp. 2621–2633. Available at: <https://doi.org/10.1101/gad.196741.112>.
- Pfeifer, E. *et al.* (2019) ‘Impact of Xenogeneic Silencing on Phage-Host Interactions’, *Journal of Molecular Biology*, 431(23), pp. 4670–4683. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.02.011>.
- Pinault, L. *et al.* (2013) ‘Zafirlukast inhibits complexation of Lsr2 with DNA and growth of *Mycobacterium tuberculosis*’, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(5), pp. 2134–2140. Available at: <https://doi.org/10.1128/AAC.02407-12>.
- Płociński, P. *et al.* (2019) ‘Proteomic and transcriptomic experiments reveal an essential role of RNA degradosome complexes in shaping the transcriptome of *Mycobacterium*

- tuberculosis', *Nucleic Acids Research*, 47(11), pp. 5892–5905. Available at: <https://doi.org/10.1093/nar/gkz251>.
- Porter, M.E. and Dorman, C.J. (1997) 'Positive regulation of *Shigella flexneri* virulence genes by integration host factor', *Journal of Bacteriology*, 179(21), pp. 6537–6550. Available at: <https://doi.org/10.1128/jb.179.21.6537-6550.1997>.
- Postow, L. *et al.* (2004) 'Topological domain structure of the *Escherichia coli* chromosome', *Genes & Development*, 18(14), pp. 1766–1779. Available at: <https://doi.org/10.1101/gad.1207504>.
- Prieto, A.I. *et al.* (2012) 'Genomic analysis of DNA binding and gene regulation by homologous nucleoid-associated proteins IHF and HU in *Escherichia coli* K12', *Nucleic Acids Research*, 40(8), pp. 3524–3537. Available at: <https://doi.org/10.1093/nar/gkr1236>.
- Procop, G.W. (2017) 'HIV and mycobacteria', *Seminars in Diagnostic Pathology*, 34(4), pp. 332–339. Available at: <https://doi.org/10.1053/j.semmp.2017.04.006>.
- Puk, K. *et al.* (2018) 'Detection of *Mycobacterium marinum*, *M. peregrinum*, *M. fortuitum* and *M. abscessus* in aquarium fish', *Journal of Fish Diseases*, 41(1), pp. 153–156. Available at: <https://doi.org/10.1111/jfd.12666>.
- Puk, K. and Guz, L. (2020) 'Occurrence of *Mycobacterium* spp. in ornamental fish', *Annals of agricultural and environmental medicine: AAEM*, 27(4), pp. 535–539. Available at: <https://doi.org/10.26444/aaem/114913>.
- Qin, L. *et al.* (2019) 'The architects of bacterial DNA bridges: a structurally and functionally conserved family of proteins', *Open Biology*, 9(12), p. 190223. Available at: <https://doi.org/10.1098/rsob.190223>.
- Qu, Y. *et al.* (2013) 'Mechanism of DNA organization by *Mycobacterium tuberculosis* protein Lsr2', *Nucleic Acids Research*, 41(10), pp. 5263–5272. Available at: <https://doi.org/10.1093/nar/gkt249>.
- Qvist, T. *et al.* (2016) 'Comparing the harmful effects of nontuberculous mycobacteria and Gram negative bacteria on lung function in patients with cystic fibrosis', *Journal of Cystic Fibrosis: Official Journal of the European Cystic Fibrosis Society*, 15(3), pp. 380–385. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2015.09.007>.
- Rafi, M.O. *et al.* (2023) 'A subunit vaccine against pneumonia: targeting *Streptococcus pneumoniae* and *Klebsiella pneumoniae*', *Network Modeling and Analysis in Health Informatics and Bioinformatics*, 12(1), p. 21. Available at: <https://doi.org/10.1007/s13721-023-00416-3>.
- Rajapaksha, N. *et al.* (2023) 'Pseudomonas aeruginosa Dps (PA0962) Functions in H₂O₂ Mediated Oxidative Stress Defense and Exhibits In Vitro DNA Cleaving Activity', *International Journal of Molecular Sciences*, 24(5), p. 4669. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms24054669>.
- Rashid, F.-Z.M., Detmar, L. and Dame, R.T. (2022) 'Chromosome Conformation Capture in Bacteria and Archaea', *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 2516, pp. 1–28. Available at: https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2413-5_1.

- Regard, L. *et al.* (2022) ‘CFTR Modulators in People with Cystic Fibrosis: Real-World Evidence in France’, *Cells*, 11(11), p. 1769. Available at: <https://doi.org/10.3390/cells11111769>.
- Reisfeld, L. *et al.* (2018) ‘Cutaneous mycobacteriosis in a captive Amazonian manatee *Trichechus inunguis*’, *Diseases of Aquatic Organisms*, 127(3), pp. 231–236. Available at: <https://doi.org/10.3354/dao03196>.
- Remesh, S.G. *et al.* (2020) ‘Nucleoid remodeling during environmental adaptation is regulated by HU-dependent DNA bundling’, *Nature Communications*, 11, p. 2905. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16724-5>.
- Ren, D. *et al.* (2004) ‘Gene expression in Escherichia coli biofilms’, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 64(4), pp. 515–524. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00253-003-1517-y>.
- Reverchon, S. *et al.* (2020) ‘The nucleoid-associated protein IHF acts as a “transcriptional domainin” protein coordinating the bacterial virulence traits with global transcription’, *Nucleic Acids Research*, 49(2), pp. 776–790. Available at: <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa1227>.
- Rice, P.A. *et al.* (1996) ‘Crystal structure of an IHF-DNA complex: a protein-induced DNA U-turn’, *Cell*, 87(7), pp. 1295–1306. Available at: [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81824-3](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81824-3).
- Richard, M. *et al.* (2019) ‘Mutations in the MAB_2299c TetR Regulator Confer Cross-Resistance to Clofazimine and Bedaquiline in Mycobacterium abscessus’, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 63(1), pp. e01316-18. Available at: <https://doi.org/10.1128/AAC.01316-18>.
- Richard, M., Gutiérrez, A.V. and Kremer, L. (2020) ‘Dissecting erm(41)-Mediated Macrolide-Inducible Resistance in Mycobacterium abscessus’, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 64(2), pp. e01879-19. Available at: <https://doi.org/10.1128/AAC.01879-19>.
- Richey, L.E., Bahadorani, J. and Mushatt, D. (2013) ‘Endovascular Mycobacterium abscessus infection in a heart transplant recipient: a case report and review of the literature’, *Transplant Infectious Disease: An Official Journal of the Transplantation Society*, 15(2), pp. 208–213. Available at: <https://doi.org/10.1111/tid.12024>.
- Riordan, J.R. *et al.* (1989) ‘Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA’, *Science (New York, N.Y.)*, 245(4922), pp. 1066–1073. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.2475911>.
- Ripoll, F. *et al.* (2007) ‘Genomics of glycopeptidolipid biosynthesis in Mycobacterium abscessus and M. chelonae’, *BMC genomics*, 8, p. 114. Available at: <https://doi.org/10.1186/1471-2164-8-114>.
- Ripoll, F. *et al.* (2009) ‘Non mycobacterial virulence genes in the genome of the emerging pathogen Mycobacterium abscessus’, *PloS One*, 4(6), p. e5660. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005660>.
- Robson, R.L., Reed, N.A. and Horvat, R.T. (2006) ‘Differential activation of inflammatory pathways in A549 type II pneumocytes by Streptococcus pneumoniae strains with different

adherence properties', *BMC infectious diseases*, 6, p. 71. Available at: <https://doi.org/10.1186/1471-2334-6-71>.

Rocha, E.P.C. (2008) 'The Organization of the Bacterial Genome', *Annual Review of Genetics*, 42(1), pp. 211–233. Available at: <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.42.110807.091653>.

Rodgers, D. *et al.* (2021) 'Histone-like nucleoid-structuring protein (H-NS) regulatory role in antibiotic resistance in *Acinetobacter baumannii*', *Scientific Reports*, 11(1), p. 18414. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41598-021-98101-w>.

Rodríguez-Güell, E. *et al.* (2006) 'The production of a new extracellular putative long-chain saturated polyester by smooth variants of *Mycobacterium vaccae* interferes with Th1-cytokine production', *Antonie Van Leeuwenhoek*, 90(1), pp. 93–108. Available at: <https://doi.org/10.1007/s10482-006-9062-1>.

Rominski, A., Selchow, P., *et al.* (2017) 'Elucidation of *Mycobacterium abscessus* aminoglycoside and capreomycin resistance by targeted deletion of three putative resistance genes', *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 72(8), pp. 2191–2200. Available at: <https://doi.org/10.1093/jac/dkx125>.

Rominski, A., Roditscheff, A., *et al.* (2017) 'Intrinsic rifamycin resistance of *Mycobacterium abscessus* is mediated by ADP-ribosyltransferase MAB_0591', *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 72(2), pp. 376–384. Available at: <https://doi.org/10.1093/jac/dkw466>.

Rosain, J. *et al.* (2019) 'Mendelian susceptibility to mycobacterial disease: 2014-2018 update', *Immunology and Cell Biology*, 97(4), pp. 360–367. Available at: <https://doi.org/10.1111/imcb.12210>.

Rottman, M. *et al.* (2007) 'Importance of T cells, gamma interferon, and tumor necrosis factor in immune control of the rapid grower *Mycobacterium abscessus* in C57BL/6 mice', *Infection and Immunity*, 75(12), pp. 5898–5907. Available at: <https://doi.org/10.1128/IAI.00014-07>.

Rouvière-Yaniv, J. and Gros, F. (1975) 'Characterization of a novel, low-molecular-weight DNA-binding protein from *Escherichia coli*.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 72(9), pp. 3428–3432.

Roux, A.-L. *et al.* (2009) 'Multicenter study of prevalence of nontuberculous mycobacteria in patients with cystic fibrosis in France', *Journal of Clinical Microbiology*, 47(12), pp. 4124–4128. Available at: <https://doi.org/10.1128/JCM.01257-09>.

Roux, A.-L. *et al.* (2011) 'Overexpression of proinflammatory TLR-2-signalling lipoproteins in hypervirulent mycobacterial variants', *Cellular Microbiology*, 13(5), pp. 692–704. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2010.01565.x>.

Roux, A.-L. *et al.* (2015) 'Comparing *Mycobacterium massiliense* and *Mycobacterium abscessus* lung infections in cystic fibrosis patients', *Journal of Cystic Fibrosis: Official Journal of the European Cystic Fibrosis Society*, 14(1), pp. 63–69. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2014.07.004>.

Roux, A.-L. *et al.* (2016) 'The distinct fate of smooth and rough *Mycobacterium abscessus* variants inside macrophages', *Open Biology*, 6(11), p. 160185. Available at: <https://doi.org/10.1098/rsob.160185>.

- Rüger, K. *et al.* (2014) 'Characterization of Rough and Smooth Morphotypes of *Mycobacterium abscessus* Isolates from Clinical Specimens', *Journal of Clinical Microbiology*, 52(1), pp. 244–250. Available at: <https://doi.org/10.1128/JCM.01249-13>.
- Rustad, T.R. *et al.* (2009) 'Hypoxia: a window into *Mycobacterium tuberculosis* latency', *Cellular Microbiology*, 11(8), pp. 1151–1159. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2009.01325.x>.
- Sachdeva, P. *et al.* (2010) 'The sigma factors of *Mycobacterium tuberculosis*: regulation of the regulators', *The FEBS journal*, 277(3), pp. 605–626. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2009.07479.x>.
- Saini, C. *et al.* (2013) 'Lsr2 of *Mycobacterium leprae* and its synthetic peptides elicit restitution of T cell responses in erythema nodosum leprosum and reversal reactions in patients with lepromatous leprosy', *Clinical and vaccine immunology: CVI*, 20(5), pp. 673–682. Available at: <https://doi.org/10.1128/VI.00762-12>.
- Saini, N.K. *et al.* (2016) 'Suppression of autophagy and antigen presentation by *Mycobacterium tuberculosis* PE_PGRS47', *Nature Microbiology*, 1(9), p. 16133. Available at: <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.133>.
- Saldaña-Ahuactzi, Z. *et al.* (2022) 'The Fis Nucleoid Protein Negatively Regulates the Phase Variation fimS Switch of the Type 1 Pilus Operon in Enteropathogenic *Escherichia coli*', *Frontiers in Microbiology*, 13, p. 882563. Available at: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.882563>.
- Sánchez-Chardi, A. *et al.* (2020) 'Demonstration of Cord Formation by Rough *Mycobacterium abscessus* Variants: Implications for the Clinical Microbiology Laboratory', *Journal of Clinical Microbiology*, 49(6), pp. 2293–2295. Available at: <https://doi.org/10.1128/jcm.02322-10>.
- Sasseti, C.M., Boyd, D.H. and Rubin, E.J. (2003) 'Genes required for mycobacterial growth defined by high density mutagenesis', *Molecular Microbiology*, 48(1), pp. 77–84. Available at: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03425.x>.
- Sato, Y.T. *et al.* (2013) 'Structural change of DNA induced by nucleoid proteins: growth phase-specific Fis and stationary phase-specific Dps', *Biophysical Journal*, 105(4), pp. 1037–1044. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2013.07.025>.
- Sayes, F. *et al.* (2012) 'Strong immunogenicity and cross-reactivity of *Mycobacterium tuberculosis* ESX-5 type VII secretion: encoded PE-PPE proteins predicts vaccine potential', *Cell Host & Microbe*, 11(4), pp. 352–363. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.chom.2012.03.003>.
- Schechter, L.M. *et al.* (2003) 'The small nucleoid-binding proteins H-NS, HU, and Fis affect hlaA expression in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium', *Infection and Immunity*, 71(9), pp. 5432–5435. Available at: <https://doi.org/10.1128/IAI.71.9.5432-5435.2003>.
- Schedlbauer, A. *et al.* (2015) 'Structural characterization of an alternative mode of tigecycline binding to the bacterial ribosome', *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59(5), pp. 2849–2854. Available at: <https://doi.org/10.1128/AAC.04895-14>.

- Schubert, O.T. *et al.* (2013) 'The Mtb Proteome Library: A Resource of Assays to Quantify the Complete Proteome of Mycobacterium tuberculosis', *Cell host & microbe*, 13(5), pp. 602–612. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.chom.2013.04.008>.
- Sela, S. *et al.* (1991) 'Identification of Mycobacterium leprae antigens from a cosmid library: characterization of a 15-kilodalton antigen that is recognized by both the humoral and cellular immune systems in leprosy patients', *Infection and Immunity*, 59(11), pp. 4117–4124. Available at: <https://doi.org/10.1128/iai.59.11.4117-4124.1991>.
- Sharma, S.K. and Upadhyay, V. (2020) 'Epidemiology, diagnosis & treatment of non-tuberculous mycobacterial diseases', *The Indian Journal of Medical Research*, 152(3), pp. 185–226. Available at: https://doi.org/10.4103/ijmr.IJMR_902_20.
- Sharma, V. *et al.* (2021) 'Phylogenetic Distribution of WhiB- and Lsr2-Type Regulators in Actinobacteriophage Genomes', *Microbiology Spectrum*, 9(3), p. e0072721. Available at: <https://doi.org/10.1128/Spectrum.00727-21>.
- Sharma, V.K., Carlson, S.A. and Casey, T.A. (2005) 'Hyperadherence of an hha mutant of Escherichia coli O157:H7 is correlated with enhanced expression of LEE-encoded adherence genes', *FEMS microbiology letters*, 243(1), pp. 189–196. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2004.12.003>.
- Shi, S. *et al.* (2022) 'Zafirlukast inhibits the growth of lung adenocarcinoma via inhibiting TMEM16A channel activity', *The Journal of Biological Chemistry*, 298(3), p. 101731. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2022.101731>.
- Shteinberg, M. *et al.* (2021) 'Cystic fibrosis', *Lancet (London, England)*, 397(10290), pp. 2195–2211. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)32542-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)32542-3).
- Shu, J.-C. *et al.* (2013) 'Differential regulation and activity against oxidative stress of Dps proteins in Bacillus cereus', *International journal of medical microbiology: IJMM*, 303(8), pp. 662–673. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2013.09.011>.
- Siegrist, M.S. *et al.* (2009) 'Mycobacterial Esx-3 is required for mycobactin-mediated iron acquisition', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(44), pp. 18792–18797. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.0900589106>.
- Sieira, R. *et al.* (2004) 'Integration host factor is involved in transcriptional regulation of the Brucella abortus virB operon', *Molecular Microbiology*, 54(3), pp. 808–822. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04316.x>.
- Singh, N. *et al.* (2022) 'HupB, a nucleoid-associated protein, is critical for survival of Mycobacterium tuberculosis under host-mediated stresses and for enhanced tolerance to key first-line antibiotics', *Frontiers in Microbiology*, 13, p. 937970. Available at: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.937970>.
- Singh, S. *et al.* (1994) 'Critical residues of the Mycobacterium leprae LSR recombinant protein discriminate clinical activity in erythema nodosum leprosum reactions', *Infection and Immunity*, 62(12), pp. 5702–5705. Available at: <https://doi.org/10.1128/iai.62.12.5702-5705.1994>.
- Singh, S.K. (2017) 'Staphylococcus aureus intracellular survival: A closer look in the process', *Virulence*, 8(8), pp. 1506–1507. Available at: <https://doi.org/10.1080/21505594.2017.1384896>.

- Singh, S.S. *et al.* (2014) 'Widespread suppression of intragenic transcription initiation by H-NS', *Genes & Development*, 28(3), pp. 214–219. Available at: <https://doi.org/10.1101/gad.234336.113>.
- Skoko, D. *et al.* (2006) 'Mechanism of chromosome compaction and looping by the *Escherichia coli* nucleoid protein Fis', *Journal of Molecular Biology*, 364(4), pp. 777–798. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.09.043>.
- Smibert, O. *et al.* (2016) 'Mycobacterium abscessus Complex - a Particular Challenge in the Setting of Lung Transplantation', *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 14(3), pp. 325–333. Available at: <https://doi.org/10.1586/14787210.2016.1138856>.
- Sohn, H. *et al.* (2009) 'High virulent clinical isolates of *Mycobacterium abscessus* from patients with the upper lobe fibrocavitary form of pulmonary disease', *Microbial Pathogenesis*, 47(6), pp. 321–328. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2009.09.010>.
- St John, G. *et al.* (2001) 'Peptide methionine sulfoxide reductase from *Escherichia coli* and *Mycobacterium tuberculosis* protects bacteria against oxidative damage from reactive nitrogen intermediates', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(17), pp. 9901–9906. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.161295398>.
- Stavrum, R. *et al.* (2012) 'Mycobacterium tuberculosis Mce1 protein complex initiates rapid induction of transcription of genes involved in substrate trafficking', *Genes and Immunity*, 13(6), pp. 496–502. Available at: <https://doi.org/10.1038/gene.2012.24>.
- Steen, Jason A. *et al.* (2010) 'Fis is essential for capsule production in *Pasteurella multocida* and regulates expression of other important virulence factors', *PLoS pathogens*, 6(2), p. e1000750. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000750>.
- Stein, R.A., Deng, S. and Higgins, N.P. (2005) 'Measuring chromosome dynamics on different time scales using resolvases with varying half-lives', *Molecular Microbiology*, 56(4), pp. 1049–1061. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04588.x>.
- Stella, S., Cascio, D. and Johnson, R.C. (2010) 'The shape of the DNA minor groove directs binding by the DNA-bending protein Fis', *Genes & Development*, 24(8), pp. 814–826. Available at: <https://doi.org/10.1101/gad.1900610>.
- Stewart, G.R. *et al.* (2002) 'Dissection of the heat-shock response in *Mycobacterium tuberculosis* using mutants and microarrays', *Microbiology (Reading, England)*, 148(Pt 10), pp. 3129–3138. Available at: <https://doi.org/10.1099/00221287-148-10-3129>.
- Stinear, T.P. *et al.* (2008) 'Insights from the complete genome sequence of *Mycobacterium marinum* on the evolution of *Mycobacterium tuberculosis*', *Genome Research*, 18(5), pp. 729–741. Available at: <https://doi.org/10.1101/gr.075069.107>.
- Stojkova, P. and Spidlova, P. (2022) 'Bacterial nucleoid-associated protein HU as an extracellular player in host-pathogen interaction', *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 12, p. 999737. Available at: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.999737>.
- Stojkova, P., Spidlova, P. and Stulik, J. (2019) 'Nucleoid-Associated Protein HU: A Lilliputian in Gene Regulation of Bacterial Virulence', *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 9, p. 159. Available at: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00159>.

- Stonehouse, E. *et al.* (2008) 'Integration host factor positively regulates virulence gene expression in *Vibrio cholerae*', *Journal of Bacteriology*, 190(13), pp. 4736–4748. Available at: <https://doi.org/10.1128/JB.00089-08>.
- Summers, E.L. *et al.* (2012) 'The Structure of the Oligomerization Domain of Lsr2 from *Mycobacterium tuberculosis* Reveals a Mechanism for Chromosome Organization and Protection', *PLoS ONE*, 7(6), p. e38542. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038542>.
- Swiercz, J.P. *et al.* (2013) 'A novel nucleoid-associated protein specific to the actinobacteria', *Nucleic Acids Research*, 41(7), pp. 4171–4184. Available at: <https://doi.org/10.1093/nar/gkt095>.
- Swinger, K.K. and Rice, P.A. (2007) 'Structure-based analysis of HU-DNA binding', *Journal of Molecular Biology*, 365(4), pp. 1005–1016. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.10.024>.
- Takayama, K., Wang, C. and Besra, G.S. (2005) 'Pathway to Synthesis and Processing of Mycolic Acids in *Mycobacterium tuberculosis*', *Clinical Microbiology Reviews*, 18(1), pp. 81–101. Available at: <https://doi.org/10.1128/CMR.18.1.81-101.2005>.
- Taylor, A.B. *et al.* (2003) 'Structure of *Mycobacterium tuberculosis* methionine sulfoxide reductase A in complex with protein-bound methionine', *Journal of Bacteriology*, 185(14), pp. 4119–4126. Available at: <https://doi.org/10.1128/JB.185.14.4119-4126.2003>.
- Taylor, J.L. and Palmer, S.M. (2006) 'Mycobacterium abscessus Chest Wall and Pulmonary Infection in a Cystic Fibrosis Lung Transplant Recipient', *The Journal of Heart and Lung Transplantation*, 25(8), pp. 985–988. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.healun.2006.04.003>.
- Thomas, C. and Tampé, R. (2020) 'Structural and Mechanistic Principles of ABC Transporters', *Annual Review of Biochemistry*, 89, pp. 605–636. Available at: <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-011520-105201>.
- Thomson, R., Tolson, C., Carter, R., *et al.* (2013a) 'Isolation of nontuberculous mycobacteria (NTM) from household water and shower aerosols in patients with pulmonary disease caused by NTM', *Journal of Clinical Microbiology*, 51(9), pp. 3006–3011. Available at: <https://doi.org/10.1128/JCM.00899-13>.
- Thomson, R., Tolson, C., Sidjabat, H., *et al.* (2013b) 'Mycobacterium abscessus isolated from municipal water - a potential source of human infection', *BMC infectious diseases*, 13, p. 241. Available at: <https://doi.org/10.1186/1471-2334-13-241>.
- To, K. *et al.* (2020) 'General Overview of Nontuberculous Mycobacteria Opportunistic Pathogens: *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium abscessus*', *Journal of Clinical Medicine*, 9(8), p. 2541. Available at: <https://doi.org/10.3390/jcm9082541>.
- Tolhuis, B. *et al.* (2002) 'Looping and Interaction between Hypersensitive Sites in the Active β -globin Locus', *Molecular Cell*, 10(6), pp. 1453–1465. Available at: [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(02\)00781-5](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(02)00781-5).
- Tortoli, E. *et al.* (2016) 'Emended description of *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium abscessus* subsp. *abscessus* and *Mycobacterium abscessus* subsp. *bolletii* and designation of *Mycobacterium abscessus* subsp. *massiliense* comb. nov.', *International Journal of Systematic*

and *Evolutionary Microbiology*, 66(11), pp. 4471–4479. Available at: <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001376>.

Tortoli, E. *et al.* (2017) ‘The new phylogeny of the genus *Mycobacterium*: The old and the news’, *Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases*, 56, pp. 19–25. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2017.10.013>.

Trussart, M. *et al.* (2017) ‘Defined chromosome structure in the genome-reduced bacterium *Mycoplasma pneumoniae*’, *Nature Communications*, 8, p. 14665. Available at: <https://doi.org/10.1038/ncomms14665>.

Tu, W.Y. *et al.* (2012) ‘The iron-binding protein Dps2 confers peroxide stress resistance on *Bacillus anthracis*’, *Journal of Bacteriology*, 194(5), pp. 925–931. Available at: <https://doi.org/10.1128/JB.06005-11>.

Tufariello, J.M. *et al.* (2016) ‘Separable roles for *Mycobacterium tuberculosis* ESX-3 effectors in iron acquisition and virulence’, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(3), pp. E348–357. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.1523321113>.

Tulli, L. *et al.* (2013) ‘CbpA: a novel surface exposed adhesin of *Clostridium difficile* targeting human collagen’, *Cellular Microbiology*, 15(10), pp. 1674–1687. Available at: <https://doi.org/10.1111/cmi.12139>.

Turapov, O. *et al.* (2018) ‘Two Faces of CwlM, an Essential PknB Substrate, in *Mycobacterium tuberculosis*’, *Cell Reports*, 25(1), p. 57. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.09.004>.

Turenne, C.Y. (2019) ‘Nontuberculous mycobacteria: Insights on taxonomy and evolution’, *Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases*, 72, pp. 159–168. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2019.01.017>.

Ueguchi, C. *et al.* (1994) ‘An analogue of the DnaJ molecular chaperone in *Escherichia coli*’, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(3), pp. 1054–1058. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.91.3.1054>.

Ung, K.L. *et al.* (2019) ‘Crystal structure of the aminoglycosides N-acetyltransferase Eis2 from *Mycobacterium abscessus*’, *The FEBS journal*, 286(21), pp. 4342–4355. Available at: <https://doi.org/10.1111/febs.14975>.

Ushijima, Y., Ohniwa, R.L. and Morikawa, K. (2017) ‘Identification of nucleoid associated proteins (NAPs) under oxidative stress in *Staphylococcus aureus*’, *BMC Microbiology*, 17, p. 207. Available at: <https://doi.org/10.1186/s12866-017-1114-3>.

Valens, M. *et al.* (2004) ‘Macrodomain organization of the *Escherichia coli* chromosome’, *The EMBO journal*, 23(21), pp. 4330–4341. Available at: <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600434>.

van der Valk, R.A. *et al.* (2017) ‘Mechanism of environmentally driven conformational changes that modulate H-NS DNA-bridging activity’, *eLife*, 6, p. e27369. Available at: <https://doi.org/10.7554/eLife.27369>.

- Valkenburg, J.A. and Woldringh, C.L. (1984) 'Phase separation between nucleoid and cytoplasm in *Escherichia coli* as defined by immersive refractometry', *Journal of Bacteriology*, 160(3), pp. 1151–1157. Available at: <https://doi.org/10.1128/jb.160.3.1151-1157.1984>.
- Vallet-Gely, I. and Boccard, F. (2013) 'Chromosomal organization and segregation in *Pseudomonas aeruginosa*', *PLoS genetics*, 9(5), p. e1003492. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003492>.
- Varghese, B. *et al.* (2012) 'First case report of chronic pulmonary lung disease caused by *Mycobacterium abscessus* in two immunocompetent patients in Saudi Arabia', *Annals of Saudi Medicine*, 32(3), pp. 312–314. Available at: <https://doi.org/10.5144/0256-4947.2012.312>.
- Vazquez Nunez, R., Ruiz Avila, L.B. and Gruber, S. (2019) 'Transient DNA Occupancy of the SMC Interarm Space in Prokaryotic Condensin', *Molecular Cell*, 75(2), pp. 209–223.e6. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.05.001>.
- Venugopal, A. *et al.* (2011) 'Virulence of *Mycobacterium tuberculosis* depends on lipoamide dehydrogenase, a member of three multienzyme complexes', *Cell Host & Microbe*, 9(1), pp. 21–31. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.chom.2010.12.004>.
- Verma, S.C., Qian, Z. and Adhya, S.L. (2019) 'Architecture of the *Escherichia coli* nucleoid', *PLoS genetics*, 15(12), p. e1008456. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008456>.
- Vilchèze, C. and Kremer, L. (2017) 'Acid-Fast Positive and Acid-Fast Negative *Mycobacterium tuberculosis*: The Koch Paradox', *Microbiology Spectrum*, 5(2). Available at: <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.TBTB2-0003-2015>.
- Viljoen, A. *et al.* (2017) 'The diverse family of MmpL transporters in mycobacteria: from regulation to antimicrobial developments', *Molecular Microbiology*, 104(6), pp. 889–904. Available at: <https://doi.org/10.1111/mmi.13675>.
- Viollier, P.H. *et al.* (2004) 'Rapid and sequential movement of individual chromosomal loci to specific subcellular locations during bacterial DNA replication', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(25), pp. 9257–9262. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.0402606101>.
- Vishwakarma, V. *et al.* (2014) 'TTSS2-deficient hha mutant of *Salmonella Typhimurium* exhibits significant systemic attenuation in immunocompromised hosts', *Virulence*, 5(2), pp. 311–320. Available at: <https://doi.org/10.4161/viru.27605>.
- de Vries, R. (2010) 'DNA condensation in bacteria: Interplay between macromolecular crowding and nucleoid proteins', *Biochimie*, 92(12), pp. 1715–1721. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2010.06.024>.
- Wade, J.T. and Grainger, D.C. (2018) 'Waking the neighbours: disruption of H-NS repression by overlapping transcription', *Molecular Microbiology*, 108(3), pp. 221–225. Available at: <https://doi.org/10.1111/mmi.13939>.
- Walker, K.A. *et al.* (2004) 'The *Escherichia coli* Fis promoter is regulated by changes in the levels of its transcription initiation nucleotide CTP', *The Journal of Biological Chemistry*, 279(49), pp. 50818–50828. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M406285200>.

- Wan, B. *et al.* (2016) 'Global transcriptional regulation by H-NS and its biological influence on the virulence of Enterohemorrhagic Escherichia coli', *Gene*, 588(2), pp. 115–123. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.gene.2016.05.007>.
- Wang, G., Lo, L.F. and Maier, R.J. (2012) 'A histone-like protein of Helicobacter pylori protects DNA from stress damage and aids host colonization', *DNA Repair*, 11(9), pp. 733–740. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2012.06.006>.
- Wang, S. *et al.* (2014) 'Characterization and development of photoactivatable fluorescent proteins for single-molecule-based superresolution imaging', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(23), pp. 8452–8457. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.1406593111>.
- Wang, X. *et al.* (2015) 'Condensin promotes the juxtaposition of DNA flanking its loading site in Bacillus subtilis', *Genes & Development*, 29(15), pp. 1661–1675. Available at: <https://doi.org/10.1101/gad.265876.115>.
- Wang, X. and Rudner, D.Z. (2014) 'Spatial organization of bacterial chromosomes', *Current opinion in microbiology*, 22, pp. 66–72. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.mib.2014.09.016>.
- Wasim, A., Gupta, A. and Mondal, J. (2021) 'A Hi-C data-integrated model elucidates E. coli chromosome's multiscale organization at various replication stages', *Nucleic Acids Research*, 49(6), pp. 3077–3091. Available at: <https://doi.org/10.1093/nar/gkab094>.
- Werlang, I.C.R. *et al.* (2009) 'Identification of Rv3852 as a nucleoid-associated protein in Mycobacterium tuberculosis', *Microbiology (Reading, England)*, 155(Pt 8), pp. 2652–2663. Available at: <https://doi.org/10.1099/mic.0.030148-0>.
- Wetzstein, N. *et al.* (2023) 'Molecular Epidemiology of Mycobacterium abscessus Isolates Recovered from German Cystic Fibrosis Patients', *Microbiology Spectrum*, 10(4), pp. e01714-22. Available at: <https://doi.org/10.1128/spectrum.01714-22>.
- Wiechert, J. *et al.* (2020) 'Deciphering the Rules Underlying Xenogeneic Silencing and Counter-Silencing of Lsr2-like Proteins Using CgpS of Corynebacterium glutamicum as a Model', *mBio*, 11(1), pp. e02273-19. Available at: <https://doi.org/10.1128/mBio.02273-19>.
- Wilson, D.N. (2014) 'Ribosome-targeting antibiotics and mechanisms of bacterial resistance', *Nature Reviews. Microbiology*, 12(1), pp. 35–48. Available at: <https://doi.org/10.1038/nrmicro3155>.
- Winthrop, K.L. *et al.* (2010) 'Pulmonary nontuberculous mycobacterial disease prevalence and clinical features: an emerging public health disease', *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 182(7), pp. 977–982. Available at: <https://doi.org/10.1164/rccm.201003-0503OC>.
- Wong, D.K. *et al.* (1999) 'Identification of fur, aconitase, and other proteins expressed by Mycobacterium tuberculosis under conditions of low and high concentrations of iron by combined two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry', *Infection and Immunity*, 67(1), pp. 327–336. Available at: <https://doi.org/10.1128/IAI.67.1.327-336.1999>.
- Worcel, A. and Burgi, E. (1972) 'On the structure of the folded chromosome††The terms folded chromosome, folded DNA, folded genome, DNA-RNA protein complex (or plain complex) are used interchangeably and they all refer to the compact, fast sedimenting, DNA-

containing structures released from *Escherichia coli* after careful lysis of the cells by the Stonington & Pettijohn (1971) procedure. of *Escherichia coli*', *Journal of Molecular Biology*, 71(2), pp. 127–147. Available at: [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(72\)90342-7](https://doi.org/10.1016/0022-2836(72)90342-7).

Xue, X.F. *et al.* (2022) 'H-NS Represses Biofilm Formation and c-di-GMP Synthesis in *Vibrio parahaemolyticus*', *Biomedical and environmental sciences: BES*, 35(9), pp. 821–829. Available at: <https://doi.org/10.3967/bes2022.106>.

Yakrus, M.A. *et al.* (2001) 'Comparison of Methods for Identification of *Mycobacterium abscessus* and *M. chelonae* Isolates', *Journal of Clinical Microbiology*, 39(11), pp. 4103–4110. Available at: <https://doi.org/10.1128/JCM.39.11.4103-4110.2001>.

Yamanaka, Y. *et al.* (2018) 'Dimerization site 2 of the bacterial DNA-binding protein H-NS is required for gene silencing and stiffened nucleoprotein filament formation', *The Journal of Biological Chemistry*, 293(24), pp. 9496–9505. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.RA117.001425>.

Yan, J. *et al.* (2020) 'Investigating transmission of *Mycobacterium abscessus* amongst children in an Australian cystic fibrosis centre', *Journal of Cystic Fibrosis: Official Journal of the European Cystic Fibrosis Society*, 19(2), pp. 219–224. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2019.02.011>.

Yandrapally, S. *et al.* (2023) 'Mycobacterium tuberculosis EspR modulates Th1-Th2 shift by transcriptionally regulating IL-4, steering increased mycobacterial persistence and HIV propagation during co-infection', *Frontiers in Immunology*, 14, p. 1276817. Available at: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1276817>.

Zechiedrich, E.L. *et al.* (2000) 'Roles of topoisomerases in maintaining steady-state DNA supercoiling in *Escherichia coli*', *The Journal of Biological Chemistry*, 275(11), pp. 8103–8113. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.275.11.8103>.

Zelazny, A.M. *et al.* (2009) 'Cohort study of molecular identification and typing of *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium massiliense*, and *Mycobacterium bollettii*', *Journal of Clinical Microbiology*, 47(7), pp. 1985–1995. Available at: <https://doi.org/10.1128/JCM.01688-08>.

Zhang, J.R. *et al.* (2000) 'The polymeric immunoglobulin receptor translocates pneumococci across human nasopharyngeal epithelial cells', *Cell*, 102(6), pp. 827–837. Available at: [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)00071-4](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)00071-4).

Zhang, M. *et al.* (2012) 'Rational design of true monomeric and bright photoactivatable fluorescent proteins', *Nature Methods*, 9(7), pp. 727–729. Available at: <https://doi.org/10.1038/nmeth.2021>.

Zhang, Y. *et al.* (2004) 'Pulsed-field gel electrophoresis study of *Mycobacterium abscessus* isolates previously affected by DNA degradation', *Journal of Clinical Microbiology*, 42(12), pp. 5582–5587. Available at: <https://doi.org/10.1128/JCM.42.12.5582-5587.2004>.

Zhou, L. *et al.* (2020) 'Trends in the Prevalence and Antibiotic Resistance of Non-tuberculous *Mycobacteria* in Mainland China, 2000–2019: Systematic Review and Meta-Analysis', *Frontiers in Public Health*, 8, p. 295. Available at: <https://doi.org/10.3389/fpubh.2020.00295>.

Zhu, J.-Y. *et al.* (2012) 'Functional consequence of covalent reaction of phosphoenolpyruvate with UDP-N-acetylglucosamine 1-carboxyvinyltransferase (MurA)', *The Journal of Biological Chemistry*, 287(16), pp. 12657–12667. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.342725>.

Zomer, D. *et al.* (2023) 'Epidemiology and management of nontuberculous mycobacterial disease in people with cystic fibrosis, the Netherlands', *Journal of Cystic Fibrosis: Official Journal of the European Cystic Fibrosis Society*, 22(2), pp. 327–333. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2022.10.009>.

Annexes

Annexe 1: Shedding light on bacterial chromosome structure: exploring the significance of 3C-based approaches

Revue (Accéptée, *Meth Mol Biol- Bacterial Chromatin 2nd edition*)
(Hoareau, Gerges and Crémazy).

Shedding light on bacterial chromosome structure: exploring the significance of 3C-based approaches

Marion Hoareau¹, Elias Gerges¹, Frédéric G.E. Crémazy^{1#}

¹ Université Paris-Saclay, UVSQ, Inserm, Infection et inflammation, Montigny-Le-Bretonneux, France.

Correspondence: frederic.cremazy@uvsq.fr

Abstract

The complex architecture of DNA within living organisms is essential for maintaining the genetic information that dictates their functions and characteristics. Among the many complexities of genetic material organization, the folding and arrangement of DNA into chromosomes play a critical role in regulating gene expression, replication, and other essential cellular processes. Bacteria, despite their apparently simple cellular structure, exhibit a remarkable level of chromosomal organization that influences their adaptability and survival in diverse environments. Understanding the three-dimensional arrangement of bacterial chromosomes has long been a challenge due to technical limitations, but the development of Chromosome Conformation Capture (3C) methods revolutionized our ability to explore the hierarchical structure and the dynamics of bacterial genomes. Here, we review the major advances in the field of bacterial chromosome structure using 3C technology over the past decade.

Key words: Chromosome, bacterial chromatin, chromosomal domain, 3C-seq, Hi-C

Introduction

In bacteria, where the genome is often a single, circular DNA molecule, the arrangement of genetic material within the confined space of the cell is critical. The spatial organization of genes, regulatory elements, and structural elements within the chromosome significantly impacts the accessibility of genes to transcriptional machinery and other molecular processes. This arrangement also contributes to the timely coordination of other DNA transactions such as replication, repair and segregation.

Over the past century, traditional microscopy and biochemical analyses provided only glimpses into the three-dimensional and hierarchical architecture of chromosomes. Technical limitations, including the diffraction barrier of light microscopy and the inability to observe DNA structures at the nanometer scale, hindered progress. Even electron microscopy, while offering valuable insights into bacterial chromosome organization, remains limited in providing detailed information about specific DNA interactions and long-range spatial relationships. The very nature of DNA folding, influenced by a multitude of molecular events mediated either by proteins or topology, presents formidable barriers to comprehensive understanding. Additionally, the transient and dynamic nature of DNA interactions further complicates matters, making it challenging to identify specific arrangements of genes and regulatory elements. This complexity is particularly prominent in bacteria, where the compact genome must accommodate a wealth of vital genetic information.

A major breakthrough came with the development of Chromosome Conformation Capture (3C) methods [1]. These techniques, which include Hi-C (high-throughput chromosome conformation capture), 3C-seq and related variants, allow researchers to probe the physical interactions between distant DNA segments within the chromosome [2]. They all involve chemical cross-linking and subsequent fragmentation of DNA, followed by proximity-based ligation of cross-linked fragments. When combined with deep sequencing, the resulting DNA library could recapitulate all the existing interactions between different genomic loci, providing insights into the spatial organization of the full chromosome [3]. First developed to study eukaryotic genomes, these methods have transformed during the last decade our understanding of bacterial chromosome architecture [4–8]. They have unveiled domain-like structures, spatial compartments, and long-range interactions that are linked to

gene expression patterns and cellular behaviors. However, even though 3C-based methods have proven that genome conformation is tightly linked to gene expression, it is not yet clear whether genome organization directly influences transcription patterns.

In this review, we discuss the biological insights into bacterial chromosome conformation obtained through 3C-based methods and how they allowed the identification of new topological domains that contribute to the hierarchical folding of the chromosome as well as their relationship with DNA related processes such as transcription, replication, and segregation.

1. A view of bacterial chromosome structure before the 3C era

Comparing the sizes of chromosomes in bacteria, which can range from half to more than a dozen megabases, with the volume of their containers clearly highlights the need for multiple levels of compaction. Early electron microscopy (EM) performed in lysed *Escherichia coli* suggested that bacterial DNA is highly condensed in a heterogenic structure with extensions, similar to loops, projecting into the cytoplasm. This condensed structure is commonly referred in living cells as the nucleoid [9, 10]. Later, light microscopy combined with fluorescent-tagged proteins or genomic loci suggested that this level of compaction extends far beyond what polymer physics and molecular crowding could have predicted from a random coil molecule [11, 12]. Moreover, the degree of bacterial chromatin compaction directly influences DNA accessibility to proteins required for DNA transactions.

Nucleoid-associated proteins (NAPs) are the main proteins factors involved in structuring the bacterial nucleoid [13, 14]. NAPs are small, basic proteins that bind DNA that were initially described as “histone-like” [15, 16]. NAP vary in size and show very little sequence similarity with each other, although some often shared similar functions [14, 17]. They are among the most abundant proteins in bacteria, reaching up to 60,000–80,000 copies/cell [18, 19]. NAP-encoding genes in bacteria are diverse and ubiquitous. Histone-like Nucleoid Structuring protein (H-NS) and Histone-like protein from *E. coli* strain U93 (HU) were the first ones discovered as abundantly associated with *E. coli* DNA [20]. Since then, at least a dozen of NAPs has been found to be associated with the nucleoid, but

this number can differ depending on the genus [13]. NAPs bind DNA with different specificities and affinities, generally as homo- or sometimes heterodimers. They are crucial factors involved in DNA transactions such as transcription, replication, repair and DNA segregation [21, 22]. Their effect on gene expression may be either repressive or stimulative, and may result from either global chromosomal DNA topology modification or specific effects on gene promoters and coding sequences. NAPs participate in shaping and condensing the bacterial chromatin through three main mechanisms: DNA bridging (H-NS [23]), DNA bending (Fis (Factor for inversion stimulation) [24], HU [25], Integration Host Factor (IHF) [26] and DNA wrapping (Lrp (Leucine-responsive protein) [27]). The nature of NAPs and their functions were extensively reviewed recently [14].

Supercoiling is another strategy used in bacteria to combine reduction of the DNA volume and protein accessibility. Bacterial chromosomes, generally circular, are topologically constrained polymers that predominantly exhibit negative supercoiling, resulting in the twisting and coiling of the DNA double helix upon itself [28]. Consequence of supercoiling is often the generation of superhelices and loops called plectonemes. The supercoiling status of the chromosome is controlled by a superfamily of proteins called topoisomerases [29], with DNA gyrase inducing negative supercoiling in an ATP-dependent manner and Topo I relaxing it [30]. Supercoiling is also induced by the progression of replication and transcription machinery on DNA, where polymerases impede DNA's rotation to further influence locally the degree of supercoiling [31, 32]. Conversely, supercoiling is considered one of the most important regulators of gene expression since 7 [33] to 50 % [34] of *E. coli* genes are influenced by DNA topology. Inducing negative supercoiling can enhance transcription by fostering promoter melting and increasing the DNA binding affinity of a protein regulator, while DNA overwinding can also influence transcription of distant genes through propagation of positive supercoiling [35, 36]. Plectonemes are also crucial components of the nucleoid structure. They could organize into multiple independent 10 to 400 kb-sized domains called microdomains [37]. First identified by density gradients [38, 39] then detailed through electron microscopy [28], the existence of these domains was not investigated using new techniques such as 3C-based methods until recently [40]. Microdomains were proposed to be separated by supercoiling diffusion barriers, formed by

NAPs such as Fis and H-NS, or induced by high transcriptional activity [41–43]. The identification of these microdomains may represent the initial evidence supporting the existence of a hierarchical organization within bacterial nucleoids.

More recently, another hierarchical level of chromosome organization was identified through the description of large chromosomal domains called macrodomains [44]. The *E. coli* chromosome shows four different macrodomains, named Ori (that encompasses the replication origin site, *oriC*), Ter, Left and Right along with two additional non-structured regions (NS-L and NS-R). Ori and Ter regions were initially detected through fluorescent *in-situ* hybridization (FISH) [11]. Site-specific recombinant assays then allowed the discovery of Left and Right regions and the definition of all four regions as macrodomains [45]. These domains are 1 Mb-sized regions that confine DNA recombination events exclusively within their boundaries, thereby restricting DNA interactions with the rest of the chromosome. Non-structured regions were also identified in site-specific recombinant assays [45]. On the contrary, the sequences of these NS regions interact more frequently with the sequences found in adjacent macrodomains. Macrodomains also show a more reduced mobility within the cell, compared to the NS domains. Interestingly, engineered strains where *OriC* was displaced by inversion of the Ori domain show a profound reorganization of the other macrodomains and the NS regions [46].

Although classical cellular, genetic and molecular approaches laid the foundation stones to the comprehension of bacterial chromosomes organization and the mechanisms it involves, 3C-based methods allowed the identification of new levels of chromosomal organization.

2. The emergence of 3C methods

In 2002, Dekker *et al.* proposed a new method to investigate chromatin conformation and its effect on gene expression [1]. Chromosome Conformation Capture (3C) methods show folding, and condensation of chromatin organized by DNA-binding proteins. The first step is the crosslinking of chromatin using formaldehyde that freezes interactions between DNA and proteins, as well as interactions between close DNA fragments. These interactions are then isolated by fragmenting

chromatin using restriction enzymes. Extremities of those fragments are then ligated together, forming units recapitulating interactions between DNA segments that were originally in close spatial proximity [1]. These units constitute the initial interaction library (**Fig. 1**).

Originally, 3C analysed potential DNA interactions through PCR amplification: if two DNA sequences interact, they are ligated into one chimeric fragment that can be specifically amplified using primers flanking both sides of the junction. In eukaryotic cells, this method allowed the identification of functional interactions (“one vs one”) involved in the 3D regulation of gene expression [1, 47]. In the following years, new variations of the original method using high-throughput technologies such as microarray (4C [48, 49]) or next-generation sequencing (3C-seq [50], 5C [51], Hi-C [3]) were developed to explore chromatin conformation more comprehensively. Initially designed for the study of eukaryotic genomes, these techniques have since been adapted for the investigation of bacterial chromosomes, enabling the comprehensive exploration of chromatin organization and dynamics, ranging from the gene-level scale to the global organization of the entire chromosome.

3. Visualization of bacterial chromosome organization through Hi-C: the discovery of Chromosome Interactions Domains

Combining 3C with deep sequencing (5C, 3C-seq, Hi-C) allows to interrogate all possible DNA interactions through millions of reads, unlike conventional 3C that uses specific probes to verify discrete interactions (**Fig. 1**). Analysis of these NGS data generates two-dimensional matrices known as contact maps, with the x-axis and y-axis representing genomic coordinates. The length of the chromosome is segmented into bins, ranging from 200 bp to 10 kb, that eventually define the resolution of the map. The relative frequency of interaction between two loci is then inferred from the quantification of the sequenced reads and visualized as a heatmap (**Fig. 2**).

Although the first *E. coli* chromosome map, obtained through genome conformation capture (GCC), shows a resolution of 20 kb [52], subsequent improvements of these techniques over time have led to much higher resolution. The first *E. coli* map obtained through Hi-C five years later had a resolution of 5 kb [7] and was further improved to 200 bp [8]. Very recently, a genome map of *Brucella*

melitensis was obtained with a resolution of 1 kb [53]. Emerging 3C-derived techniques offer the potential for significantly enhanced resolution. For example, the Micro-Capture C method allows the visualization of genome contacts down to base pair resolution in human and murine cells [54].

A common feature of all Hi-C contact map is the main diagonal that appears due to the high-frequency, intra-arm interactions which happen between loci sharing close proximity on linear genome [3]. On the other hand, this interaction frequency decreases as genomic distance increases. First applied to *Caulobacter crescentus*, Hi-C revealed the existence of large topological domains, appearing as high-intensity squares on contact maps (**Fig. 3A**). These chromosomal interaction domains (CIDs) correspond to regions with high level of interactions between loci within the same domain (**Fig. 2**) [4]. These structures are reminiscent of the topologically associated domains (TADs) observed in mammalian genomes. Several computational methods were developed to detect CIDs and TADs by predicting the position of their boundaries. All are based on statistical analysis that reports the degree of upstream or downstream interactions for a genomic region, the most used being the computation of a directional index [55]. CIDs, subsequently identified in other bacteria, range from 30 to 700 kb and their number changes depending on the species: 23 in *C. crescentus* [4], 31 in *E. coli* [7], 20 in *Bacillus subtilis* [5]. The *Mycoplasma pneumoniae* chromosome, however, appears to be segmented into a larger number of smaller CIDs (44 CIDs, ranging from 15 to 33 kb), whereas only 10 were detected in the *Streptomyces ambofaciens* genome [56, 57]. Interestingly, the number of CIDs and their size don't seem to correlate with genome size, the chromosome of *S. ambofaciens* being three time larger than the one of *M. pneumoniae*.

The specific function of CIDs remains elusive. In mammals, TADs were proposed to spatially constrain enhancer-promoter communication, as regulatory interactions between remote genomic elements occur preferentially within the same TAD [58]. Currently, there is no evidence that CIDs could adopt such a role within bacterial chromosomes, given the significantly higher gene density and the typical distance of genes from their cognate enhancer, which generally does not exceed few hundreds base pairs [59].

4. The intricate relationship between transcription and CID boundaries

The nature of CID boundaries and the mechanism behind their formation were further investigated. In many bacteria, CID boundaries seem directly linked to transcription. Transcription is known to have a direct effect on chromosome structure, since decompaction is necessary for transcription machinery proteins to access DNA. Several Hi-C publications reported that boundaries are enriched in highly-expressed genes (HEG) [4, 5, 7]. The authors proposed that if physical interactions among genomic loci within CID are formed through a combination of plectonemic looping and DNA topological effects of NAPs, their boundaries are characterized by plectoneme-free regions (PFR) that inhibit such interactions. PFR are established as a result of high transcriptional activity, where active RNA polymerases cause local helical unwinding of DNA, restraining the formation of plectonemes (**Fig. 2**). Consequently, this impedes the dissipation of supercoils, effectively creating a barrier to their diffusion [60]. Using inhibitors of transcription such as rifampicin induces the disorganization of these boundaries, resulting in an almost CID-free organization in *C. crescentus* [4] and *B. subtilis* [5, 61]. Furthermore, ectopic insertion of expressed genes in weakly expressed loci lead to the formation of new boundaries [4]. In *M. pneumoniae*, co-expressed genes also seem to be able to create smaller domain (15 to 30 kb) boundaries [56].

Not all HEG regions are responsible for boundaries creation. In *B. subtilis* and *C. crescentus*, respectively 60 and 74 % of boundaries correspond to HEG. For example, genes associated with tRNA are highly expressed in growing cells but are not associated with these domains in *C. crescentus*. Transcript length, rather than level of expression, might influence boundary creation since long genes or operons can be associated with boundaries, without being particularly highly expressed [60]. In *Vibrio cholerae*, the superintegron, a large gene capture and excision system localized on Chr2, defines a clear CID surrounded by two highly transcribed genes [62]. A fundamental characteristic of the eukaryotic TADs is that they are invariant across cell types [63]. In bacteria, changes in gene expression profile have a more profound effect on chromosome conformation. This is indicated by a change in the number of CIDs from 23 in exponential growth conditions to 29 during starvation in *C. crescentus* [60]. In *E. coli*, change in growth phase results in a reduction in the

frequency of interactions within CIDs, even though their position and boundaries do not seem to change [7]. Metabolic differentiation of *S. ambofaciens* mediated by culture in MP5 medium shows a drastic reduction of CID boundaries, replaced by the formation of a new boundary on the right arm of the chromosome [57]. Interestingly, this strongly correlate with a burst of transcription of the congocidine biosynthetic gene cluster located at this genomic position. In light of the previously presented data, it appears that HEG govern chromosome organization, rather than chromosome organization conditioning gene expression. However a more recent study describes how H-NS uses loop formation through DNA bridging to control the expression of the ProVWX operon in response to change in osmolarity [64]

In addition to HEG, CID boundaries in *B. subtilis* can also be associated with AT-rich regions acquired through horizontal transfer [5]. Similarly, in *M. pneumoniae*, a significant decrease in GC content was observed at the domain borders [56].

5. CID and SMC proteins

In eukaryotes, the formation of TAD in the genome is orchestrated through a dynamic mechanism involving Cohesin complexes and CCCTC-binding factor (CTCF), a process known as “loop extrusion” [65–67]. Cohesin, consisting of SMC (Structural Maintenance of Chromosomes) proteins and a kleisin subunit like Rad21, forms a ring-shaped structure that encircles chromatin [68]. With the help of factors like Nipbl-Mau2, Cohesin actively translocates along the DNA strands, capturing segments and extruding them into loops, powered by ATP hydrolysis [69–71]. As it moves, the cohesin complex can tether DNA segments together and extrude loops from the chromatin fiber. TAD boundaries are particularly enriched in CTCF [71]. When the cohesin complex encounters CTCF, this interaction acts as a barrier, halting the progression of the complex and contributing to the formation of TAD boundaries [72]. These interactions leave a typical imprint on high-resolution Hi-C maps, revealing as a distinctive peak of interaction between genomic loci precisely at these boundary sites [3, 72]. Complete depletion of CTCF or cohesin disrupts TAD boundaries and impedes loop formation [73, 74].

In bacteria, SMC complexes, collectively referred to as bacterial condensins, are critical for chromosome organization and segregation [75]. Smc-ScpAB, the most conserved complex, is prevalent in the majority of bacterial species, while MukBEF, the first SMC complex identified in *E. coli*, replaces Smc-ScpAB in some γ -proteobacteria [6, 76, 77]. The more distantly related MksBEF complex is scattered among bacteria species [78]. These SMC proteins feature a nucleotide-binding domain tethered to a hinge dimerization domain via an \sim 50-nm-long antiparallel coiled coil. The Smc2-ScpAB2 ensemble forms a large ring-like structure (> 125 kDa), ensuring DNA double helices remain entwined. When both SMC heads collaborate with a single kleisin, ScpA, they generate a tripartite ring, facilitating DNA translocation through the dynamic transition between rod and open ring states, in a loop extrusion mechanism similar to that observed in eukaryotes [79].

In bacteria, only few Hi-C contact-maps show similar condensin-mediated loop contacts like the one observed between eukaryotic TAD boundaries [4, 5] and these interactions seem to be limited to *parS* sites. Indeed, in most bacteria, SMC-kleisin complexes are assembled onto the chromosome near the replication origin at centromere-like *parS* sequences, facilitated by the *parS*-binding protein ParB and its cofactor ParA [80, 81]. This nucleation process enables SMC complexes to bridge newly replicated arms, followed by their translocation to the terminus region through loop extrusion, ensuring efficient chromosome segregation [80] (see **section 8**). It might be surprising that, in contrast to eukaryotic systems, bacterial SMC proteins do not appear to be involved in the formation of bacterial CIDs.

Whereas ChIP-seq analysis in *B. subtilis* and *C. crescentus* confirms the recruitment of SMC at the *parS* sites, they also revealed enrichment of SMC in regions of high transcription [81, 82]. However, it was proposed to be due to an artifact of non-specific immunoprecipitation. On the other hand, oppositely oriented highly expressed genes attenuate the rate of loop extrusion by SMC [82]. Hi-C experiments on *C. crescentus* show that deletion of *SMC* does not affect the frequencies of intra-arm interactions or the boundaries of CID [4]. .

6. The role of NAPs in bacterial chromosome structure

To facilitate the compaction of chromosomal DNA within cells, NAPs exhibit various DNA-binding activities, including bending, bridging, wrapping, and clustering, which collectively alter DNA topology and nucleoid organization [83]. In this review, we have chosen to narrow our focus to NAPs whose influence has been specifically explored within the context of 3C-based experiments.

HU is an evolutionarily conserved protein in bacteria [84]. HU exists in *E. coli* as homo- and heterodimers of two subunits HU α and HU β , while only one copy of the *hupB* gene is found in some bacteria like mycobacteria [85]. Although HU binds non-specifically with low-affinity to any linear DNA, it can also bind with high-affinity to structurally distorted DNA [86]. By inserting conserved proline residues into the minor groove, HU is able to induce a sharp bend in the DNA [25, 87]. HU can also form an octameric structure with DNA coiled around it, a structure reminiscent of nucleosomes in eukaryotes [87]. However, this observation was made only once and no further investigation have been conducted so far. ChIP-seq experiment shows that HU binds 10% of the *E. coli* chromosome without any apparent sequence specificity [89]. Evidence of the role of HU in chromosome organization comes from experiments where cells lacking HU show a decondensed nucleoid while strains expressing HU variants with higher DNA-binding affinity have overcompacted nucleoids [90, 91]. HU mutation in *E. coli* results in the reduction in supercoiling, a phenotype that can be restored by mutations in gyrase [92].

Another DNA bender is Fis, one of the most abundant proteins in bacteria [93]. Fis binds to specific DNA sequences containing a 15-bp symmetric motif. As a dimer, it bends DNA by 50 to 90 degrees. Fis, like other NAPs, exerts dual control over gene transcription. It can either recruit the transcription machinery or obstruct the transcription machinery's access to regulatory sequences, resulting in both positive and negative regulatory effects on gene expression [94, 95]. Fis is particularly abundant in exponential growth phases with 1464 binding sites across the genome of *E. coli* [96]. At higher concentrations, Fis binding appears to be primarily governed by a more non-specific mode, thereby contributing to DNA condensation and organization through the maintenance of DNA loops and plectonemes [97]. Interestingly, electron atomic force microscopy studies showed that Fis

preferentially binds to the crossovers of supercoiled DNA molecules and stabilizes branched plectonemes or DNA loops [98]

H-NS is a small protein with a particular affinity for AT-rich regions and curved DNA, which are commonly found at promoters, insertion sequences, and horizontally transferred genetic elements [14]. This versatile protein exerts its influence on a wide array of cellular processes, including gene regulation [99], xenogeneic silencing [100, 101], and nucleoid architecture [13]. Once bound to its cognate sequence, H-NS can oligomerize on DNA by recruiting other H-NS units with its N-terminal domain, forming rigid nucleoprotein filaments. These oligomers can occlude the binding of RNA polymerase to promoters, thereby repressing the expression of large arrays of genes, inhibiting spurious transcription or silencing xenogeneic sequences [99, 101, 102]. H-NS binds abundantly (458 sites) along the *E. coli* chromosome, creating large binding domains that span genomic regions of more than 1 kb [96]. These binding domains increase in number and size as the cells progress from exponential to stationary phase. Additionally, H-NS appears to be enriched near macrodomain boundaries [103]. Early studies using atomic force microscopy revealed that H-NS can also induce bridging of distant DNA segments, a mechanism that depends on local magnesium concentration [104, 105]. Bridging of H-NS-DNA filaments was proposed to reinforce transcription repression by blocking transcript elongation by RNA polymerase [106]. This last property strongly suggests that H-NS plays a crucial factor in the global organization of the bacterial chromosome through DNA looping.

Only a handful of Hi-C and 3C-seq studies have addressed the role of NAPs on chromosome organization. The pioneer Hi-C study conducted in *C. crescentus* revealed that although the deletion of HU does not disrupt CID boundaries, it does result in a significant reduction in short-distance chromosome contacts (up to 100 kb) [4]. In contrast, a study of the effect of a HU mutation in *E. coli* shows a decrease in long-distance contacts (>280 kb) and an increase in contacts up to around 280 kb along the chromosome outside the Ter region [7]. Furthermore, HU and MukBEF synergistically promote long-distance interactions, with MukBEF's efficiency possibly influenced by DNA topology modulated by HU. Applied to a *fis* mutant, the 3C-seq contact map displays an increase in short-range

contacts (<100 kb) and a decrease in contacts above 100–400 kb, particularly in the Ter macrodomain. But surprisingly, these changes do not correlate with the density of Fis binding sites on the genome [7]. The results observed for H-NS are more conflicting. 3C-seq experiment performed in *E. coli* revealed that deletion of H-NS does not result in any changes to CID or macrodomain boundaries but instead increases short distance interactions within these domains (<40 kb) without majorly disturbing the global folding of the chromosome. This suggests that H-NS acts by repressing contacts between its binding regions [7]. This strongly contradicts the early hypothesis that H-NS could contribute to higher-scale chromosome organization through loop formation [64]. Despite this result, the preferential presence of Rok clusters, the H-NS ortholog in *B. subtilis*, at CID boundaries suggests a potential role for this protein in organizing these domains [107]. Moreover, Hi-C shows that several Rok clusters can interact to form two “super clusters” on the Ori and on the Ter regions, likely contributing to their high-order organization. Strikingly, deletion of Rok resulted in disruption of CID boundaries, whereas relocation of Rok binding sites create new boundaries [108].

7. Genome organization at a higher scale: the chromosomal domains

CIDs are just one aspect of bacterial chromosome organization. Multiple CIDs are commonly found nested within each other, and consecutive CIDs often come together to form larger entities that might correspond to higher-order chromosomal structures (**Fig. 2**).

As mentioned earlier, the *E. coli* chromosome consists of four distinct macrodomains, termed as Ori, Ter, Left and Right, along with two additional non-structured regions (NS-L and NS-R). Hi-C studies confirmed the segmentation of *E. coli* chromosome into those domains, as evidenced by long-distance contacts formed over multiple CIDs (**Fig. 2**) [7]. Specific proteins are likely to be involved in macrodomain formation and maintenance. The Ter domain is structured through the action of the MatP protein, which selectively binds as a dimer to 23 *matS* sites that are only found within this macrodomain [109]. Early experiments with DNA molecules containing multiple *matS* sites have shown that MatP can tether distant DNA segments and create loops, implying its potential role in the formation of the Ter macrodomain [110]. Indeed, 3C-seq experiments show that only chromosomal contacts within Ter are affected in *matP* mutants. Moreover, deletion of MatP results in an enrichment

of long-range interactions with the others macrodomains (> 280 kb) and a drastic reduction in Ter [7]. However, MatP-mediated interactions in Ter do not specifically connect *matS* sites, whereas replacing matP by mutants that are unable to form tetramers does not result in the disruption of these contacts. These results are not in favor of the hypothesis that Ter is organized by loop formation. An alternative mechanism could involve the spreading of MatP from its *matS* loading sites along the Ter domain, eventually generating long-distance loops through dimerization. MatP is also known to inhibit MukBEF-dependent interactions in this macrodomain. In contrast to MatP, MukBEF genome-wide binding is particularly reduced in the Ter domain. Accordingly, deletion of MukBEF shows a drastic reduction of long-range interactions in the different macrodomains, except in Ter [7]. This suggests that MatP might preclude MukBEF action in this macrodomain. Indeed, MatP interacts physically with MukBEF, displacing wild-type MukBEF complexes from the Ter to the Ori domain, in accordance with its role in the correct positioning of newly replicated chromosome (see **section 8**) [111].

High-scale chromosome organization through large domains is not specific to *E. coli*. Similar segmentation can also be found in *B. subtilis* which exhibits three domains visible on Hi-C contact maps [5]: a first large globular Ori domain encompassing the *oriC* site and a smaller Ter domain, both connected by a middle region constituted by the two chromosomal arms tightly juxtaposed (**Figure 3B**). Hi-C analysis of the organization of the Ori domain using contact maps and 3D reconstructions reveals a structured subregion characterized by a pair of nested hairpin structures. The primary hairpin, formed by inter-arm contacts, connects the left and right replichores, originating approximately 100 kb to the left of *oriC* and a second intra-arm hairpin, extending from around 350 kb on the contact map, skewing towards the left. This organization is consistent across various growth media. Both hairpins show a high enrichment that suggest a role of SMC-ScpAB in the organization of this domain. Subsequent super-resolution analysis of *B. subtilis* nucleoid led to the characterization of high-density chromosomal regions (HDR), described as highly dynamic structures formed by stochastic clustering of multiple CID [5]. Their average number vary between 8 and 15, depending on the cell cycle. Among them, one prominent HDR seems to correlate with the Ori domain as it strongly

colocalized with GFP-tagged ParB proteins. Moreover, further deletion of SMC-ScpAB results in the disorganization of the Ori domain, as well as the aberrant segregation of this HDR, confirming the role of SMC proteins in the Ori domain organization of this bacteria [5].

The linear chromosome of *S. ambofaciens* is also organized into three large genomic regions [112]. The central compartment, highly conserved among all *Streptomyces* species, is enriched in highly-expressed core genes that are essential for the bacterium survival and growth in normal conditions [113]. This compartment is flanked by two terminal domains that are strain specific and principally composed by genomic islands and specialized metabolite biosynthetic gene clusters (SMBGCs) that are only expressed during metabolic differentiation. Strikingly, 3C-seq experiments recapitulate this segmentation. During growth phase, the central compartment shows a typical CID organization with boundaries enriched in highly-expressed genes (see **section 5**). On the contrary, the two terminal compartments show a higher frequency of internal contacts, but with a lack of internal boundaries, probably linked to low transcriptional activity. Upon metabolic differentiation, the increase in transcription of the SMBGC is associated with a drastic change in chromosome conformation with the two arms transitioning from an open to a closed configuration [57] (**Fig. 3C**). This is evidenced by the emergence of a second diagonal pattern, similar to the one observed in *C. crescentus*, resulting from inter-arm interactions mediated by SMC complexes (see **next section**) [4]. A similar reorganization has been observed during the sporogenic development of *Streptomyces venezuelae* [114].

8. Chromosome arrangement and segregation within the cell

At the cellular level, Hi-C also provided insights into the overall chromosome disposition in the cell. In certain species, a secondary diagonal appears on contact maps, corresponding inter-arm interactions between genomic loci with distant coordinates (**Fig. 2**). This feature was first described for bacteria such as *C. crescentus* [4, 115] and *B. subtilis* [5, 6] and was in accordance with the already-proposed longitudinal disposition of the chromosome. First observed in 5C experiments and further confirmed using Hi-C, these long-distance interactions result from the tight juxtaposition of the two replication arms that follow the cell long axis, both equidistant from the origin [4–6, 115]. In *E. coli*, whose

chromosome has a transversal disposition, only the main diagonal is visible (**Fig. 2**). This is due to the replication origin being located at the middle of the long axis on the chromosome. Since both arms occupy distinct halves of the cells, there are no inter-arm interactions and therefore no secondary diagonal [7]. However, in rapid growth, the disposition of the *E. coli* chromosome changes from transversal to longitudinal. Still, in contrast with *C. crescentus* and *B. subtilis*, 3C-seq does not detect any inter-arm interactions.

One reason for this difference lies in the manner in which SMC proteins promote chromosome segregation in these bacteria. In bacteria with transversally arranged chromosome such as *C. crescentus* or *B. subtilis*, parB proteins are first recruited on discrete *parS* sites located close to the *Ori* site, followed by the ATPase ParA, which triggers their spreading along the neighboring regions. The binding of ParB-*parS* promotes loading of the SMC complex, which bridges newly replicated arms [81]. Subsequently, the complex translocates towards the chromosome terminus region using loop extrusion, resembling a “zip-up” process. This contributes to the proper segregation of the sister chromosomes. This mechanism was particularly highlighted and dynamically tracked using Hi-C [61, 82]. Hi-C also brought understanding on how replication affects chromosome dynamics and segregation, as it allowed to observe how long-distance contacts changes during cell cycle of these bacteria. When replication initiation is blocked using mutants or inhibitors such as serine hydroxamate, chromosome organization is lost: *ori* domain disorganization [5], nucleoid expansion [116] and diminution of long-range interactions such as DNA loops [52]. When replication restarts, contacts are restored [5]. This is consistent with observation that CIDs in *C. crescentus* swarmer cells are conserved through the cell cycle, suggesting that contacts are re-established along or right after replication [4]. In *Pseudomonas aeruginosa*, which also shows a longitudinal arrangement, both SMC-ScpAB and MksBEF are present, while they have different activities: SMC-ScpAB facilitates chromosome arm alignment and regulates chromosome disposition within the cell, whereas MksBEF enhances the expansion of cis contacts even in the absence of chromosome arm alignment [117].

In *E. coli*, MukBEF, does not play the same role in chromosome conformation as SMC-ScpAB. However, this role is not yet clear. An elegant hypothesis proposes that once loaded onto the Ori

macrodomain, the SMC complex translocates along the chromosome using a 'rock-climbing' mechanism in which two interacting dimers of MukBEF alternate between capturing and releasing DNA to move away from their loading site [118]. 3C-seq in *E. coli* showed that whereas MukBEF is involved in long-distance interactions, it doesn't allow inter-arm contact [7]. Instead, it has been proposed that MukBEF constitute an axial core from which DNA loops are extruded, most likely promoting chromosome condensation and keeping arms separated [119].

One interesting question to address during replication is the behavior of newly synthesized chromosomes and their interactions with their matrix, and whether both nucleoids stay associated or rapidly segregate. In rapidly growing *E. coli* cells, up to sixteen replication origins can coexist inside the same bacteria. GCC experiments revealed a correlation between short distance interactions and copy number [52]. The number of interactions increasing with the number of copies is in favor of the first hypothesis in *E. coli*, namely maintaining the association between the nucleoids. However, by developing and running a Hi-C data-integrated model which shows well-segregated chromosomes in partial replication stage, a recent study suggests that the association observed using GCC might be transient and occur only at a precise stage of replication [120]. The first hypothesis also does not seem universal since other bacteria show insulation between replicated and matrix chromosome, as demonstrated with Hi-C in *C. crescentus* [4].

Some bacteria possess more than one chromosome, and the question of the coordination of both replication and segregation is also to address. For example, *V. cholerae* genome is composed of two chromosomes, Chr1 (3 Mb) and Chr2 (1 Mb). 3C-seq experiments showed that if Chr1 is found in an open structure with only one diagonal visible on contact maps, Chr2 displays a secondary diagonal suggesting a tightly folded shape reminiscent of the *C. crescentus* chromosome. During *V. cholerae* replication, initiation of Chr2 replication needs to be delayed so that the two chromosomes terminate replication at nearly the same time. To achieve this, Chr2 surveys the replication of Chr1 via the *crtS* locus, located in the middle of its right arm, and only initiates replication when this site has been processed. Simultaneous binding of the RctB protein on both *crtS* on Chr1 and on the replication origin of Chr2 (*ori2*) triggers Chr2 replication. Strikingly, the *crtS* locus and *ori2* localize to the same

region of the cell during the entire cell cycle and display enhanced physical contacts in 3C-seq contact maps, suggesting that physical proximity is required for this mechanism. Additionally, trans-interactions are also observed between the *ter* regions of both chromosomes that extend along the arms until *ori2* in Chr2 and until midway in Chr1, possibly coordinating their correct and time-dependent segregation of both chromosomes. However, these contacts don't seem to be involved in replication synchronization [62]. In a similar way, *B. melitensis* is also a two-chromosome bacteria that display trans-contacts, especially between replication origin and termini of the two chromosomes [53]. The functional significance of these interactions, maybe linked to chromosome disposition and segregation still requires further investigation (**Fig. 3D**).

9. Conclusions and perspectives

For more than a decade now, consistent refinements in 3C-based techniques have paved the way for remarkable progress in understanding the principles that underlie the spatial organization of genomes across a growing array of bacterial species. These improvements have not only led to the discovery of new layers of genome compaction through the revelation of CIDs, but have also enriched our understanding of the formation and maintenance of larger structural units like macrodomains as well as the role of transcription in delimitating topologically constrained domains.

Similar to many other genomic techniques, one of the primary limitations of 3C techniques is that they provide only a population-level view of chromatin interactions, averaging the conformation of DNA across a large number of cells. As such, they fail to capture heterogeneity within this population, hindering the identification of cell-to-cell variation in chromosome organization. However, the integration of microscopy techniques, such as super-resolution microscopy, has made it possible to adopt single-cell approaches. This has, for example, facilitated the identification of high-density chromosomal regions (HDR) [5].

Using contact maps as an assay rather than a simple visualization tool has been fundamental for studying the impact of proteins and the environment on bacterial chromosome conformation [4].

Analyzing contact maps generated under different experimental conditions provides valuable insights

into the dynamics of bacterial chromosomes, which can vary depending on factors such as growth conditions and metabolic differentiation [57, 60]. Additionally, such comparisons serve also as a valuable tool for evaluating the influence of NAPs on chromosome conformation. Specific NAPs, such as HU and Fis, have been shown to play roles in mediating both short- and long-range contacts through mutant studies [4, 7], but the mechanisms behind these global effects remain to be precisely investigated. However, the synergy in NAPs' functions as well as their potential redundancy, further complicates analysis. Furthermore, the NAP family encompasses a multitude of members, with a significant portion of them still awaiting investigation.

Expanding our comprehension of chromosome conformation goes beyond the confines of individual species. Some 3C-derived techniques, such as meta3C, broaden the scope of DNA conformation study to bacterial communities [107]. Meta-3C has recently been employed to explore the mouse microbiota and its evolution over the course of a year, leading to the identification of prophages within these bacterial communities [121, 122].

10. References

1. Dekker J, Rippe K, Dekker M, Kleckner N (2002) Capturing Chromosome Conformation. *Science* 295:1306–1311. <https://doi.org/10.1126/science.1067799>
2. De Wit E, De Laat W (2012) A decade of 3C technologies: insights into nuclear organization. *Genes Dev* 26:11–24. <https://doi.org/10.1101/gad.179804.111>
3. Lieberman-Aiden E, van Berkum NL, Williams L, et al (2009) Comprehensive mapping of long-range interactions reveals folding principles of the human genome. *Science* 326:289–293. <https://doi.org/10.1126/science.1181369>
4. Le TBK, Imakaev MV, Mirny LA, Laub MT (2013) High-Resolution Mapping of the Spatial Organization of a Bacterial Chromosome. *Science* 342:731–734. <https://doi.org/10.1126/science.1242059>
5. Marbouty M, Le Gall A, Cattoni DI, et al (2015) Condensin- and Replication-Mediated Bacterial Chromosome Folding and Origin Condensation Revealed by Hi-C and Super-resolution Imaging.

- Mol Cell 59:588–602. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.07.020>
6. Wang X, Le TBK, Lajoie BR, et al (2015) Condensin promotes the juxtaposition of DNA flanking its loading site in *Bacillus subtilis*. *Genes Dev* 29:1661–1675. <https://doi.org/10.1101/gad.265876.115>
 7. Lioy VS, Cournac A, Marbouty M, et al (2018) Multiscale Structuring of the *E. coli* Chromosome by Nucleoid-Associated and Condensin Proteins. *Cell* 172:771-783.e18. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.12.027>
 8. Cockram C, Thierry A, Gorlas A, et al (2021) Euryarchaeal genomes are folded into SMC-dependent loops and domains, but lack transcription-mediated compartmentalization. *Mol Cell* 81:459-472.e10. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2020.12.013>
 9. Kavenoff, R., Ryder, O.A. (1976) Electron microscopy of membrane-associated folded chromosomes of *Escherichia coli*. *Chromosoma* 55(1):13–25
 10. Robinow C, Kellenberger E (1994) The bacterial nucleoid revisited. *MICROBIOL REV* 58:211–232
 11. Niki H, Yamaichi Y, Hiraga S (2000) Dynamic organization of chromosomal DNA in *Escherichia coli*. *Genes Dev* 14:212–223
 12. Hadizadeh Yazdi N, Guet CC, Johnson RC, Marko JF (2012) Variation of the folding and dynamics of the *Escherichia coli* chromosome with growth conditions. *Molecular Microbiology* 86:1318–1333. <https://doi.org/10.1111/mmi.12071>
 13. Dillon SC, Dorman CJ (2010) Bacterial nucleoid-associated proteins, nucleoid structure and gene expression. *Nat Rev Microbiol* 8:185–195. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2261>
 14. Dame RT, Rashid F-ZM, Grainger DC (2019) Chromosome organization in bacteria: mechanistic insights into genome structure and function. *Nat Rev Genet* 1–16. <https://doi.org/10.1038/s41576-019-0185-4>
 15. Drlica K, Rouviere-Yaniv J (1987) Histone-like proteins of bacteria. *Microbiol Rev* 51:301–319. <https://doi.org/10.1128/mr.51.3.301-319.1987>
 16. Dorman CJ, Deighan P (2003) Regulation of gene expression by histone-like proteins in bacteria. *Curr Opin Genet Dev* 13:179–184. [https://doi.org/10.1016/s0959-437x\(03\)00025-x](https://doi.org/10.1016/s0959-437x(03)00025-x)

17. Dahlke K, Sing CE (2019) Influence of Nucleoid-Associated Proteins on DNA Supercoiling. *J Phys Chem B* 123:10152–10162. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.9b07436>
18. Schmidt A, Kochanowski K, Vedelaar S, et al (2016) The quantitative and condition-dependent *Escherichia coli* proteome. *Nat Biotechnol* 34:104–110. <https://doi.org/10.1038/nbt.3418>
19. Azam TA, Iwata A, Nishimura A, et al (1999) Growth phase-dependent variation in protein composition of the *Escherichia coli* nucleoid. *Journal of Bacteriology* 181:6361–6370
20. Varshavsky AJ, Nedospasov SA, Bakayev VV, et al (1977) Histone-like proteins in the purified *Escherichia coli* deoxyribonucleoprotein. *Nucleic Acids Res* 4:2725–2745. <https://doi.org/10.1093/nar/4.8.2725>
21. Dame RT (2005) The role of nucleoid-associated proteins in the organization and compaction of bacterial chromatin. *Mol Microbiol* 56:858–870. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04598.x>
22. Luijsterburg MS, Noom MC, Wuite GJL, Dame RT (2006) The architectural role of nucleoid-associated proteins in the organization of bacterial chromatin: a molecular perspective. *J Struct Biol* 156:262–272. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2006.05.006>
23. Dame RT, Noom MC, Wuite GJL (2006) Bacterial chromatin organization by H-NS protein unravelled using dual DNA manipulation. *Nature* 444:387–390. <https://doi.org/10.1038/nature05283>
24. Hancock SP, Stella S, Cascio D, Johnson RC (2016) DNA Sequence Determinants Controlling Affinity, Stability and Shape of DNA Complexes Bound by the Nucleoid Protein Fis. *PLoS One* 11:e0150189. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0150189>
25. van Noort J, Verbrugge S, Goosen N, et al (2004) Dual architectural roles of HU: formation of flexible hinges and rigid filaments. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:6969–6974. <https://doi.org/10.1073/pnas.0308230101>
26. Rice PA, Yang S, Mizuuchi K, Nash HA (1996) Crystal structure of an IHF-DNA complex: a protein-induced DNA U-turn. *Cell* 87:1295–1306. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81824-3](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81824-3)
27. McFarland KA, Lucchini S, Hinton JCD, Dorman CJ (2008) The leucine-responsive regulatory

- protein, Lrp, activates transcription of the *fim* operon in *Salmonella enterica* serovar typhimurium via the *fimZ* regulatory gene. *J Bacteriol* 190:602–612.
<https://doi.org/10.1128/JB.01388-07>
28. Postow L, Hardy CD, Arsuaga J, Cozzarelli NR (2004) Topological domain structure of the *Escherichia coli* chromosome. *Genes Dev* 18:1766–1779. <https://doi.org/10.1101/gad.1207504>
 29. Champoux JJ (2001) DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism. *Annu Rev Biochem* 70:369–413. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.70.1.369>
 30. Gellert M, Mizuuchi K, O’Dea MH, Nash HA (1976) DNA gyrase: an enzyme that introduces superhelical turns into DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 73:3872–3876.
<https://doi.org/10.1073/pnas.73.11.3872>
 31. Visser BJ, Sharma S, Chen PJ, et al (2022) Psoralen mapping reveals a bacterial genome supercoiling landscape dominated by transcription. *Nucleic Acids Res* 50:4436–4449.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkac244>
 32. Yáñez-Cuna FO, Koszul R (2023) Insights in bacterial genome folding. *Curr Opin Struct Biol* 82:102679. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2023.102679>
 33. Peter BJ, Arsuaga J, Breier AM, et al (2004) Genomic transcriptional response to loss of chromosomal supercoiling in *Escherichia coli*. *Genome Biol* 5:R87. <https://doi.org/10.1186/gb-2004-5-11-r87>
 34. Blot N, Mavathur R, Geertz M, et al (2006) Homeostatic regulation of supercoiling sensitivity coordinates transcription of the bacterial genome. *EMBO Rep* 7:710–715.
<https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400729>
 35. Parekh BS, Hatfield GW (1996) Transcriptional activation by protein-induced DNA bending: evidence for a DNA structural transmission model. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:1173–1177.
<https://doi.org/10.1073/pnas.93.3.1173>
 36. Dorman CJ, Dorman MJ (2016) DNA supercoiling is a fundamental regulatory principle in the control of bacterial gene expression. *Biophys Rev* 8:209–220. <https://doi.org/10.1007/s12551-016-0205-y>
 37. Messerschmidt SJ, Waldminghaus T (2014) Dynamic Organization: Chromosome Domains in

- Escherichia coli*. Microb Physiol 24:301–315. <https://doi.org/10.1159/000369098>
38. Worcel A, Burgi E (1972) On the structure of the folded chromosome of *Escherichia coli*. J Mol Biol 71:127–147. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(72\)90342-7](https://doi.org/10.1016/0022-2836(72)90342-7)
 39. Sinden RR, Pettijohn DE (1981) Chromosomes in living *Escherichia coli* cells are segregated into domains of supercoiling. Proceedings of the National Academy of Sciences 78:224–228. <https://doi.org/10.1073/pnas.78.1.224>
 40. Yildirim A, Feig M (2018) High-resolution 3D models of *Caulobacter crescentus* chromosome reveal genome structural variability and organization. Nucleic Acids Research 46:3937–3952. <https://doi.org/10.1093/nar/gky141>
 41. Deng S, Stein RA, Higgins NP (2004) Transcription-induced barriers to supercoil diffusion in the *Salmonella typhimurium* chromosome. Proc Natl Acad Sci USA 101:3398–3403. <https://doi.org/10.1073/pnas.0307550101>
 42. Booker BM, Deng S, Higgins NP (2010) DNA topology of highly transcribed operons in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium: Chromosome supercoiling during transcription. Molecular Microbiology 78:1348–1364. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07394.x>
 43. Noom MC, Navarre WW, Oshima T, et al (2007) H-NS promotes looped domain formation in the bacterial chromosome. Curr Biol 17:R913–914. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2007.09.005>
 44. Mercier R, Espéli O, Boccard F (2009) L'organisation à grande échelle du chromosome bactérien. Med Sci (Paris) 25:885–887. <https://doi.org/10.1051/medsci/20092511885>
 45. Valens M, Penaud S, Rossignol M, et al (2004) Macrodomain organization of the *Escherichia coli* chromosome. EMBO J 23:4330–4341. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600434>
 46. Duigou S, Boccard F (2017) Long range chromosome organization in *Escherichia coli*: The position of the replication origin defines the non-structured regions and the Right and Left macrodomains. PLoS Genet 13:e1006758. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006758>
 47. Noordermeer D, De Laat W (2008) Joining the loops: β -Globin gene regulation. IUBMB Life 60:824–833. <https://doi.org/10.1002/iub.129>
 48. Simonis M, Klous P, Splinter E, et al (2006) Nuclear organization of active and inactive chromatin domains uncovered by chromosome conformation capture-on-chip (4C). Nat Genet

- 38:1348–1354. <https://doi.org/10.1038/ng1896>
49. Zhao Z, Tavoosidana G, Sjölander M, et al (2006) Circular chromosome conformation capture (4C) uncovers extensive networks of epigenetically regulated intra- and interchromosomal interactions. *Nat Genet* 38:1341–1347. <https://doi.org/10.1038/ng1891>
 50. Tanizawa H, Noma K (2012) Unravelling global genome organization by 3C-seq. *Semin Cell Dev Biol* 23:213–221. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2011.11.003>
 51. Dostie J, Richmond TA, Arnaout RA, et al (2006) Chromosome Conformation Capture Carbon Copy (5C): a massively parallel solution for mapping interactions between genomic elements. *Genome Res* 16:1299–1309. <https://doi.org/10.1101/gr.5571506>
 52. Cagliero C, Grand RS, Jones MB, et al (2013) Genome conformation capture reveals that the *Escherichia coli* chromosome is organized by replication and transcription. *Nucleic Acids Research* 41:6058–6071. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt325>
 53. Huang Y-F, Liu L, Wang F, et al (2023) High-Resolution 3D Genome Map of *Brucella* Chromosomes in Exponential and Stationary Phases. *Microbiology Spectrum* 11:e04290-22. <https://doi.org/10.1128/spectrum.04290-22>
 54. Hamley JC, Li H, Denny N, et al (2023) Determining chromatin architecture with Micro Capture-C. *Nat Protoc* 1–25. <https://doi.org/10.1038/s41596-023-00817-8>
 55. Dixon JR, Selvaraj S, Yue F, et al (2012) Topological domains in mammalian genomes identified by analysis of chromatin interactions. *Nature* 485:376–380. <https://doi.org/10.1038/nature11082>
 56. Trussart M, Yus E, Martinez S, et al (2017) Defined chromosome structure in the genome-reduced bacterium *Mycoplasma pneumoniae*. *Nat Commun* 8:14665. <https://doi.org/10.1038/ncomms14665>
 57. Lioy VS, Lorenzi J-N, Najah S, et al (2021) Dynamics of the compartmentalized *Streptomyces* chromosome during metabolic differentiation. *Nat Commun* 12:5221. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-25462-1>
 58. Cavalheiro GR, Pollex T, Furlong EE (2021) To loop or not to loop: what is the role of TADs in enhancer function and gene regulation? *Current Opinion in Genetics & Development* 67:119–129. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2020.12.015>

59. Xu H, Hoover TR (2001) Transcriptional regulation at a distance in bacteria. *Current Opinion in Microbiology* 4:138–144. [https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(00\)00179-X](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(00)00179-X)
60. Le TB, Laub MT (2016) Transcription rate and transcript length drive formation of chromosomal interaction domain boundaries. *EMBO J* 35:1582–1595.
<https://doi.org/10.15252/emj.201593561>
61. Wang X, Brandão HB, Le TBK, et al (2017) *Bacillus subtilis* SMC complexes juxtapose chromosome arms as they travel from origin to terminus. *Science* 355:524–527.
<https://doi.org/10.1126/science.aai8982>
62. Val M-E, Marbouty M, de Lemos Martins F, et al (2016) A checkpoint control orchestrates the replication of the two chromosomes of *Vibrio cholerae*. *Science Advances* 2:e1501914.
<https://doi.org/10.1126/sciadv.1501914>
63. Smith EM, Lajoie BR, Jain G, Dekker J (2016) Invariant TAD Boundaries Constrain Cell-Type-Specific Looping Interactions between Promoters and Distal Elements around the CFTR Locus. *The American Journal of Human Genetics* 98:185–201.
<https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2015.12.002>
64. Rashid F-ZM, Crémazy FGE, Hofmann A, et al (2023) The environmentally-regulated interplay between local three-dimensional chromatin organisation and transcription of *proVWX* in *E. coli*. *Molecular Biology*
65. Jeppsson K, Sakata T, Nakato R, et al (2022) Cohesin-dependent chromosome loop extrusion is limited by transcription and stalled replication forks. *Science Advances* 8:eabn7063.
<https://doi.org/10.1126/sciadv.abn7063>
66. Banigan EJ, Tang W, van den Berg AA, et al (2023) Transcription shapes 3D chromatin organization by interacting with loop extrusion. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 120:e2210480120. <https://doi.org/10.1073/pnas.2210480120>
67. Alipour E, Marko JF (2012) Self-organization of domain structures by DNA-loop-extruding enzymes. *Nucleic Acids Res* 40:11202–11212. <https://doi.org/10.1093/nar/gks925>
68. Davidson IF, Peters J-M (2021) Genome folding through loop extrusion by SMC complexes. *Nat Rev Mol Cell Biol* 22:445–464. <https://doi.org/10.1038/s41580-021-00349-7>

69. Nanni L, Ceri S, Logie C (2020) Spatial patterns of CTCF sites define the anatomy of TADs and their boundaries. *Genome Biol* 21:197. <https://doi.org/10.1186/s13059-020-02108-x>
70. Murayama Y, Uhlmann F (2014) Biochemical reconstitution of topological DNA binding by the cohesin ring. *Nature* 505:367–371. <https://doi.org/10.1038/nature12867>
71. Rao SSP, Huntley MH, Durand NC, et al (2014) A 3D Map of the Human Genome at Kilobase Resolution Reveals Principles of Chromatin Looping. *Cell* 159:1665–1680. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.11.021>
72. Fudenberg G, Imakaev M, Lu C, et al (2016) Formation of Chromosomal Domains by Loop Extrusion. *Cell Reports* 15:2038–2049. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.04.085>
73. Nora EP, Goloborodko A, Valton A-L, et al (2017) Targeted Degradation of CTCF Decouples Local Insulation of Chromosome Domains from Genomic Compartmentalization. *Cell* 169:930–944.e22. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.05.004>
74. Rao SSP, Huang S-C, Glenn St Hilaire B, et al (2017) Cohesin Loss Eliminates All Loop Domains. *Cell* 171:305–320.e24. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.09.026>
75. Gruber S (2018) SMC complexes sweeping through the chromosome: going with the flow and against the tide. *Current Opinion in Microbiology* 42:96–103. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2017.10.004>
76. Niki H, Jaffé A, Imamura R, et al (1991) The new gene mukB codes for a 177 kd protein with coiled-coil domains involved in chromosome partitioning of *E. coli*. *The EMBO Journal* 10:183–193. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1991.tb07935.x>
77. Moriya S, Tsujikawa E, Hassan AKM, et al (1998) A *Bacillus subtilis* gene-encoding protein homologous to eukaryotic SMC motor protein is necessary for chromosome partition. *Molecular Microbiology* 29:179–187. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1998.00919.x>
78. Petrusenko ZM, She W, Rybenkov VV (2011) A new family of bacterial condensins: A new family of condensins. *Molecular Microbiology* 81:881–896. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07763.x>
79. Vazquez Nunez R, Ruiz Avila LB, Gruber S (2019) Transient DNA Occupancy of the SMC Interarm Space in Prokaryotic Condensin. *Molecular Cell* 75:209–223.e6.

<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.05.001>

80. Sullivan NL, Marquis KA, Rudner DZ (2009) Recruitment of SMC by ParB-parS organizes the origin region and promotes efficient chromosome segregation. *Cell* 137:697–707.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.04.044>
81. Gruber S, Errington J (2009) Recruitment of condensin to replication origin regions by ParB/SpoOJ promotes chromosome segregation in *B. subtilis*. *Cell* 137:685–696.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.02.035>
82. Tran NT, Laub MT, Le TBK (2017) SMC Progressively Aligns Chromosomal Arms in *Caulobacter crescentus* but Is Antagonized by Convergent Transcription. *Cell Reports* 20:2057–2071. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.08.026>
83. Luijsterburg MS, White MF, van Driel R, Dame RT (2008) The major architects of chromatin: architectural proteins in bacteria, archaea and eukaryotes. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 43:393–418. <https://doi.org/10.1080/10409230802528488>
84. Grove A (2011) Functional Evolution of Bacterial Histone-Like HU Proteins. *Current Issues in Molecular Biology* 13:1–12. <https://doi.org/10.21775/cimb.013.001>
85. Gupta M, Sajid A, Sharma K, et al (2014) HupB, a nucleoid-associated protein of *Mycobacterium tuberculosis*, is modified by serine/threonine protein kinases in vivo. *J Bacteriol* 196:2646–2657. <https://doi.org/10.1128/JB.01625-14>
86. Swinger KK, Rice PA (2007) Structure-based Analysis of HU–DNA Binding. *Journal of Molecular Biology* 365:1005–1016. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.10.024>
87. Swinger KK (2003) Flexible DNA bending in HU–DNA cocrystal structures. *The EMBO Journal* 22:3749–3760. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg351>
88. Guo F, Adhya S (2007) Spiral structure of *Escherichia coli* HU $\alpha\beta$ provides foundation for DNA supercoiling. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:4309–4314. <https://doi.org/10.1073/pnas.0611686104>
89. Prieto AI, Kahramanoglou C, Ali RM, et al (2012) Genomic analysis of DNA binding and gene regulation by homologous nucleoid-associated proteins IHF and HU in *Escherichia coli* K12. *Nucleic Acids Res* 40:3524–3537. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr1236>
90. Huisman O, Faelen M, Girard D, et al (1989) Multiple defects in *Escherichia coli* mutants

- lacking HU protein. *J Bacteriol* 171:3704–3712. <https://doi.org/10.1128/jb.171.7.3704-3712.1989>
91. Kar S, Edgar R, Adhya S (2005) Nucleoid remodeling by an altered HU protein: Reorganization of the transcription program. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:16397–16402. <https://doi.org/10.1073/pnas.0508032102>
 92. Malik M, Bensaid A, Rouviere-Yaniv J, Drlica K (1996) Histone-like protein HU and bacterial DNA topology: suppression of an HU deficiency by gyrase mutations. *J Mol Biol* 256:66–76. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1996.0068>
 93. Azam TA, Ishihama A (1999) Twelve species of the nucleoid-associated protein from *Escherichia coli*. Sequence recognition specificity and DNA binding affinity. *J Biol Chem* 274:33105–33113. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.46.33105>
 94. Browning DF, Cole JA, Busby SJW (2000) Suppression of FNR-dependent transcription activation at the *Escherichia coli* *nir* promoter by Fis, IHF and H-NS: modulation of transcription initiation by a complex nucleo-protein assembly. *Mol Microbiol* 37:1258–1269. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.02087.x>
 95. Browning DF, Grainger DC, Beatty CM, et al (2005) Integration of three signals at the *Escherichia coli* *nrf* promoter: a role for Fis protein in catabolite repression: Regulation of *E. coli* *nrf* promoter. *Molecular Microbiology* 57:496–510. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04701.x>
 96. Kahramanoglou C, Seshasayee ASN, Prieto AI, et al (2011) Direct and indirect effects of H-NS and Fis on global gene expression control in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Research* 39:2073–2091. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq934>
 97. Skoko D, Yoo D, Bai H, et al (2006) Mechanism of Chromosome Compaction and Looping by the *Escherichia coli* Nucleoid Protein Fis. *Journal of Molecular Biology* 364:777–798. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.09.043>
 98. Schneider R (2001) An architectural role of the *Escherichia coli* chromatin protein FIS in organising DNA. *Nucleic Acids Research* 29:5107–5114. <https://doi.org/10.1093/nar/29.24.5107>
 99. Boudreau BA, Hron DR, Qin L, et al (2018) StpA and Hha stimulate pausing by RNA

- polymerase by promoting DNA–DNA bridging of H-NS filaments. *Nucleic Acids Research* 46:5525–5546. <https://doi.org/10.1093/nar/gky265>
100. Lucchini S, Rowley G, Goldberg MD, et al (2006) H-NS Mediates the Silencing of Laterally Acquired Genes in Bacteria. *PLoS Pathog* 2:e81. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0020081>
 101. Navarre WW, Porwollik S, Wang Y, et al (2006) Selective Silencing of Foreign DNA with Low GC Content by the H-NS Protein in *Salmonella*. *Science* 313:236–238. <https://doi.org/10.1126/science.1128794>
 102. Singh SS, Singh N, Bonocora RP, et al (2014) Widespread suppression of intragenic transcription initiation by H-NS. *Genes Dev* 28:214–219. <https://doi.org/10.1101/gad.234336.113>
 103. Zarei M, Sclavi B, Lagomarsino MC (2013) Gene silencing and large-scale domain structure of the *E. coli* genome. *Mol BioSyst* 9:758–767. <https://doi.org/10.1039/c3mb25364c>
 104. Dame RT, Wyman C, Goosen N (2000) H-NS mediated compaction of DNA visualised by atomic force microscopy. *Nucleic Acids Res* 28:3504–3510. <https://doi.org/10.1093/nar/28.18.3504>
 105. van der Valk RA, Vreede J, Qin L, et al (2017) Mechanism of environmentally driven conformational changes that modulate H-NS DNA-bridging activity. *Elife* 6:e27369. <https://doi.org/10.7554/eLife.27369>
 106. Kotlajich MV, Hron DR, Boudreau BA, et al (2015) Bridged filaments of histone-like nucleoid structuring protein pause RNA polymerase and aid termination in bacteria. *Elife* 4:e04970. <https://doi.org/10.7554/eLife.04970>
 107. Marbouty M, Cournac A, Flot J-F, et al (2014) Metagenomic chromosome conformation capture (meta3C) unveils the diversity of chromosome organization in microorganisms. *eLife* 3:e03318. <https://doi.org/10.7554/eLife.03318>
 108. Dugar G, Hofmann A, Heermann DW, Hamoen LW (2022) A chromosomal loop anchor mediates bacterial genome organization. *Nat Genet* 54:194–201. <https://doi.org/10.1038/s41588-021-00988-8>
 109. Mercier R, Petit M-A, Schbath S, et al (2008) The MatP/matS site-specific system organizes the terminus region of the *E. coli* chromosome into a macrodomain. *Cell* 135:475–485.

<https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.08.031>

110. Dupaigne P, Tonthat NK, Espéli O, et al (2012) Molecular Basis for a Protein-Mediated DNA-Bridging Mechanism that Functions in Condensation of the *E. coli* Chromosome. *Molecular Cell* 48:560–571. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.09.009>
111. Nolivos S, Upton AL, Badrinarayanan A, et al (2016) MatP regulates the coordinated action of topoisomerase IV and MukBEF in chromosome segregation. *Nat Commun* 7:10466. <https://doi.org/10.1038/ncomms10466>
112. Ikeda H, Ishikawa J, Hanamoto A, et al (2003) Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*. *Nat Biotechnol* 21:526–531. <https://doi.org/10.1038/nbt820>
113. Karoonuthaisiri N, Weaver D, Huang J, et al (2005) Regional organization of gene expression in *Streptomyces coelicolor*. *Gene* 353:53–66. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2005.03.042>
114. Szafran MJ, Małecki T, Strzałka A, et al (2021) Spatial rearrangement of the *Streptomyces venezuelae* linear chromosome during sporogenic development. *Nat Commun* 12:5222. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-25461-2>
115. Umbarger MA, Toro E, Wright MA, et al (2011) The three-dimensional architecture of a bacterial genome and its alteration by genetic perturbation. *Mol Cell* 44:252–264. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.09.010>
116. Cabrera JE, Jin DJ (2003) The distribution of RNA polymerase in *Escherichia coli* is dynamic and sensitive to environmental cues. *Molecular Microbiology* 50:1493–1505. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03805.x>
117. Lioy VS, Junier I, Lagage V, et al (2020) Distinct Activities of Bacterial Condensins for Chromosome Management in *Pseudomonas aeruginosa*. *Cell Reports* 33:108344. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.108344>
118. Badrinarayanan A, Reyes-Lamothe R, Uphoff S, et al (2012) In vivo architecture and action of bacterial structural maintenance of chromosome proteins. *Science* 338:528–531. <https://doi.org/10.1126/science.1227126>
119. Mäkelä J, Sherratt DJ (2020) Organization of the *Escherichia coli* Chromosome by a

MukBEF Axial Core. *Molecular Cell* 78:250-260.e5.

<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2020.02.003>

120. Wasim A, Gupta A, Mondal J (2021) A Hi-C data-integrated model elucidates *E. coli* chromosome's multiscale organization at various replication stages. *Nucleic Acids Res* 49:3077–3091. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab094>
121. Marbouty M, Baudry L, Cournac A, Koszul R (2017) Scaffolding bacterial genomes and probing host-virus interactions in gut microbiome by proximity ligation (chromosome capture) assay. *Sci Adv* 3:e1602105. <https://doi.org/10.1126/sciadv.1602105>
122. Lamy-Besnier Q, Bignaud A, Garneau JR, et al (2023) Chromosome folding and prophage activation reveal specific genomic architecture for intestinal bacteria. *Microbiome* 11:111. <https://doi.org/10.1186/s40168-023-01541-x>
123. Bury-Moné S, Thibessard A, Liroy VS, Leblond P (2023) Dynamics of the *Streptomyces* chromosome: chance and necessity. *Trends in Genetics* 0: <https://doi.org/10.1016/j.tig.2023.07.008>

11. Legends

Figure 1: Overview of 3C and Hi-C techniques. (1) Chromatin and DNA-binding proteins are crosslinked to freeze DNA-DNA and DNA-proteins interactions. Digestion by restriction enzymes allows the fragmentation of DNA to individualize nucleoprotein complexes. (3) Fragments in close proximity are ligated to create junctions between interacting fragments. (4) Using reverse crosslink, proteins are removed from DNA, leaving only circular DNA chimeras made of junctions. (5) DNA is then fragmented in smaller segments, part of them containing the junctions. They constitute the 3C library. In Hi-C, a biotinylation step (2) is used to specifically pull-down junctions-containing fragments using streptavidin beads (6). Library enriched with DNA junctions are then sequenced using NGS (7) and bioinformatic analyses is used to generate contact matrices and performed other analysis (8).

Figure 2: Visualization of CIDs and large chromosomal domains using contact maps. Contact maps are generated after bioinformatics analysis of high-throughput sequencing of 3C or Hi-C libraries. They represent a matrix of genomic coordinates in which interaction frequency is represented as a heat map. The main diagonal (from top left to bottom right) shows intra-arm interactions (represented as thick lines on the bottom right). In species whose chromosome has a longitudinal disposition, a secondary diagonal (from top right to bottom left) appears and shows the inter-arm interactions (represented as broken lines on the top right). Chromosomal domains appear as colored squares on contact maps. They can be composed of sub-domains, such as CID, where interactions are more frequent. CID boundaries are generated by transcription which creates plectoneme-free regions at HEG.

Figure 3: Contact maps and representations of chromosome conformation obtained by coarse-grained model for (A) *Caulobacter crescentus* [4, 40], or 3D representations of contact maps for (B) *Bacillus subtilis* [5], (C) *Streptomyces ambofaciens* [57, 123] and (D) *Brucella melitensis* [53].

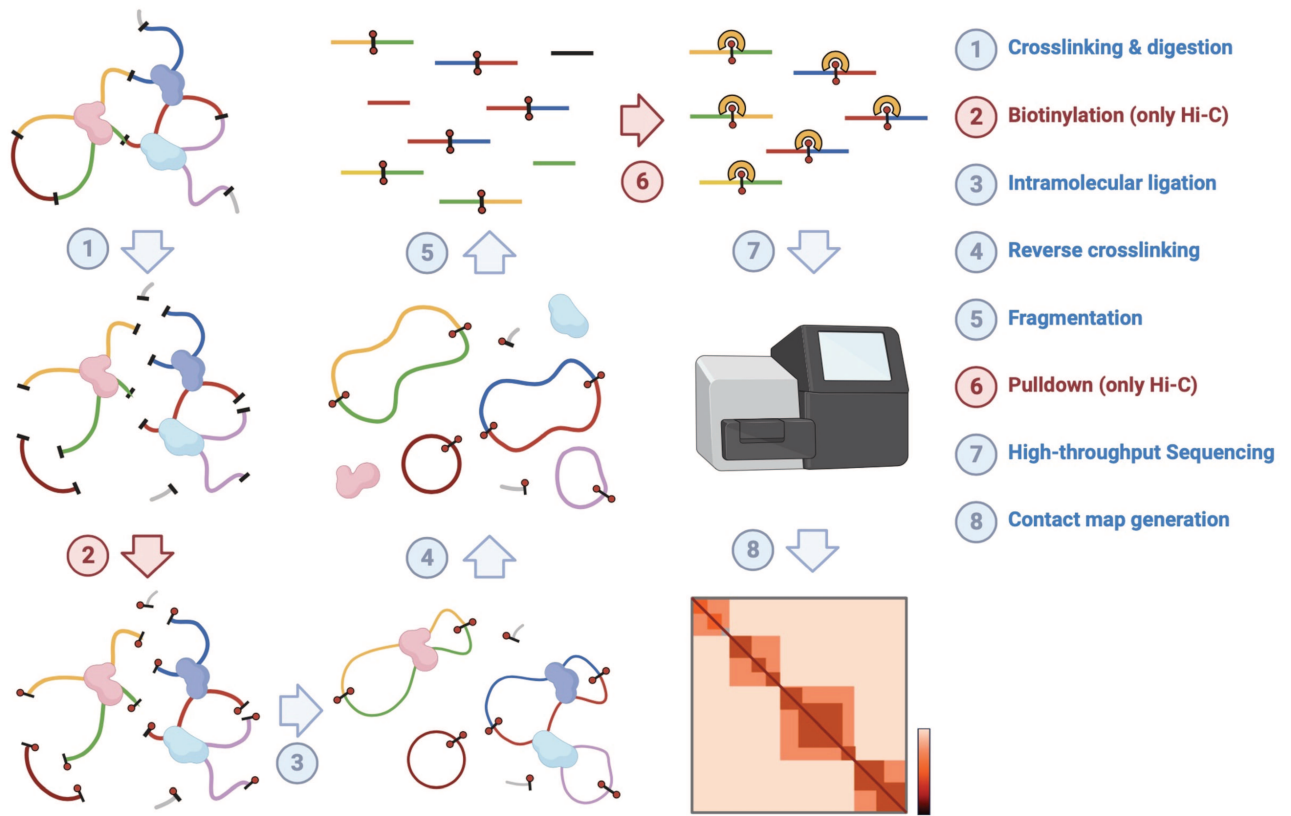


Fig 1

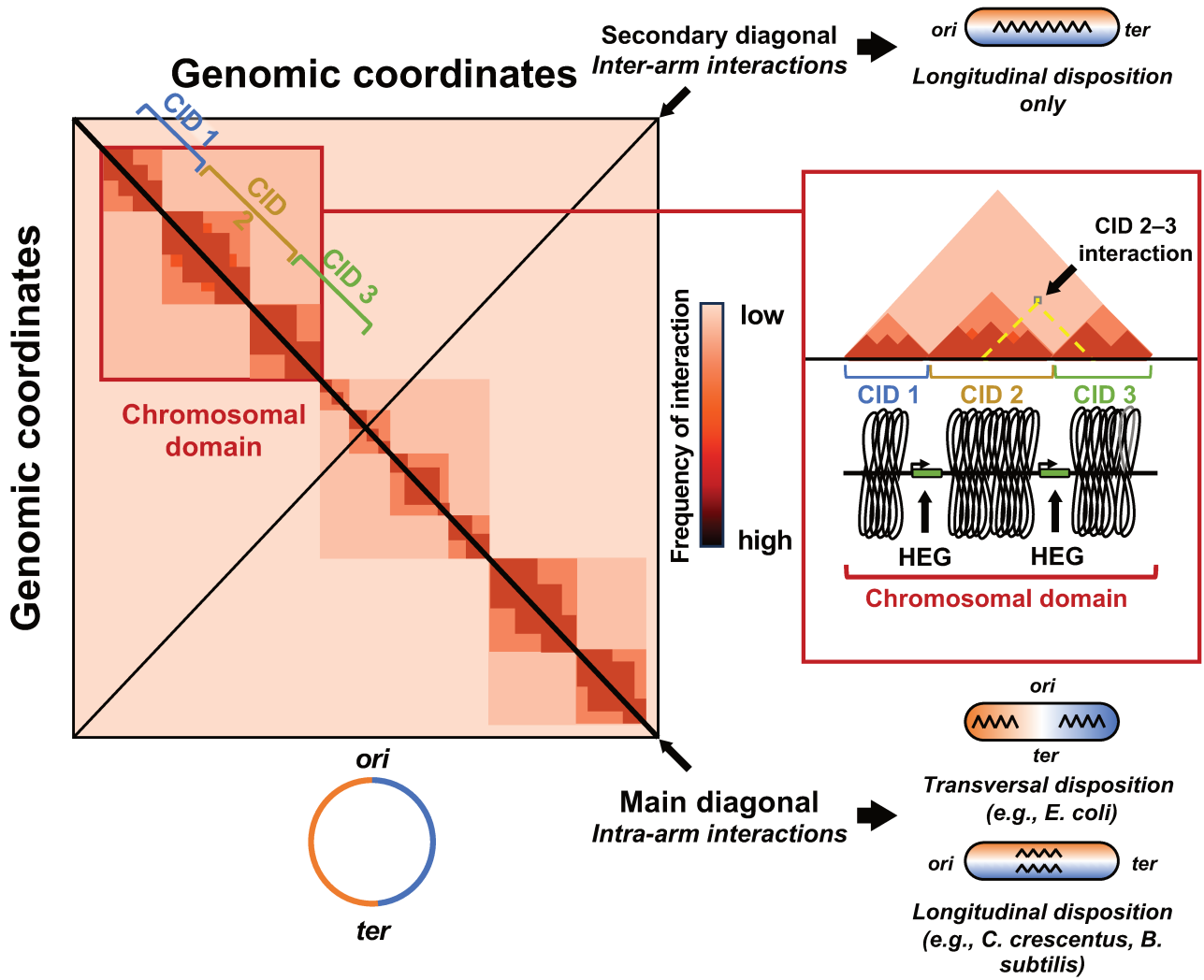


Fig 2

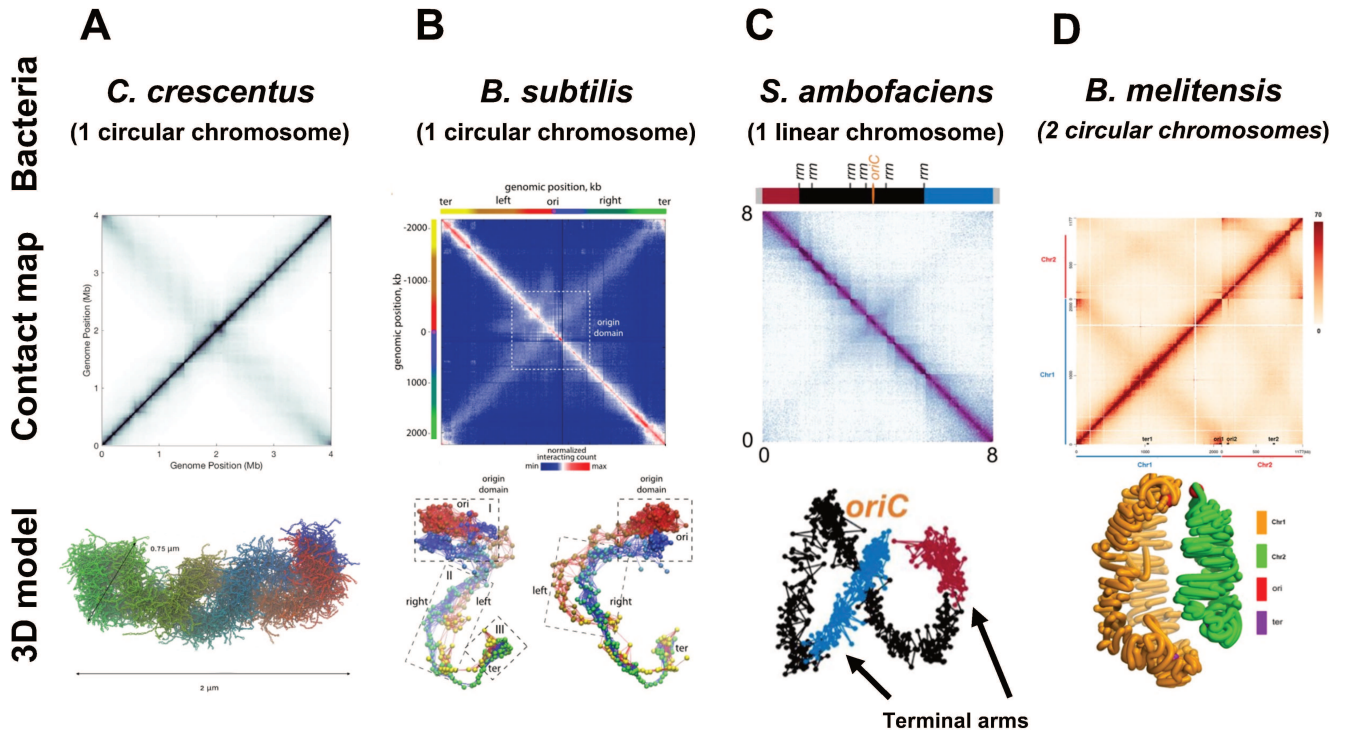


Fig 3

Annexe 2: Courbes de croissance

Courbes de croissance des souches sauvages, $\Delta lsr2$, Lsr2-FLAG, Lsr2 $_{\Delta NTD}$ -FLAG et Lsr2-mEos3.2 des deux morphotypes S et R de *M. abscessus*.

