

# La réponse au NO au centre de la pathogenèse bactérienne et cible d'antibiotiques innovants

Constance Porrini

▶ **To cite this version:**

Constance Porrini. La réponse au NO au centre de la pathogenèse bactérienne et cible d'antibiotiques innovants. Médecine humaine et pathologie. Université Paris-Saclay, 2020. Français. NNT : 2020UPASA008 . tel-03175216

**HAL Id: tel-03175216**
**https://pastel.hal.science/tel-03175216**

Submitted on 19 Mar 2021

**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.

université PARIS-SACLAY

# La réponse au NO au centre de la pathogenèse bactérienne et cible d'antibiotiques innovants

**Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay**


École doctorale n°581,
Agriculture, Alimentation, Biologie, Environnement, Santé - ABIES
Spécialité de doctorat : Microbiologie
INRAE, AgroParisTech, Micalis Institute, 78350, Jouy-en-Josas, France
Référent : AgroParisTech


**Thèse présentée et soutenue à Paris-Saclay, le 12 juin 2020, par**


## Constance PORRINI


## Composition du Jury

| | |
|---|---|
| **Stéphanie BURY-MONE**<br>Professeure, Université Paris-Saclay | Présidente |
| **Véronique BROUSSOLLE**<br>Directrice de Recherche, INRAE Centre Provence-Alpes-Côte d'Azur | Rapporteur et Examinatrice |
| **Olivier DUSSURGET**<br>Professeur, Université Paris-Diderot | Rapporteur et Examinateur |
| **Priscilla BRANCHU**<br>Chargée de Recherche, INRAE Centre Occitanie-Toulouse | Examinatrice |
| **Nalini RAMA RAO**<br>Directrice de Recherche, INRAE Centre IdF-Jouy-en-Josas-Antony | Directrice de thèse |

Thèse de doctorat


NNT : 2020UPASA008

REMERCIEMENTS

J'ai réalisé ce travail à l'Institut Micalis de l'INRAE de Jouy-en-Josas, financé par l'IDI Paris Saclay (Initiative Doctorale Interdisciplinaire), sous la direction du Dr Nalini Rama Rao. Je la remercie de m'avoir accueillie dans l'équipe pendant ces trois années.

Je remercie également chaque membre de l'équipe PIMs passé et présent pour leur accueil chaleureux et leur joie de vivre. Plus particulièrement, je remercie Lucie Lebreuilly et Fairouz Gzara pour leur aide au laboratoire et sur le manuscrit. Jasmina Vidic pour son énergie et son inspiration, et Rozenn Dervyn pour tout ce qu'elle m'a enseigné, toutes nos discussions, tous ses conseils et son grand cœur.

Je remercie également Cyprien Guérin et Pierre Nicolas de l'unité Maiage pour leur immense aide en bio-informatique et en statistique.

Je remercie également Stéphane Aymerich, Directeur de l'Institut Micalis, ainsi que mes collègues qui étaient à mes côtés, plus particulièrement Élise Borezée-Durant, Damien Lipuma, Vincent Saillant, les copains du volley et du « Repas DéJeunes » et les ITs qui partageaient bien plus qu'un couloir : Franck Gérard, Emmanuel Cuervo et Momar Mbow.

Je remercie également l'école Doctorale ABIES, son directeur et directeur adjoint Alexandre Pery et Pierre Larraufie et mon comité de thèse, les Dr Shaynoor Dramsi et Marion Leclerc.

Je remercie tous mes amis et ma famille qui sont une source d'inspiration et sur qui je peux toujours compter, et plus particulièrement Méliné Négroni, François Berthelot, Alison Dominguez et Océane Bataille pour leur aide dans la rédaction.

Je remercie mon père Jean Porrini pour toute son aide et ses conseils depuis toujours.

Enfin, je remercie Emeric Gaffiero pour son soutien inconditionnel pendant toutes ces années.

*A mon fils Léo*

# La réponse au NO au centre de la pathogenèse bactérienne et cible d'antibiotiques innovants


RÉSUMÉ

Le NO ou monoxyde d'azote est un radical libre très réactif omniprésent dans le monde du vivant. Il est capable de modifier les bases d'ADN, les lipides membranaires, l'activité des enzymes… Il a de nombreux rôles biologiques chez les animaux, les plantes, les champignons et les bactéries. Il est notamment produit par les cellules de l'immunité innée pour lutter contre les infections.

Pour infecter l'hôte, certaines bactéries pathogènes ont mis au point des mécanismes de résistance à ce stress. *Bacillus cereus,* est une bactérie pathogène qui est capable de résister au NO. Cependant ces mécanismes ne sont pas tout à fait élucidés. La protéine Mfd est connue comme pouvant réparer les lésions du NO sur l'ADN et augmenter la résistance au stress NO.

D'une part, une approche transcriptomique sur *Bacillus cereus* a permis de mettre en évidence, une région du génome particulièrement activée en présence de NO. Cette région contient des gènes qui codent pour une protéine de réparation des dommages causés par le NO, une enzyme de métabolisme de l'azote et des enzymes de biosynthèse du sirohème, un groupement ferreux.

D'autre part, un inhibiteur de la protéine Mfd a été testé pour son efficacité antibactérienne sur *Bacillus cereus* et sur quatre bactéries responsables d'infections en impasse thérapeutique à cause de l'apparition de résistances aux antibiotiques.



MOTS-CLÉS

Monoxyde d'azote, pathogène, *Bacillus cereus*, antibiotique, réponse immunitaire.

# Table des matières

**Introduction** ..... **10**

**I. Le monoxyde d'azote** ..... **11**
A. Le NO chez les mammifères ..... 13
B. Propriétés biologiques du NO et des RNS ..... 21
C. Le NO dans le monde procaryote ..... 28

**II. Bactérie modèle : *Bacillus cereus*** ..... **43**
A. Le groupe *Bacillus cereus* ..... 43
B. Toxines et facteurs de virulence ..... 44
C. La pathogénicité du groupe *B. cereus* ..... 50

**III. Les antibiotiques** ..... **53**
A. Histoire : Découvertes et mises au point ..... 53
B. Classes et cibles des antibiotiques actuels ..... 55
C. La résistance aux antibiotiques ..... 58
D. Quels espoirs ? Quelles options ..... 65
E. Les bactéries ESKAPE ..... 70

**Chapitre 1 : Caractérisation d'une région clé impliquée dans la réponse au stress NO de *Bacillus cereus*** ..... ***74***

**I. Introduction** ..... **77**

**II. Material and method** ..... **79**

**III. Results** ..... **82**
A. Resistance of *B. cereus* to NO stress ..... 82
B. A 6 genes region over activated by nitric oxide in the early response ..... 85
C. Organization and regulation of the region of interest ..... 86
D. Specificity to NO stress ..... 89

**IV. Discussion** ..... **90**

**Chapitre 2 : La réponse au NO cible d'un antibiotique innovant - Un inhibiteur dirigé contre Mfd-** ..... ***94***

**I. Introduction** ..... **94**

**II. Matériels et méthodes** ..... **95**

**III. Résultats** ..... **95**

**IV. Discussion** ..... **95**

**Discussion Conclusion** ..... **116**

**Bilan de la thèse** ..... **121**

**Annexes** ..... **122**

**Bibliographie** ..... **156**

# Table des figures et tableaux

**Introduction** ***10***

Figure 1 : Molécule de monoxyde d'azote 12
Figure 2 : Synthèse du NO chez les mammifères par les NOS. 13
Figure 3 : La phagocytose (Adapté de Porrini *et al.* [7]) 18
Figure 4 : Génération des dérivés réactifs de l'azote ou RNS (Reactive Nitrogen Species)[7]. 20
Figure 5 : Représentation des différents clusters Fe-S. 22
Figure 6 : Nitrosylation des clusters Fe-S par le NO 14. 23
Figure 7 : Formation des complexes S- nitrosothiol par action du NO sur les cystéines libres. 24
Figure 8 : Quatre étapes de la réponse des bactéries au stress nitrogène 31
Figure 9 : Observation de cassures de brin d'ADN in vitro par action du NO sur *Bacillus cereus* 37
Figure 10 : Modèle de couplage transcription-réparation (TRC) chez *E. coli* [50]. 39
Figure 11 : Domaines structurels et fonctionnels de Mfd [50]. 40
Figure 12 : Voies de défense des bactéries contre le NO 42
Figure 13 : Régulation de la transcription des gènes codants pour les facteurs de virulence de *B. cereus* 49
Figure 14 : Rappels historiques sur les découvertes d'antibiotiques 53
Tableau 1 : Les différentes classes d'antibiotiques, leurs mécanismes d'action et les mécanismes de résistance [97]. 56
Figure 15 : Infographie de l'ECDC (Centre européen de prévention et contrôle des maladies) : *Antibiotic resistance : an increasing threat to human health* 63
Figure 16 : Infographie de la campagne d'information pour lutter contre l'antibiorésistance de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), 2017 65
Figure 17 : Projets de développement d'antibactériens en phase préclinique dans le monde en 2019. 68
Tableau 2 : Classification des souches utilisées dans ce projet de thèse 71

**Chapitre 1 : Caractérisation d'une région clé impliquée dans la réponse au stress NO de Bacillus cereus** ***74***

Figure 1: RNA sequencing on *Bacillus cereus* after nitric oxide stress 82
Figure 2: Early response to NO stress at 10µM 84
Figure 3: Expression of the gene cluster by RNA sequencing during NO stress 85
Figure 4: Visualization of the area of interest 87
Figure 5: Gene expression analysis by RT-qPCR during multiple stresses. 89
Figure 6: Study model in *Bacillus cereus* 93

**Chapitre 2 : La réponse au NO cible d'un antibiotique innovant - Un inhibiteur dirigé contre Mfd-** ***94***

Tableau 1 : 95
Figure 1 : 95
Figure 2 : 95
Figure 3 : 95

Figure 4 : 95
Figure 5 : 95
Figure 6 : 95
Figure 7 : 95
Figure 8 : 95
Figure 9 : 95

**Annexes** ***122***

Figure annexe : Schéma descriptif des deux stratégies de mutagénèse employées. 154

# ABRÉVIATIONS

| | |
|---|---|
| [Fe-S] | Cluster Fer-Soufre |
| AMM | Autorisation de mise sur le marché |
| ARNP | Acide Ribonucléique Polymérase |
| BER | Base Excision Repair |
| BLSE | Bêta-Lactamases à Spectre Etendu |
| BMR | Bactérie Multi-Résistante |
| DMSO | Diméthylsulfoxyde |
| DNIC | Complexe de Dinitrosyl Ferreux |
| EDRF | Endothelium-Derived Relaxing Factor |
| FAD | Flavine Adénine Dinucléotide |
| FMN | Flavine Mononucléotide |
| GC | Guanylate Cyclase |
| GMPc | Guanine Monophosphate Cyclique |
| GSR | Réponse Générale aux Stress |
| Hmp | Flavohémoglobine |
| IL | Interleukine |
| LPS | Lipopolysaccharide |
| Mfd | Mutation Frequency Decline |
| MPO | Myéloperoxydase |
| NAD(P)H | Nicotinamide Adénine Dinucléotide (Phosphate) |
| NER | Nucleotide Excision Repair |
| NFκB | Nuclear Factor-Kappa B |
| Nhe | Non Haemolytic Enterotoxin |
| NK | Cellules Natural Killers |
| NMDA | Récepteur N-Methyl-D-Aspartate |
| NO | Monoxyde D'azote |
| NOR | NO Réductase |
| NOS | NO Synthases |
| $O_2^-$ | Superoxyde |
| $ONOO^-$ | Peroxynitrite |
| PAMP | Pathogen Associated Molecular Patterns |
| PLC | Phospholipase C |
| PLP | Protéine de Liaison aux Pénicillines |
| PRR | Pattern Recognition Receptors |
| RIC | Repair Iron Cluster |
| RNS | Reactive Nitrogen Species |
| ROS | Dérivés Réactifs de l'Oxygène |
| RPKM | Reads Per Kilobase Million |
| RT-qPCR | Reverse Transcription Quantitative PCR |
| SARM | *Staphylococcus aureus* Résistant à la Méticilline |
| SNO | S-Nitrosothiol |
| SOD | Superoxyde Dismutase |
| TIAC | Toxi-Infection Alimentaire Collective |
| TNF | Tumor Necrosis Factor |
| *trcf* | Transcriptional Repair Coupling Factor |

# Introduction

## Objectifs de la thèse

Le NO, ou monoxyde d'azote, est un radical libre très réactif qui agit sur de nombreux composants de la cellule pour induire sa lyse. Il est en effet capable de modifier les bases d'ADN, les lipides membranaires, l'activité des enzymes… Le stress NO est la production en grande quantité de NO par les cellules de l'immunité innée pour lutter contre les infections.

Au cours de l'évolution, les bactéries ont mis au point des stratégies pour lutter contre ce stress, bien que les mécanismes utilisés ne soient pas tout à fait élucidés à l'heure actuelle.

J'ai étudié cette réponse au stress selon deux approches complémentaires :

Dans le chapitre 1, l'impact du NO a été étudié par une approche transcriptomique sur une bactérie modèle. *Bacillus cereus* est une bactérie particulièrement résistante à ce stress.

*Bacillus cereus* est notre premier modèle de travail. C'est une bactérie pathogène pour l'homme qui est capable de résister aux macrophages pendant l'infection. Grâce à une approche transcriptomique, nous avons voulu comprendre davantage comment cette bactérie pouvait si bien se défendre. L'observation des gènes différentiellement exprimés en condition de stress NO nous a permis de mettre en évidence une région du génome particulièrement activée. Elle semble avoir une organisation singulière, spécifique du groupe *Bacillus cereus*. Le premier gène de cette région code pour un homologue de la protéine ScdA chez *Staphylococcus aureus* qui est impliquée dans la réparation des clusters Fer-souffre des protéines.

J'ai par la suite, voulu caractériser davantage cette région et cette protéine ainsi que leurs implications dans d'autres stress connus de la bactérie.

Le chapitre 2 s'inclut dans un projet d'innovation thérapeutique. Grâce à la compréhension des voies du NO, une nouvelle molécule inhibitrice de Mfd est testée pour son efficacité antibiotique sur *B. cereus* et 4 autres germes pathogènes pour l'homme.

Mfd est une protéine impliquée dans les mécanismes de réparation de l'ADN. Il a été prouvé qu'elle était, notamment, engagée dans la réparation des dommages à l'ADN causés par le NO. L'absence de cette protéine induit une diminution de la résistance de certaines bactéries au stress NO qui se traduit par une diminution de la virulence[1].

Ainsi, le projet part du postulat qu'en inhibant cette protéine Mfd, on rend sensible la bactérie au stress NO, ce qui restaurerait l'efficacité de la réponse immunitaire, et permettrait de lutter contre l'infection.

Nous avons réussi à trouver une molécule chimique capable d'inhiber *in vitro* l'activité de la protéine Mfd. Dans le cadre de mon projet de thèse, une méthode de test d'efficacité de ce composé a été mise au point sur cinq modèles bactériens lors de tests sur bactéries seules et sur un modèle d'infection *in vivo*, sur l'insecte. J'ai donc pu démontrer une efficacité de ce composé sur la survie bactérienne et sur la survie de l'insecte.

En complément des résultats scientifiques, mes travaux de thèse auront permis la mise au point et l'optimisation de diverses expériences sur modèles bactériens utilisant du NO, qui est un composé particulièrement difficile à manier.

De plus, j'ai adapté les modèles d'infection *in vivo*, avec 5 souches de bactéries pathogènes *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter baumanii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*) sur deux modèles d'insectes, la teigne de ruche (*Galleria mellonella)* et le ver à soie *(Bombyx mori).*

Ces protocoles ont été utilisés à la fois pour l'étude transcriptomique, le test d'efficacité d'un composé antimicrobien, l'analyse de bactéries pathogènes pour l'homme et l'analyse phénotypique de différents mutants bactériens.

## I. Le monoxyde d'azote

Le monoxyde d'azote, aussi appelé oxyde azotique, oxyde nitrique ou NO est un composé radicalaire. Ses propriétés biologiques très variées ont été découvertes dans les années 1980 et suscitent toujours un vif intérêt scientifique.

La découverte du rôle du monoxyde d'azote, en tant que molécule de signalisation cardiovasculaire, par les pharmacologues Robert F. Furchgott, Louis Ignarro et Ferid Murad, a été récompensée par le Prix Nobel de médecine en 1998.

Le NO est une molécule chimique qui contient un atome d'oxygène et un atome d'azote. C'est un radical libre car il possède un électron non apparié (Figure 1). Aux conditions normales de

température et de pression, il est sous forme gazeuse. Il est aussi très soluble dans les milieux aqueux et les solvants apolaires.

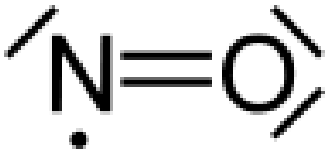


**Figure 1 : Molécule de monoxyde d'azote**
Le monoxyde d'azote possède un atome d'azote lié par une double liaison à un atome d'oxygène et un électron non-apparié, ce qui fait de lui un radical libre.

Comme le dioxygène ($O_2$), le NO est présent en solution dans les fluides tels que le sang, la lymphe ou les mucus, où il joue de nombreux rôles biologiques. Grâce à sa petite taille et à sa charge nulle, il diffuse parfaitement à travers les barrières et les membranes cellulaires. Le NO est présent chez tous les organismes eucaryotes, procaryotes et archées.

Chez les procaryotes, lorsqu'il est présent en faible quantité dans l'environnement, il peut servir de source d'azote, mais à forte concentration il devient un agent antimicrobien puissant. Les effets toxiques du NO à forte concentration touchent indifféremment les cellules eucaryotes et procaryotes.

Chez les mammifères, le NO est impliqué d'une part dans des processus physiologiques en tant que messager cellulaire, et d'autre part dans des processus pathologiques en tant qu'agent antimicrobien et anti-tumoral. Cette dualité d'action est fonction de la quantité de NO libérée dans une zone donnée. Quand il est produit chez les mammifères à faible dose par les NO synthases (NOS) constitutives, il aura des fonctions dans la neurotransmission et dans l'équilibre cardio-vasculaire. Et quand la NOS inductible est activée, lors de processus inflammatoire notamment, la production de NO est largement augmentée. Il devient alors cytotoxique.

## A. Le NO chez les mammifères

### 1. Biosynthèse du NO chez les mammifères

#### a. NO synthase

Le NO est synthétisé dans tous les types cellulaires par les NOS (Nitric Oxide Synthase) à partir d'arginine (Figure 2). Il existe trois isoformes de NOS qui possèdent la même structure mais qui se distinguent par leur mode d'expression et leur régulation : NOS1 (ou nNOS, découverte dans les neurones), NOS2 (ou iNOS, l'isoforme inductible) et NOS3 (ou eNOS, NOS endothéliale) [2].

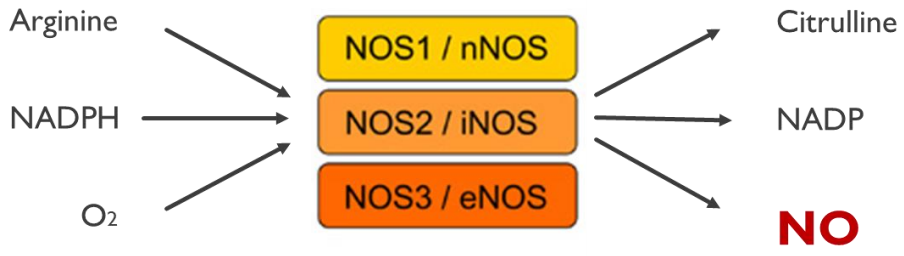



**Figure 2 : Synthèse du NO chez les mammifères par les NOS.**
La réaction de synthèse du NO par les NOS nécessite plusieurs cofacteurs : le NADPH (Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate), l'oxygène, le fer, le tétrahydrobioptérine (BH4), le FAD (Flavine Adénine Dinucléotide) et le FMN (Flavine Mono Nucléotide). En leur présence, la NOS hydroxyle l'arginine qui, après réduction, est transformée en citrulline avec libération de NO [2].

#### b. Régulation des NOS

La production du NO est finement régulée et permet d'orienter le rôle du NO *in vivo* : en tant que messager cellulaire ou agent cytotoxique. Cette régulation est faite de façon transcriptionnelle et/ou par la concentration du milieu en calcium [2]. Le NO produit par les NOS constitutives (NOS1 et NOS3) est impliqué dans des mécanismes physiologiques tels que l'homéostasie vasculaire et la neurotransmission. Il est produit de façon constante en faible quantité, de l'ordre de $10^{-7}$ M. La NOS1 et la NOS3 sont activées après le couplage avec la calmoduline. Ce couplage est régulé par le flux de calcium dans la cellule.

La iNOS ou NOS2 est impliquée dans les phénomènes inflammatoires et de lutte contre les infections. La NOS2 est principalement inductible mais elle peut être exprimée de façon constitutive dans les plaquettes et l'épithélium respiratoire où elle produit un niveau basal constant de NO [2].

Lorsqu'elle est induite, sa régulation est indépendante du calcium et est activée transcriptionnellement via la voie NF-κB. Cette voie est activée lors de l'inflammation par les cytokines pro-inflammatoires (TNFα, interleukine, interféron γ) ou les endotoxines bactériennes (lipopolysaccharide, LPS). Elle produit alors une grande quantité de NO ($>10^{-5}$ M) [2].

### c. La voie nitrate-nitrite-oxyde nitrique

Une voie alternative de synthèse du NO, indépendante des NOS, a été découverte plus récemment : la voie nitrate-nitrite-oxyde nitrique. Le NO est ici produit par la réduction séquentielle des nitrates dérivés des aliments. Certains légumes comme les épinards, la roquette ou les betteraves sont naturellement riches en nitrate. Dans un premier temps, la réduction des nitrates ($NO_3^-$) en nitrites ($NO_2^-$) s'effectue par la nitrate réductase des bactéries anaérobies facultatives du microbiote à la surface de la langue (*Staphylococcus spp. Escherichia coli*) [3]. Ensuite, les nitrites sont transformés dans l'estomac en NO et en acide nitreux ($HNO_2$) sous l'effet du pH acide. Cette autre façon de produire du NO permettrait de lutter contre des agents infectieux qui seraient présents sur les aliments consommés [3].

## 2. Infection et réponse immunitaire

Lors d'une infection, l'organisme déclenche des mécanismes de lutte, appelés réponse immunitaire. Elle se compose de deux systèmes qui collaborent : l'immunité innée et l'adaptative. Contrairement à la première, la seconde est spécifique du pathogène qui infecte. Elle fait donc appel à la mémoire immunitaire.

Le NO est produit par les cellules de la réponse immunitaire innée. C'est donc celle-ci qui sera étudiée dans ce projet.

La réponse immunitaire innée, dite non spécifique, agit sans tenir compte du type de pathogène qu'elle combat. Elle constitue la première ligne de défense contre une infection. Plusieurs types de mécanismes interviennent au cours de cette réponse : les barrières physiques et chimiques constituées par la peau ou les muqueuses, l'inflammation, la phagocytose et le système du complément. Ce dernier est constitué par un ensemble de facteurs présents dans le sérum ; il est responsable notamment de la cytolyse des pathogènes, de l'activation du système immunitaire et de l'opsonisation [4].

Cette réponse est la stratégie de défense immunitaire la plus ancienne dans l'évolution. Elle est retrouvée chez les plantes, les champignons, les insectes et les organismes multicellulaires primitifs[5].

L'inflammation est la première réponse aux infections et aux irritations. Elle est caractérisée par 4 principaux signes cliniques : rougeur, chaleur, douleur et tuméfaction. Ces symptômes sont dus à la libération de grande quantité de facteurs de l'inflammation, tels que l'histamine, la bradykinine, la sérotonine, les leucotriènes, les cytokines et les prostaglandines. Ces facteurs induisent une vasodilatation par le biais du NO, une augmentation de la perméabilité des vaisseaux (tuméfaction) et une augmentation de la sensation de douleur liée aux prostaglandines. Ils sont produits par les cellules de l'immunité innée. Cette dernière est fonctionnelle pendant quelques jours, ce qui laisse le temps à la réponse adaptative de se mettre en place.

Il existe des cytokines pro-inflammatoires comme le TNF-α, les chimiokines et les interleukines IL-1, IL-6, IL-12 et IL18, et des cytokines anti-inflammatoires, comme l'interleukine-10 et le TNF-β. Les cytokines pro-inflammatoires activent d'autres cellules de l'immunité, ce qui permet une amplification de la réponse et le recrutement de nouveaux acteurs. Les cytokines anti-inflammatoires jouent un rôle de régulation de la réaction inflammatoire, permettant ainsi qu'elle ne devienne exagérée.

Les cellules impliquées dans l'immunité innée sont les macrophages, les cellules dendritiques, les mastocytes, les cellules natural killers (NK), les polynucléaires, et les cellules résidentes (fibroblastes, cellules musculaires, cellules épithéliales). Elles expriment toutes à leur surface des récepteurs du soi (PRR « Pattern Recognition Receptors ») qui sont chargés de détecter les agents étrangers. En effet, les PRR reconnaissent spécifiquement des éléments présents à la

surface des microorganismes appelés PAMP (Pathogen Associated Molecular Patterns), il y a alors activation de la cellule.

Les macrophages et les polynucléaires neutrophiles sont particulièrement producteurs de NO grâce à leur NOS2 inductible.

Les macrophages sont des cellules sanguines appartenant à la famille des leucocytes. Ils sont issus de la différenciation des monocytes. Les monocytes et les macrophages sont des cellules phagocytaires. Les monocytes sanguins sont attirés par chimiotactisme sur le lieu de l'inflammation, puis ils infiltrent les tissus en traversant l'endothélium vasculaire et se différencient en macrophages. Ils sont alors capables de combattre les causes de l'inflammation.

Les neutrophiles sont également des leucocytes, ils appartiennent à la famille des polynucléaires. Ils sont capables de phagocyter les bactéries.

Tous deux participent à l'immunité innée en tant que défense non-spécifique. Leur rôle est de phagocyter les débris cellulaires et les agents pathogènes.

Lors de la phagocytose, les bactéries ou tout autre agent phagocyté sont séquestrés dans le phagolysosome. Cette vacuole, présente dans le cytoplasme des cellules phagocytaires, contient de nombreuses substances bactéricides en forte concentration. Il s'agit d'agents oxydants et nitrants accompagnés d'enzymes lysosomales, qui vont lyser les composants cellulaires.

Les macrophages et les neutrophiles produisent une grande quantité de NO ce qui leur permet d'avoir une activité toxique sur les virus, les bactéries, les champignons, les parasites et les cellules tumorales. Les actions antimicrobiennes et cytotoxiques du NO sont amplifiées par d'autres produits tels que les acides et les dérivés réactifs de l'oxygène (ROS) comme le peroxyde d'hydrogène ou le superoxyde.

En effet, lors de la réponse inflammatoire, le NO est sécrété en grande quantité, bien au-delà des concentrations physiologiques. Il est produit par la NOS2, principalement dans les macrophages. L'expression de NOS2 est activée par des cytokines, tel que le TNFα, et des PAMP, principalement par induction transcriptionnelle via la voie NF-κB.

Les cellules de l'immunité, quand elles sont activées, secrètent à la fois une grande quantité de NO et des ROS, notamment l'ion superoxyde $O^{2-}$.

Le superoxyde et le NO ne sont pas particulièrement toxiques car il existe des moyens efficaces pour minimiser leur accumulation. Ainsi, le superoxyde est éliminé par les superoxyde

dismutases (SOD). Le NO lui, est rapidement éliminé par sa diffusion rapide à travers les tissus dans les globules rouges, où il est converti en nitrate par réaction avec l'oxyhémoglobine. Cela limite la demi-vie biologique du NO *in vivo* à quelques secondes (Figure 3).

Cependant, lorsque le superoxyde et le NO sont synthétisés en grande quantité dans la même région, ils se combinent spontanément pour former du peroxynitrite (ONOO-). La plupart des effets du NO lors de l'inflammation sont liés à la formation de cet ion [6].

Les macrophages participent à la formation du peroxynitrite. Lorsqu'ils sont activés, ils produisent à la fois du superoxyde par la NADPH oxydase et du NO par la NOS2, ce qui génère du peroxynitrite. Le peroxynitrite induit la formation d'autres espèces réactives de l'oxygène et de l'azote. La présence extracellulaire de superoxyde dismutase (SOD) réduit la quantité de peroxynitrite formée.

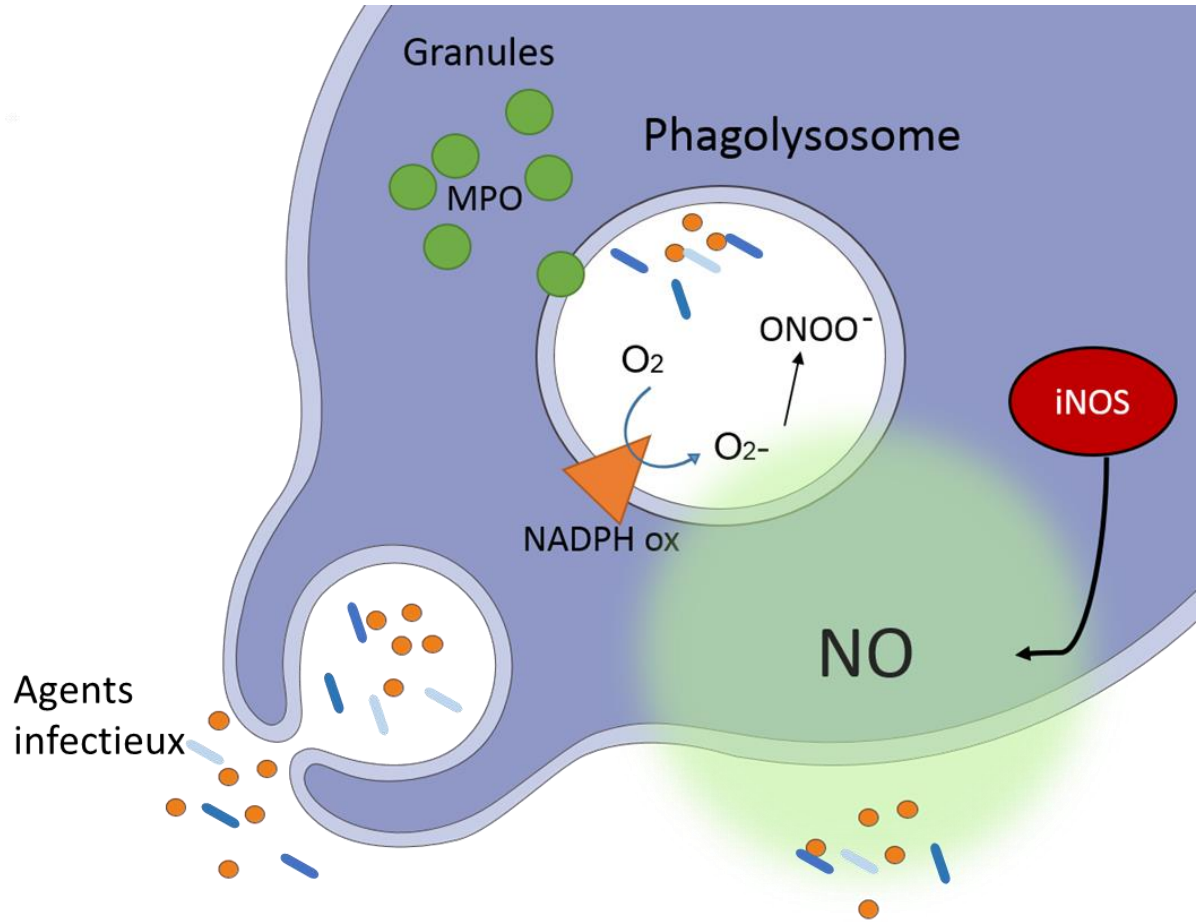



**Figure 3 : La phagocytose (Adapté de Porrini *et al.* [7])**
Lors de la phagocytose, les bactéries ou tout autre agent phagocyté sont séquestrés dans le phagolysosome. Cette vacuole, présente dans le cytoplasme des cellules phagocytaires, contient de nombreuses substances bactéricides en forte concentration. Il s'agit d'agents oxydants et nitrants accompagnés d'enzymes lysosomales, qui vont lyser les composants cellulaires. Ces agents sont synthétisés par des enzymes telles que la myeloperoxydase (MPO) ou la NADPH oxydase. La fusion de granules (vert) avec la vacuole permet l'arrivage massif de substances antimicrobiennes au contact du microorganisme. Le NO est produit par la NOS dans le cytoplasme et peut facilement diffuser dans le phagolysosome et en dehors. Le superoxyde est produit grâce à la NADPH oxydase, mais à la différence du NO, il ne pénètre pas les membranes cellulaires ni les parois cellulaires des agents pathogènes. Il reste piégé dans la vacuole de lysosome. C'est la production simultanée du NO et du superoxyde qui permet de potentialiser leur action. Le peroxynitrite est alors généré dans la vacuole, par la réaction du NO et de l'$O^{2-}$.

Le peroxynitrite a une action centrale dans les processus de phagocytose : il endommage les composants cellulaires des agents phagocytés. De plus, il peut activer la myéloperoxydase, l'enzyme productrice des ROS.

En outre, le nitrite formé à partir de la décomposition des peroxynitrites est piégé dans le phagolysosome et sert de substrat supplémentaire pour la myéloperoxydase. La

myéloperoxydase a un rôle important dans les neutrophiles, mais n'est pas une protéine prédominante dans les macrophages, où la formation de peroxynitrite, du superoxyde et du NO semble être un mécanisme majeur de la cytotoxicité [6].

### 3. Le stress NO et la formation de dérivés réactifs de l'azote (RNS : Reactive nitrogène species)

En solution dans l'organisme, le NO est capable de réagir spontanément avec le dioxygène et l'eau, c'est pourquoi il a un temps de demi-vie très court, estimé entre 1 et 5 secondes [2]. Les réactions sont les suivantes.

$2\ NO + O_2 \rightarrow ONOONO \rightarrow 2\ NO_2$ (Dioxyde d'azote)

$NO + H_2O \rightarrow HNO_2$ (Acide nitreux)

$4 \cdot NO + O_2 + 2\ H_2O \rightarrow 4\ HNO_2$

Lors de la réponse immunitaire innée, le NO et l'ion superoxyde sont produit simultanément par les cellules. Ces deux radicaux peuvent réagir très rapidement pour former l'ion peroxynitrite.

$NO + O_2^-$ (Superoxide) $\rightarrow ONOO^-$ (Peroxynitrite)

L'ion peroxynitrite est un puissant agent oxydant et nitrant, très toxique pour les cellules. Il peut réagir directement avec de nombreuses cibles biologiques : les lipides, les résidus d'acides aminés, les bases d'ADN et les polysaccharides. Lors de ces réactions, il y a génération d'autres dérivés de l'azote, très réactifs : les RNS pour *Reactive Nitrogen Species* (Figure 4).

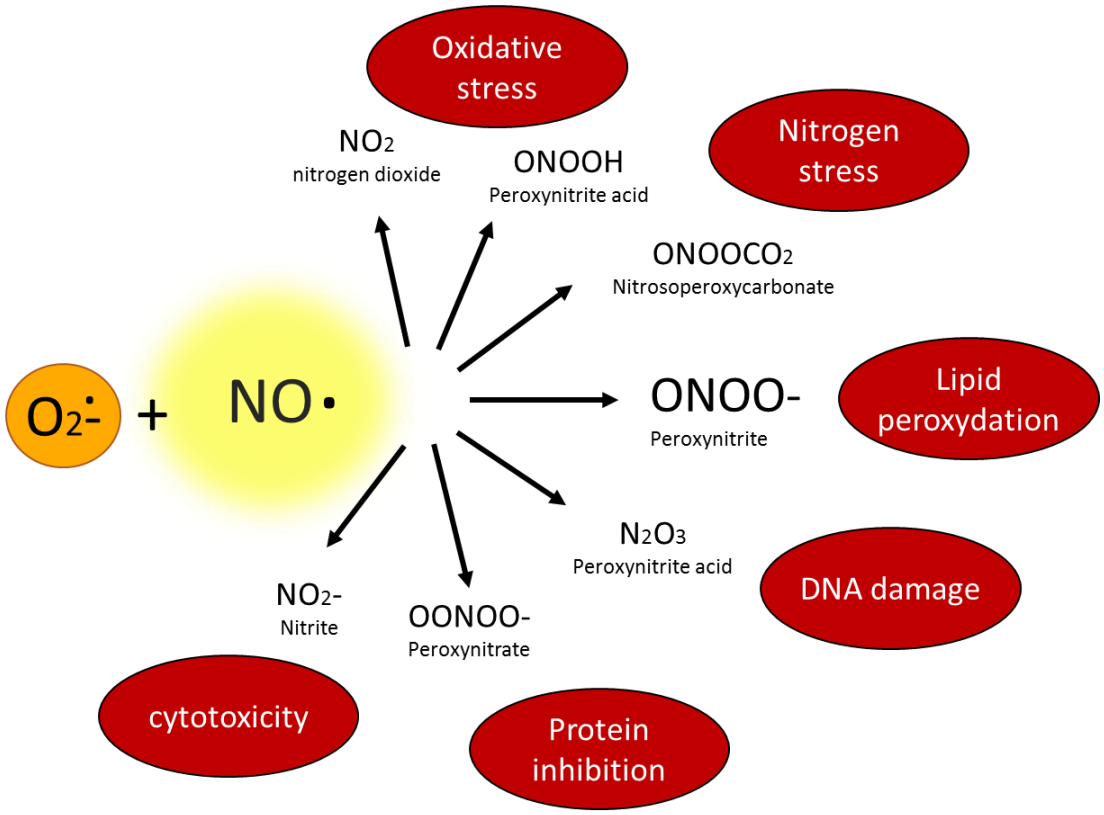



**Figure 4 : Génération des dérivés réactifs de l'azote ou RNS (Reactive Nitrogen Species)[7].** Les RNS sont formés à partir du NO et du superoxyde. Ces radicaux libres réagissent ensemble pour former du peroxynitrite. Ils peuvent également réagir avec le dioxyde d'azote ($NO_2$) pour générer du trioxyde de dinitrogène ($N_2O_3$) ou du peroxynitrate ($NO_4^-$). Le peroxynitrate se décompose en nitrite et en oxygène. Le $N_2O_3$ a un pouvoir nitrant sur les protéines. Il réagit également avec du peroxynitrite pour produire du dioxyde d'azote et du nitrite. Ces RNS sont impliqués dans de nombreux processus toxiques pour les cellules (peroxydation des lipides, dommages à l'ADN…).

En plus de son caractère très réactif, le NO est capable d'induire la formation d'agents hautement oxydant et nitrant, composés qui sont associés aux propriétés toxiques du NO. C'est via la formation de l'ion peroxynitrite et des autres dérivés réactifs de l'azote (RNS) que le NO acquiert la plupart de ses propriétés cytotoxiques et bactéricides. C'est ce que l'on appelle le stress nitrogène.

## B. Propriétés biologiques du NO et des RNS

### 1. Action sur les protéines

Le NO et ses dérivés sont capables de réagir avec les métaux de transition présents dans les métalloprotéines, et également avec les atomes de soufre des résidus cystéines. Ces réactions modifient l'activité des enzymes qui portent ces atomes.

Un métal de transition est, selon la définition de l'IUPAC (Union internationale de chimie pure et appliquée), « un élément chimique dont les atomes ont une sous-couche électronique d incomplète, ou qui peuvent former des cations dont la sous-couche électronique d est incomplète » [8]. Ces métaux sont classés dans les colonnes 3 à 11 du tableau périodique des éléments. Ils partagent des propriétés communes : ils sont solides dans les conditions normales de température et de pression, avec une masse volumique et une température de fusion élevées. Ils peuvent former des cations et d'autres variétés d'espèces ioniques, grâce à la faible différence d'énergie entre leurs états d'oxydation. Ils ont également de bonnes propriétés catalytiques. C'est pourquoi certains métaux de transition comme le fer et le cuivre ont de nombreux rôles biologiques, notamment via leur liaison aux protéines. Le NO peut ainsi interagir avec les métalloprotéines et plus particulièrement les protéines à groupement hème (ou hémoprotéines) et les protéines à groupement fer-soufre.

#### a. Réaction avec les hémoprotéines

L'hème est une molécule constituée d'un atome de fer sous forme d'ion $Fe^{2+}$ au centre d'un hétérocycle appelé porphyrine. C'est un groupement prosthétique de protéines, appelées hémoprotéines.

Ces hémoprotéines sont retrouvées chez les eucaryotes et les procaryotes, on peut citer notamment l'hémoglobine, les cytochromes, les synthases de NO (NOS), et la flavohémoglobine bactérienne (Hmp).

La fonction principale des hémoprotéines est de lier, transporter et détecter des gaz diatomiques (comme le NO ou le dioxygène). Elles peuvent aussi catalyser des réactions enzymatiques et servir de transporteurs d'électrons. Le NO peut donc se lier à l'atome de fer du groupement hème et modifier les propriétés de transport ou catalytique de l'enzyme.

En effet, l'affinité du NO pour l'hémoglobine est très forte, nettement supérieure à celle de l'$O_2$. L'hémoglobine est capable de détoxifier le sang d'un excès de NO, mais en trop forte

concentration, le taux d'hémoglobine disponible pour le dioxygène devient limitant. L'intoxication au NO peut donc entrainer une cyanose potentiellement grave [6].

La majorité des cibles enzymatiques du NO et son effet d'activation ou d'inhibition sur celles-ci restent encore peu connus. Chez les mammifères, la principale cible du NO est la guanylate cyclase (GC). La GC activée catalyse la formation de 3',5'-cyclic guanosine monophosphate (cGMP) à partir de la guanosine triphosphate (GTP) avec libération d'un pyrophosphate, le GMPc, qui est un second messager important des cellules eucaryotes Le NO peut activer la GC de façon réversible en se liant sur son groupement hème avec une forte affinité [9].

Chez les procaryotes, sa cible la plus connue est la flavohémoglobine. C'est une protéine très proche de l'hémoglobine eucaryote, également capable de détoxifier le cytoplasme des bactéries d'un excès de NO [10].

Les cytochromes, qui sont communs aux eucaryotes et aux procaryotes, sont aussi très fortement ciblés par le NO. Ce sont les composants essentiels de la chaine respiratoire. Ainsi, le NO inhibe la respiration bactérienne et mitochondriale par action sur la cytochrome C oxydase, ce qui induit la mort des cellules eucaryotes et des bactéries aérobies [11].

### b. Réaction du NO avec les protéines fer-soufre

Les protéines fer-soufre (Fe-S) possèdent un cluster fer-soufre. Ce sont des groupements de deux à quatre atomes de fer, liés à des anions sulfure $S_2^-$ (Figure 5) [12].

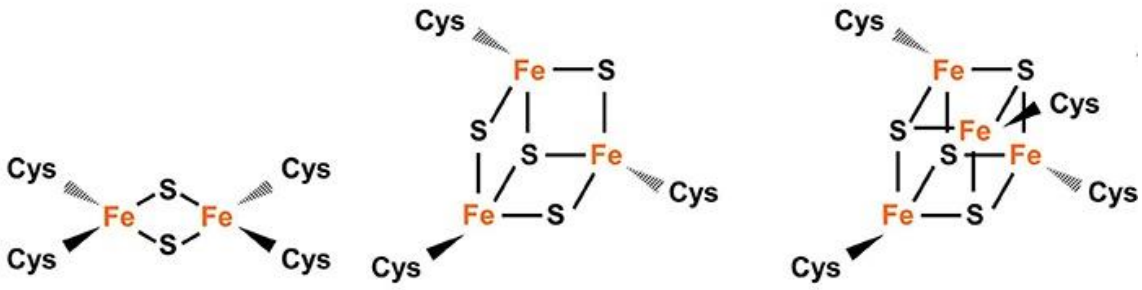



**Figure 5 : Représentation des différents clusters Fe-S.**
Les différents types de groupements Fe-S peuvent être coordonnés par quatre résidus cystéines ou histidines : de gauche à doite, 2Fe-2S, 3Fe-4S, 4Fe-4S. Dans les clusters Fe-S, l'état d'oxydation du fer pourrait être +II ou +III tandis que l'état d'oxydation du soufre est –II [13].

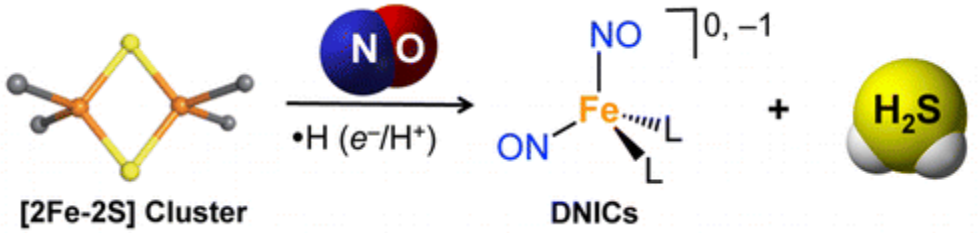



**Figure 6 : Nitrosylation des clusters Fe-S par le NO 14.**
L'attaque du NO sur les groupements [2Fe-2S] induit la formation de DNIC (*DiNitrosyl Iron Complexes*) et le dégagement de sulfure d'hydrogène ($H_2S$).

Les protéines contenant un groupement fer-soufre sont l'une des principales cibles du NO. Les groupements [Fe-S] au sein de ces protéines sont convertis en dérivés nitrosylés de fer, dont les complexes de fer dinitrosylés (DNIC) sont les plus répandus. Ils sont issus de l'attaque du NO sur les groupements de type [2Fe-2S]. Le NO peut également désassembler les clusters [4Fe-4S]. Certaines des protéines [Fe-S] sont des protéines de régulation dont les groupements [Fe-S] réagissent avec le NO pour contrôler leur activité (Figure 6) [14].

Le NO et ses dérivés peuvent donc moduler la fonction de ces protéines en nitrosylant ou en désassemblant les centres [Fe-S] [15].

Ces enzymes sont bien connues pour leur participation dans les réactions d'oxydo-réduction de la chaîne respiratoire mitochondriale ou bactérienne, en particulier la NADH déshydrogénase (complexe I), la succinate déshydrogénase (complexe II) et la cytochrome C oxydase (complexe IV). L'inhibition de cette dernière, enzyme clé de la respiration cellulaire, peut être létale pour les bactéries aérobies ou pour les cellules.

Ces groupements interviennent également dans d'autres processus, comme catalyseurs dans le cas de l'aconitase, comme donneurs de soufre dans les biosynthèses de l'acide lipoïque et de la biotine, et même dans certains cas comme régulateurs de l'expression génétique [16]. Ils sont aussi impliqués dans l'assimilation des nitrites par les bactéries grâce à la nitrite réductase.

### c. Modification des acides aminés

Le stress causé par le peroxynitrite peut résulter des réactions d'oxydation directe de l'acide peroxynitreux ou de la formation de radicaux oxydants et peut entraîner l'oxydation des lipides, des thiols et des hémoprotéines, l'hydroxylation des centres aromatiques et les dommages aux centres fer-soufre. Ce stress nitrogène peut être causé par la nitration des groupements phénols et la nitrosylation des thiols des acides aminés. Le peroxynitrite réagit et altère la fonction et la stabilité des protéines par la réaction avec divers acides aminés dans la chaîne peptidique. La réaction la plus courante avec les acides aminés est l'oxydation de la cystéine et la nitration de la tyrosine pour former de la nitrotyrosine [17].

La tyrosine réagit avec des RNS produits à partir de peroxynitrite. Toutes ces réactions affectent la structure et la fonction de la protéine et ont donc le potentiel de provoquer des changements dans l'activité catalytique des enzymes, l'organisation cytosquelettique et la transduction du signal cellulaire. La quantité de nitrotyrosine, qui peut être dosée, est un témoin du stress nitrogène.

Le NO cible uniquement les cystéines libres des chaines peptidiques, c'est-à-dire celles qui ne sont pas impliquées dans un pont disulfure, ni dans un motif structurel acide ou hydrophobe. Le NO réagit avec les groupements thiol de ces résidus cystéine, pour former un groupement S-nitrosothiol (Figure 7). La nitrosylation est une modification post-traductionnelle des protéines, impliquées dans la transduction de signal comme la phosphorylation, par exemple.

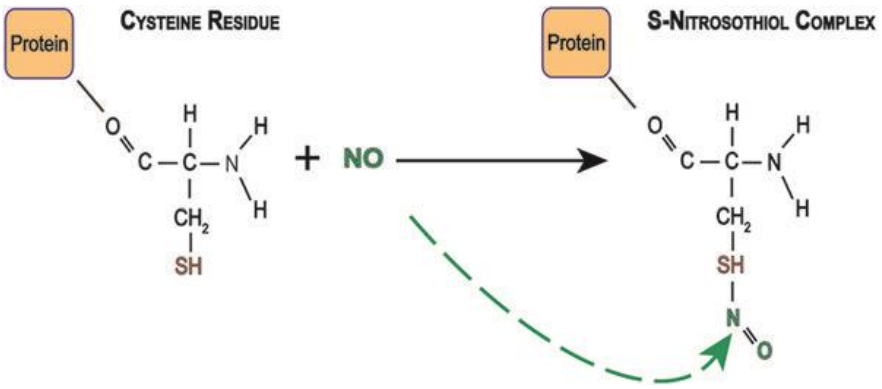



**Figure 7 : Formation des complexes S- nitrosothiol par action du NO sur les cystéines libres [18].**

Les cibles de S-nitrosylation connues sont retrouvées dans des mécanismes cellulaires très différents. On peut notamment citer la voie des MAP kinases, la voie NF-κB impliquée dans l'inflammation et le récepteur NMDA impliqué dans la neurotransmission [19].

### 2. Action du NO et des RNS sur les acides nucléiques

Le stress nitrogène est responsable de mutations de l'ADN. La plupart des dommages ne sont pas directement liés au NO mais à ses dérivés, tels que l'ion peroxynitrite ($ONOO^-$) ou le trioxyde de diazote ($N_2O_3$).

Le $N_2O_3$ est capable de désaminer les bases de l'ADN : guanine, adénine et cytosine en xanthine (dX), en hypoxanthine (dHX) et en uracile (dU) respectivement[20]. Ces trois composants sont hautement mutagènes pour la molécule d'ADN et sont responsables de mutations de type transition GC→AT ou AT→ GC.

Le peroxynitrite est un agent oxydant qui cible préférentiellement les résidus guanine et produit de la 8-oxoguanine et de la 8-nitroguanine. La 8-oxoguanine a une réactivité élevée qui peut générer des produits oxydants cytotoxiques. La 8-nitroguanine est très instable et peut entrainer des cassures de brin d'ADN.

### 3. Réactions sur les lipides

Un aspect majeur de l'action des RNS sur les lipides repose sur la capacité du peroxynitrite à déclencher la peroxydation des acides gras polyinsaturés (AGPI), composants des membranes, des liposomes et les lipoprotéines. Les produits résultants comprennent des radicaux hydroperoxyl lipidiques, des diènes conjugués et des aldéhydes. De tels radicaux attaquent à leur tour les AGPI voisins, générant des radicaux supplémentaires qui propagent des réactions radicalaires et la dégénérescence des lipides membranaires, provoquant une perméabilité de la membrane et des changements de fluidité avec des conséquences biologiques significatives [6].

### 4. Réactions avec les glucides

Le NO induit la dégradation des glycosaminoglycanes via la formation de deux dérivés, l'acide nitreux et le peroxynitrite. Ces macromolécules glucidiques sont des composants de la matrice extra cellulaire chez les vertébrés [21].

En condition d'inflammation, les cellules qui sont exposées à un fort taux de NO et de $O_2^-$ subissent des lésions de l'ADN qui sont à la fois mutagènes et cytotoxiques. Ces effets ciblent de la même façon les cellules de l'hôte (tumorales ou non) et les cellules ou particules infectantes, qu'elles soient bactériennes, virales, fongiques ou parasitaires.

## 5. Fonction du NO à dose physiologique chez les mammifères

Le NO est omniprésent chez les vertébrés. Aux concentrations physiologiques, il agit comme messager cellulaire et neuromédiateur sur un grand nombre de fonctions biologiques telles que les fonctions cardiovasculaire et neuronale.

### a. La neurotransmission

Le NO est un messager cellulaire utilisé par le système nerveux périphérique et central. Il est produit par l'isoforme neuronale de la NO synthase (nNOS ou NOS1). La sécrétion du NO est induite par l'activation des récepteurs NMDA (pour récepteur N-Methyl-D-Aspartate). Ce sont des récepteurs inotropes activés en conditions physiologiques par deux neuromédiateurs : le glutamate et la glycine. Cela entraine l'ouverture du canal ionique, la libération de cations puis l'activation de la NOS1. Le NO alors libéré diffuse dans la fente synaptique et active une guanylate cyclase transmembranaire. Le GMPc produit va entrainer l'entrée de calcium dans le neurone post-synaptique, ce qui va activer la calmoduline et transmettre ainsi l'influx nerveux [22].

### b. Rôle vasodilatateur

Le NO était connu à l'origine sous le nom d'EDRF (*Endothelium-Derived Relaxing Factor)*, car sa fonction de relaxation des vaisseaux sanguins a été mise en évidence avant d'être chimiquement identifiée. Grâce à sa forte affinité pour la guanylate cyclase (GC), le NO induit une forte production de guanosine monophosphate cyclique (GMPc). Ce nucléotide cyclique

active une protéine kinase G, ce qui déclenche une voie de signalisation qui conduit à une diminution du calcium intracellulaire, et induit alors le relâchement des muscles lisses. Ils sont localisés dans les parois vasculaires et dans les voies digestives, respiratoires, urinaires et génitales. Ainsi, au niveau cardiovasculaire, le NO entraine une vasodilatation, ce qui diminue la pression sanguine et augmente la perfusion de certains organes [9].

### c. Inhibition des plaquettes

Les plaquettes sont de petites cellules sans noyau qui circulent dans les vaisseaux sanguins. En cas de dommages de l'endothélium vasculaire, les plaquettes sont activées par contact avec le collagène, alors exposé à la lumière du vaisseau. Activées, elles s'agrègent entre elles sur le site de la plaie pour initier le processus de coagulation et arrêter le saignement. Une trop forte activation des plaquettes peut entrainer une thrombose et déclencher une réponse inflammatoire au niveau de la paroi vasculaire. Il est donc essentiel, lors de l'hémostase vasculaire normale, que l'activation des plaquettes soit étroitement contrôlée. En effet, les plaquettes et les cellules endothéliales produisent et sécrètent des substances qui inhibent directement l'agrégation plaquettaire telle que le NO. Il permet l'équilibre hémostatique entre les plaquettes et l'endothélium. Le NO ainsi produit entraine une augmentation de GMPc dans les plaquettes et inhibe leur activité [23].

En conclusion, le NO est constamment synthétisé par l'endothélium vasculaire et les plaquettes afin de réguler la circulation et la pression sanguine. Il permet le maintien d'un flux sanguin laminaire et contribue à l'homéostasie des vaisseaux en inhibant la contraction des muscles lisses vasculaires, l'agrégation plaquettaire et l'adhésion des leucocytes à l'endothélium.

Lors de maladies tels que le diabète, l'athérosclérose ou l'hypertension artérielle, la voie du NO est souvent altérée, ce qui se traduit par une augmentation pathologique et chronique de la pression artérielle.

### d. NO utilisé en thérapie

La principale fonction du NO recherchée en thérapie est son action vasodilatatrice rapide.

En néonatalogie, le monoxyde d'azote peut être utilisé en soin intensif sous forme d'un mélange gazeux $NO/O_2$ pour le traitement de l'hypertension artérielle pulmonaire [24].

Chez l'adulte, il est administré grâce à des prodrogues. Les dérivés nitrés tels que la nitroglycérine, aussi appelée trinitrine sont des donneurs de NO qui peuvent être administrés par voie orale ou sublinguale. Ils sont indiqués pour le traitement ou la prévention de l'angor, des insuffisances ventriculaires, des ischémies myocardiques, ou des œdèmes aigus du poumon. La trinitrine possède de très bons paramètres pharmacocinétiques, car elle diffuse très rapidement dans l'organisme, et son action vasodilatatrice est presque immédiate [25 26].

## C. Le NO dans le monde procaryote

### 1. Le cycle de l'azote et l'utilisation du NO chez les bactéries,

Chez les eucaryotes, le NO est une molécule de signalisation et de défense contre les bactéries. Ces dernières sont en effet sensibles aux concentrations élevées de NO en raison de la perméabilité de leurs membranes et de la forte réactivité du NO.

Dans le monde procaryote, le NO est aussi présent, en dehors de l'infection. Il est produit par certaines bactéries de l'environnement car c'est un intermédiaire du cycle de l'azote.

Le cycle de l'azote est un cycle biogéochimique par lequel l'azote est converti en dérivés azotés à des états d'oxydation différents par les composants des écosystèmes. Ces dérivés circulent entre les écosystèmes terrestres, aériens et marins par des voies physiques et biologiques, comme la chaine alimentaire. Ce cycle a des impacts écologiques et industriels multiples.

L'azote de l'environnement peut se trouver sous divers états d'oxydation tels que les ions ammonium, nitrite et nitrate, de NO, $N_2$ ou encore de $N_2O$. La plupart des procédés de transformation des dérivés azotés dépendent des bactéries de l'environnement.

Pour la respiration en condition limitée en oxygène, les bactéries anaérobies peuvent utiliser comme accepteurs d'électrons terminaux, des oxydes d'azote solubles, des nitrates et des nitrites. Il existe deux voies de respiration des nitrates, l'ammonification et la dénitrification, qui impliquent la formation d'un intermédiaire commun, le nitrite. Ces deux voies se terminent par différents produits : l'ammoniac et les oxydes d'azote gazeux (comme le NO et le $N_2O$) ou

le dinitrogène. Les genres *Pseudomonas, Thiobacillus et Micrococcus* sont des bactéries dénitrifiantes [27].

Ainsi, dans la nature ou lors de l'infection, les bactéries peuvent être exposées à des concentrations plus ou moins importantes de NO. En trop grande concentration, il crée un stress pour la bactérie.

2. La production du NO chez les bactéries

Il existe trois façons chez les bactéries de produire du NO.

Premièrement, le NO est un intermédiaire obligatoire lors de la dénitrification. Ce mécanisme est surtout décrit chez les bactéries de l'environnement (du sol, des eaux ou des sédiments). Elles utilisent des dérivés de l'azote comme accepteur d'électrons. En condition limitées en oxygène, les nitrites et les nitrates sont réduits en diazote et produisent du NO et du $N_2O$ comme intermédiaires de réaction[179].

D'autre part le NO peut être obtenu directement par réduction des nitrites. Ce mécanisme est décrit chez les bactéries lactiques (*Lactobacillus* et *Bifidobacteria*) ou chez *E. coli* [180] et *S. typhimurium*[181].

Enfin, certaines bactéries possèdent une NO synthase capable de générer du NO à partir de L-arginine comme les NOS eucaryotes. Ces NOS bactériennes ou bNOS possèdent une grande similarité, mais sont plus petites que les NOS eucaryotes, elles ne possèdent que le domaine oxygénase mais pas le domaine réductase. Cette réaction est assurée par des réductases non spécifiques. Les bNOS fonctionnent avec les mêmes cofacteurs que les NOS eucaryotes. Cette fonction a été découverte chez la bactérie Nocardia[183].Les NOS sont retrouvées dans une vingtaine de genres bactériens, notamment *Bacillus*, *Staphylococcus* et *Deinococcus*[182].

Le NO a un rôle dans la signalisation, notamment dans les interactions hôtes/pathogènes et bactérie/bactérie. Chez *Nocardia*, les NOS sont activées par un composant cellulaire de l'hôte lors de l'infection[183].

Chez *Bacillus*, les NOS contribuent à la résistance au stress oxydant. L'équipe de Gusarov *et al*. a montré que, le NO protège immédiatement les cellules bactériennes des espèces réactives de l'oxygène par deux mécanismes indépendants. Il supprime transitoirement la réduction

enzymatique des cystéines libres pour limiter la formation de radicaux libres par la réaction de Fenton. De plus, le NO active directement la catalase, une enzyme antioxydante majeure[184].

Dans d'autres cas, les NOS modulent la respiration anaérobique et activent la respiration des nitrates en conditions limitées en oxygène chez les bactéries pathogènes comme *Staphylococcus* notamment[185].

### 3. Mécanismes de résistance des bactéries au monoxyde d'azote

Il a été montré que, dans la plupart des infections à bactéries telles que *Salmonella, Mycobacterium, Streptococcus,* ou *Bordetella,* du NO était produit en grande quantité. Dans la majorité des cas, cela augmentait la résistance de l'hôte à l'infection [28] [29].

Dans l'étude de Canthaboo *et al.* les souris déficientes en NOS2 étaient plus sensibles aux infections à *Bortella pertussis* que les souris sauvages. En effet, il y a une augmentation de la croissance bactérienne chez les souris mutées [29]. Des résultats similaires ont été observés chez d'autres types bactériens tels que *Bacillus cereus, Shigella flexneri* [1] et *Salmonella typhimurium* [30].

Comme évoqué précédemment, lors de l'inflammation, le NO réagit avec les dérivés réactifs de l'oxygène (ROS) présents dans le milieu et produit ainsi des oxydes d'azote très réactifs tels que l'ion peroxynitrite ($ONOO^-$) et le dioxyde d'hydrogène ($NO_2$). Ces composés créent un stress oxydant et nitrant qui est dirigé de façon non spécifique contre les cellules de l'hôte ou de l'agent infectant [31].

#### a. Réponse au stress NO

La réponse au stress bactérien peut être décrite en 4 étapes principales : détection du NO, signalisation, détoxification et réparation des dommages (Figure 8).

Ces mécanismes varient d'une espèce bactérienne à l'autre mais nous allons développer les plus conservés (*cf.* Annexe 1) [7].

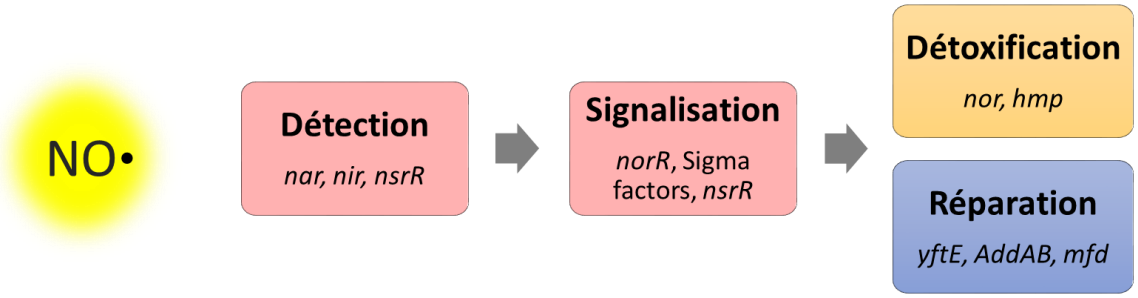



**Figure 8 : Quatre étapes de la réponse des bactéries au stress nitrogène**[7]
La bactérie détecte le NO avec des récepteurs ou des facteurs de transcription, comme le NsrR. Cette détection déclenche des voies de signalisation qui induisent l'expression de gènes impliqués dans la résistance au NO. Ces gènes codent pour des protéines de détoxication (NOR et HMP), de réparation des dommages (YftE) ou des voies de réparation de l'ADN.

### b. Mécanisme de détection du monoxyde d'azote

La première étape de réponse au stress nitrogène est de détecter le NO et les RNS, pour activer les voies de détoxification. En effet, l'expression des gènes de dénitrification est connue pour être activée par des dérivés de l'azote et une faible concentration en oxygène.

Chez la plupart des gamma et bêta protéobactéries, mais aussi chez certaines espèces à Gram positif comme *Bacillus subtilis*, on trouve le répresseur NsrR, qui était auparavant connu pour contrôler uniquement l'opéron de nitrite réductase. Chez *Nitrosomonas spp*, NsrR semble à présent, être le régulateur principal du métabolisme du NO. NsrR est un membre de la famille de régulateurs de transcription Rrf2. L'analyse et la comparaison des régions régulatrices des gènes de détoxification du NO a permis de proposer un motif potentiel de liaison de NsrR.

Le membre le plus conservé du régulon NsrR prédit est le gène *hmp* qui code pour la flavohémoglobine. Chez les entérobactéries, le régulon comprend également deux loci sensibles aux nitrites, *nipAB* (*hcp-hcr*) et *nipC* (*dnrN*). Les régulons de NsrR chez *Neisseria gonorrheae*, *E. coli*, *B. subtilis* comprennent les gènes *hmp*, *ytfE* ou *scdA* et *hcp* qui sont impliqués dans la détoxification et la réparation des dommages causés par le NO et aussi des gènes de dénitrification. En conséquence, il semble y avoir une interconnexion entre les différents systèmes de dénitrification et de détoxification des oxydes d'azotes [32].

Un autre facteur de transcription, NorR, est retrouvé chez les gamma- et bêta-protéobactéries. Il active l'expression des NO réductases (NorVW chez *E. coli*). Son activation dépend du facteur sigma-54. Trois sites activateurs, en amont des gènes qu'il régule, ont été identifiés comme des sites de liaison de NorR. L'analyse des régions adjacentes d'orthologues supplémentaires dans

les génomes bactériens a révélé des sites de liaison de NorR similaires en amont des gènes *norA* et *norB* pour les espèces de *Ralstonia*, *norVW* dans les espèces de *Salmonella*, *hmp* chez *Vibrio cholerae* et *Pseudomonas aeruginosa* et *hcp* dans *V. vulnificus*. Ces gènes codent pour des enzymes impliquées dans la détoxification du NO [33].

Chez les alpha- et bêta-protéobactéries, divers facteurs de transcription de la famille FNR ont été décrits comme des régulateurs de dénitrification sensibles au NO : appelés DNR dans les espèces de *Pseudomonas*, NNR ou NnrR dans d'autres espèces. Les protéines DNR, NNR et NnrR sont proches phylogénétiquement. FNR (fumarate and nitrate reductase) est un régulateur de l'anaérobiose chez les bactéries anaérobies facultatives. C'est un activateur qui possède un cluster Fer-Soufre sensible à l'oxygène et au NO [34]. Chez *E. coli*, il active, entre autre la production d'une pompe à efflux de nitrite (NarK ) [35].

Malgré cette diversité de systèmes de régulation, la compréhension de la régulation du métabolisme du NO et des RNS chez les bactéries est très limitée.

Par exemple, l'activation de l'expression des gènes de dénitrification en présence de NO a été décrite, mais les facteurs de transcription spécifiques impliqués dans ce contrôle ne sont pas encore connus [33].

### c. Réponse générale au stress

Il a été montré chez les Gram négatif que le NO induit l'activation de la réponse générale au stress par l'intermédiaire de sigma B. Celui-ci enclenche les mécanismes de résistance au stress nitrogène. En effet, il active la transcription de nombreux gènes qui vont agir en synergie pour résister aux dérivés de NO [36].

La réponse au stress peut être spécifique à un stress ou non. Elle inclut différentes voies de signalisation qui permettent de modifier le comportement de la bactérie pour répondre aux aléas environnementaux. Elle peut, par exemple, activer la sporulation ou la motilité pour résister à des conditions délétères. La mise en place de ces voies nécessite la détection du signal de stress puis l'activation de facteurs sigma [37].

Un facteur sigma (facteur σ) est un facteur d'initiation de la transcription bactérienne, qui permet une liaison spécifique de l'ARN polymérase (ARNP) aux promoteurs de gènes. Le facteur sigma spécifique utilisé pour initier la transcription d'un gène donné variera en fonction

du gène et des signaux environnementaux nécessaires pour initier la transcription de ce gène. La sélection des promoteurs par l'ARNP dépend du facteur sigma qui l'associe.

La réponse générale au stress (GSR pour General Stress Response) est caractérisée par des modifications massives de l'expression génique de la bactérie, afin de la protéger de façon non spécifique. La plupart du temps, cette réponse intervient dans les moments de stress nutritif, mais elle est aussi induite lors de stress oxydant ou nitrant. Elle nécessite l'activation de facteurs sigma alternatifs. Ces facteurs favorisent la fixation de l'ARNP au promoteur de gènes impliqués dans la réponse adaptative.

### d. Mécanisme de détoxification

Les méthodes de détoxification du NO chez les procaryotes sont très vastes. Par exemple, chez *E. coli*, on trouve trois protéines qui métabolisent le NO : la flavorubrédoxine (NorV), la flavohémoglobin (HmpA), et une pentahème nitrite reductase (NrfA) [38] [39].

Plus globalement, chez les bactéries, il existe deux familles d'enzymes qui métabolisent le NO dans le cytoplasme pour prévenir de sa toxicité. Il s'agit des NO réductases (Nor) et des NO dioxygénases.

#### Les NO réductases (Nor)

Ces enzymes réduisent le NO du cytoplasme et le transforment en composés moins toxiques ($N_2O$ et $N_2$). Ce mécanisme est conservé chez les bactéries dénitrifiantes de l'environnement. Elles catalysent également la réduction du nitrate en nitrite dans des conditions limitées en oxygène. Certaines souches pathogènes peuvent aussi contenir une NO réductase, ce qui est avantageux lors de l'infection, où les conditions sont limitées en oxygène ; cela confère une protection contre le stress nitrogène [40].

Trois réductases de NO ont été décrites à ce jour. La mieux décrite est la NORCB qui est un dimère lié à la membrane. Toutes les souches bactériennes trouvées avec cette NO réductase, désignées NORB, cNORB ou NOR à chaîne courte (scNOR), pourraient effectuer la

dénitrification. Une deuxième réductase possède une extension N-terminale codant pour le quinol. Cette réductase est appelée qNORB, NORZ ou NOR à longue chaîne (lcNOR). Le gène *qnorB* a été trouvé, à ce jour, chez les dénitrifiants et les souches non dénitrifiantes. Une troisième NO réductase, purifiée à partir de *Bacillus azotoformans,* utilise le ménaquinol comme accepteur d'électrons. Les gènes codant pour cette réduction de l'oxyde nitrique de ménaquinol sont jusqu'ici inconnus [40].

$$2\ NO + \text{ménaquinol} \rightleftharpoons N_2O + \text{ménaquinone} + H_2O$$

Les NO dioxygénases

Les NO dioxygénases sont une famille d'enzymes capable de détoxifier le cytoplasme bactérien du NO grâce à une série de réaction d'oxydoréduction. Elles possèdent un domaine de liaison au FAD (Flavine Adénine Dinucléotide) et un groupement hème.

Cette famille d'enzymes a deux fonctions : prévenir de la toxicité du NO, et réguler les voies de signalisation liées au NO. Elles existent chez de nombreuses espèces exposées au NO, chez les eucaryotes comme chez les procaryotes.

Chez *E. coli*, *B. cereus* et la plupart des bactéries, elle porte le nom de flavohémoglobine et est codée par le gène *hmp*. La transcription de ce gène est accrue par la présence de NO et de RNS. Ce gène est très conservé chez les bactéries.

Cette enzyme est capable de lier le NO avec une très forte affinité et de le convertir en nitrate en aérobie et en oxyde nitreux en anaérobie [10].

En aérobie :

$$\text{Hmp[Fe(II)]} + O_2 + 0.5\ \text{NADH} + \text{NO} \rightarrow \text{Hmp[Fe(III)]} + NO_3^- + 0.5\ NAD^+ + 0.5\ H^+$$

En anaérobie :

$$\text{Hmp[Fe(II)]} + 2H^+ + 0.5\ \text{NADH} + \text{NO} \rightarrow \text{Hmp[Fe(III)]} + N_2O + 0.5\ NAD^+$$

Il a été montré que les mutants *hmp* de *E. coli* et *S. enterica* étaient très sensibles au NO et au stress nitrogène [31] [41].

### e. Réparation des dommages

La résistance au stress nitrogène nécessite une étape de réparation des dommages causés aux protéines et aux acides nucléiques. La détection du NO par la bactérie induit l'activation de nombreux mécanismes de réparation.

#### Dommages aux protéines

Les stress nitrogène et oxydatif causent des dommages aux protéines. Ces dommages peuvent être létaux pour la bactérie. Les mécanismes de réparation des dommages aux protéines par le NO sont peu connus à ce jour. Le NO cible plus particulièrement les clusters Fer-soufre de certaines métalloprotéines.

La famille des RIC (repair iron center) est impliquée dans l'assemblage, l'insertion et la réparation de ces clusters. La protéine ScdA, qui appartient à cette famille, est une protéine très conservée chez les bactéries à Gram positif ou négatif. Cette protéine se nomme ScdA chez les firmicutes, YtfE chez *E. coli*, NorA chez *Ralstonia eutropha* et DnrN chez *Pseudomonas et Neisseria*. Ce sont des protéines binucléaires qui contiennent deux atomes de fer.

Chez *E. coli* et chez *S. aureus*, il a été mis en évidence que les souches dépourvues de ce gène montraient une sensibilité plus accrue au stress NO et une diminution d'activité de leurs protéines contenant des groupements fer-soufre [42]. L'expression *d'ytfE* chez *E. coli* est régulée négativement par FNR, NsrR et Fur et positivement par le stress nitrogène et le manque de fer. En effet, FNR et NsrR possède un cluster Fer-soufre ciblé par le NO. Ainsi le NO induit une dérepression de *ytfE* par FNR et NsrR [43] [32].

L'activation des protéines ScdA et YtfE par la présence de NO permet donc à la bactérie de réparer les dommages qu'il a causé aux protéines Fer-soufre. Ces protéines sont impliquées dans de nombreux mécanismes catalytiques, en particulier des processus d'oxydo-réduction. On peut citer notamment la nitrite réductase NirB qui possède un cluster $Fe_4S_4$. Elle est impliquée dans l'assimilation des nitrites et dans la détoxification du NO présent dans le cytoplasme. Ainsi, les RIC restaurent l'activité d'enzymes touchées par le NO, elles-mêmes impliquées dans la défense contre le NO [44].

Dommages aux acides nucléiques

Comme vu précédemment, le NO peut être responsable de lésion à l'ADN par ses intermédiaires d'oxydo-réduction ($N_2O_3$ et $ONOO^-$). Ces composés sont responsables de l'introduction de bases aberrantes dans la molécule d'ADN : de la xanthine (dX), de l'hypoxanthine (dHX) et de l'uracile (dU), de la 8-oxoguanine et des résidus 8-nitroguanine instables qui peuvent induire des mutations et des cassures des brins d'ADN.

Des systèmes de réparation entrent en jeu lorsque des lésions de l'ADN sont détectées. Ils ne sont pas spécifiques aux dommages causés par le stress nitrogène et ne sont pas nécessairement activés par la détection du NO. De nombreux autres facteurs ciblent les acides nucléiques et déclenchent les processus de réparation, tel que les UV, certains antibiotiques…

Trois voies sont impliquées dans les réparations des dommages à l'ADN : la voie NER (Nucleotide Excision Repair), la voie BER (Base Excision Repair) et la voie de réparation recombinante dépendant de RecBCD.

Il semble que seules les deux dernières soient impliquées dans la réparation des dommages liés au stress nitrogène[1].

- La voie de réparation d'excision de base (BER)

La voie de réparation d'excision de base (BER) s'est avérée jouer un rôle critique dans la défense contre les effets délétères du NO en remplaçant les bases anormales générées par le NO de la séquence d'ADN.

Les bases « anormales » (Le dU, la dX et la dHX) de l'ADN sont reconnues par des glycosylases spécifiques [45]. Ensuite, des endonucléases éliminent les bases marquées par glycosylation en coupant les liaisons N-glycosidiques des bases endommagées pour les libérer du squelette de l'ADN. Cette intervention génère donc un emplacement où une base est manquante. Un tel site est appelé site AP (site apurique/apyrimidique) [46]. Les sites AP résultant de l'élimination de la

base médiée par la glycosylase ne peuvent pas être utilisés directement par l'ADN polymérase. Ils doivent d'abord être traités par l'une des endonucléases AP [47]. Les endonucléases AP éliminent les sites AP pour donner un 3'OH adjacent à un 5'Phosphate. Ensuite, l'ADN polymérase remplace la base manquante.

Les cellules dépourvues d'activité endonucléase AP (comme *xth nfo*) se sont révélées très sensibles aux rayonnements ionisants, au stress oxydatif et au NO. Une étude montre que chez *E. coli* et *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*, le manque d'activité d'endonucléase AP, provoquait des lésions simples ou double brin, de l'ADN ; des lésions connues pour être toxiques pour la division cellulaire [48].

- La voie RecBC / AddAB

Outre les modifications des bases d'ADN, le stress nitrogène peut causer des cassures double brin (DSB pour *Double Strand Break*). RecBC chez *E. coli* ou AddAB chez *B. cereus* est un complexe protéique qui agit dans la réparation des DSB en se liant à l'extrémité double brin de l'ADN. Il répare la région lésée par recombinaison homologue en utilisant une deuxième molécule d'ADN comme trame.

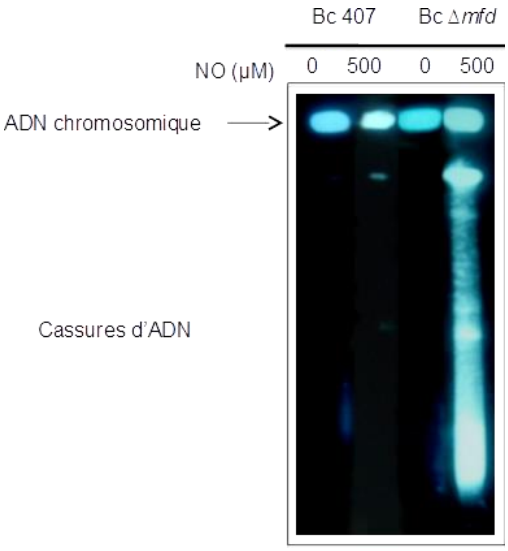



**Figure 9 : Observation de cassures de brin d'ADN in vitro par action du NO sur *Bacillus cereus* [1].**
Des souches mutantes de type sauvage et Δ*mfd* ont été traitées avec 500 µM de NO. L'ADN a été analysé par électrophorèse en champ pulsé. L'ADN chromosomique circulaire est bloqué

dans le puits de chargement, tandis que l'ADN linéaire migre à travers le gel. La dégradation de l'ADN est visible sous forme de colonne sous la bande d'ADN linéaire.

Une dégradation de la molécule d'ADN est observée chez le mutant Δ*mfd* de *Bacillus cereus* en présence de NO. La protéine Mfd est impliquée dans la réparation de l'ADN (Figure 9).

L'équipe du Dr Rama Rao a montré que Mfd était requis pour la résistance de *Bacillus cereus* au stress nitrogène et que cette résistance était également altérée chez le mutant Δ*addAB*. Mfd confère donc une résistance au NO en réparant les dommages à l'ADN causés par le NO [1].

### f. Mutation Frequency Decline (Mfd)

La protéine Mfd (pour Mutation Frequency Decline) est une grosse protéine de 130kDa à fonction ATPasique, très conservée chez les bactéries. Elle a été découverte chez *E. coli* et est codée par le gène *trcf* (Transcription Repair Coupling Factor) [49].

Elle porte le nom de Trcf car elle permet la reprise de la transcription en induisant la réparation de l'ADN. Lors de la transcription, l'ARNP se lie à l'ADN et avance base par base pour synthétiser les ARN. Lors d'une cassure du brin d'ADN, l'ARNP se retrouve bloquée au site de cassure et ne peut plus transcrire. Mfd repère l'enzyme bloquée et la libère de l'ADN avec son transcrit tronqué. Alors elle recrute la protéine UvrA au site de coupure de l'ADN et induit la réparation grâce à la voie NER (nucléotide excision repair) (Figure 10).

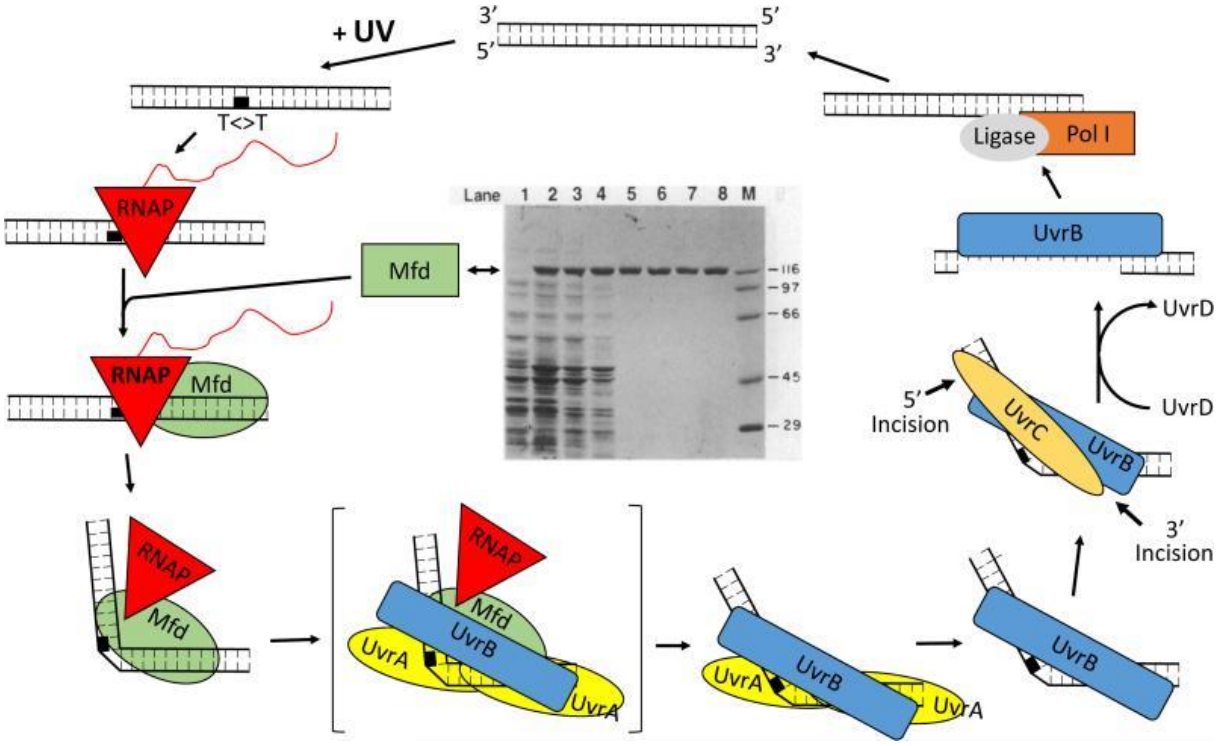



**Figure 10 : Modèle de couplage transcription-réparation (TRC) chez E. coli [50].**
Mfd dans son état inactif « fermé » (rectangle) devient actif « ouvert » (ovale) après la liaison à la RNAP bloquée par une lésion de brin modèle. L'état actif Mfd présente une activité ATPase plus élevée, se lie avec une affinité plus élevée à l'ADN et présente une activité translocase. Lors de la liaison à la RNAP, l'ARN est dissocié de la matrice par Mfd, la RNAP reste attachée à Mfd. Dans cette conformation, Mfd se lie fortement au complexe de reconnaissance des dommages UvrA-UvrB. La liaison d'UvrA-UvrB à Mfd entraîne la dissociation de Mfd et de la RNAP. UvrA-UvrB sont alors recrutés au site du dommage pour la réparation.

Cette enzyme a une séquence de 1148 acides aminés qui consiste en un arrangement de domaines liés par des « linker » longs et flexibles. Il y a un domaine dans région N-terminale qui interagit avec UvrA, dans la région centrale il y a un domaine d'interaction avec la RNAP et un avec l'ADN. La partie C-terminale possède un site de la famille des hélicases et un site de fixation à l'ATP de la Sous-famille RecG (Figure 11). Son activité ATPasique est nécessaire pour la libération de l'ARN polymérase bloquée (Figure 10). L'activité est régulée par un passage conformationnel d'un état fermé dormant à un état ouvert actif [51].

Plus récemment, il a été montré que Mfd libère la RNAP bloquées pendant le métabolisme normal, en l'absence de dommages à l'ADN. Mfd joue un rôle de ménage essentiel dans la régulation de la transcription pendant la croissance normale[186]. Lors de l'élongation de la transcription de mauvaises incorporations de nucléotides, des événements de pause ou de décrochage et des collisions entre les protéines se produisent[188]. Ces événements peuvent

conduire à des complexes d'élongation de la transcription (TEC) entrant dans des états non productifs qui se retrouvent bloqués sur l'ADN. En tant que complexes très stables, les TEC défaillants peuvent menacer la survie des cellules. Des études récentes ont mis en évidence le rôle de Mfd lors des collisions entre les complexes de transcription et de réplication, qui sont une cause intrinsèque majeure de l'instabilité du génome[190].Ces collisions sont inévitables car les mécanismes de transcription et de réplication partagent la même matrice d'ADN. Mfd peut faciliter l'élimination de RNAP avant une fourche de réplication *in vitro*, permettant à la réplication de continuer sans entrave[189] et de réduire les cassures double brin qui peuvent arriver en cas de collisions [190]. Mfd aide à résoudre ces conflits.

Elle possède une activité translocase, ce qui lui permet de se déplacer de manière autonome sur l'ADN pour repérer les RNAP bloquées. Elle peut alors agir soit en facilitant la reprise de la transcription en débloquant les complexes protéiques soit en mettant fin à la transcription[187].

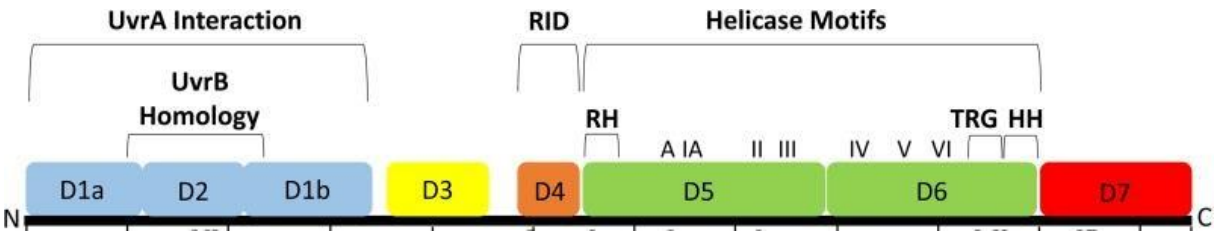



**Figure 11 : Domaines structurels et fonctionnels de Mfd [50].**
La protéine Mfd de 1148 acides aminés est composés de 8 domaines D1a, D1b, D2-D7 : une région d'homologie de séquence avec UvrB, le domaine d'interaction ARN polymérase (RID), la région des motifs d'hélicase où il y a une homologie avec RecG, la translocase (TRG), deux hélices (RH et HH). D3 est un domaine à fonction inconnue et D7 sert à maintenir la protéine dans une conformation (ouverte ou fermée).

L'équipe de Dr Rama Rao a mis en évidence une perte de virulence du mutant déficient en *mfd* de *B. cereus*. Cette perte de virulence était due à la perte de résistance au stress NO de la bactérie. En effet, ils ont montré que Mfd était nécessaire à la réparation des lésions à l'ADN causé par le NO.

Une étude du mutant *uvrA* montre que dans le cas des dommages induits par NO, l'implication de Mfd semble indépendante d'UvrA. Il est possible que l'action protectrice de Mfd, indépendante de NER, soit d'empêcher les ruptures de l'ADN associées à l'ARNP. En effet, il peut arriver que des collisions entre les complexes d'élongation aboutissent à des ruptures

double brin (DSB) et que Mfd répare les dommages d'ADN en libérant les RNAP arrêtées. Une autre hypothèse est que Mfd utilise normalement UvrA, mais sans elle, Mfd utilise un mécanisme alternatif, cachant le phénotype dans le mutant Δ*uvrA* [1].

D'autres fonctions de Mfd ont été plus récemment mises en évidence. En effet, Kamarthapu *et al.* a montré que la surexpression de Mfd sensibilisait également les cellules aux dommages à l'ADN [52]. De plus, même si Mfd est connue pour promouvoir la réparation de l'ADN, il augmente paradoxalement la mutagenèse de certaines régions de l'ADN et dans certains contextes, telle que la phase stationnaire [53] [54]. Ces résultats peuvent être interprétés par le fait que Mfd peut effectivement inhiber la réparation de l'ADN dans certains cas ou qu'elle peut favoriser une réparation « mutagène » de l'ADN[55] [56].

Ragheb *et al*. ont montrés que le Mfd favorise la mutagenèse chez les bactéries à la fois pendant la croissance en laboratoire et pendant l'infection des cellules eucaryotes. Cela accélère le développement de résistance antimicrobienne sur plusieurs classes d'antibiotiques. Mfd favorise « l'hypermutation », un mécanisme important connu pour diriger le développement rapide de résistances, hautement conservé entre les bactéries [57].

### g. Autre mécanisme de résistance au stress nitrogène

Un mécanisme original de résistance au stress NO des macrophages a été découvert chez *Salmonella typhimurium*.

Ce pathogène de la souris produit un système de sécrétion de protéines de type III codé par l'îlot de pathogénicité SPI2. Ce locus est nécessaire à la virulence de *S. typhimurium*, à sa survie et sa multiplication dans les macrophages de la souris.

L'équipe de Chakravortty *et al.* a étudié l'effet d'infection par *S. typhimurium* sur l'activité des macrophages. Grâce à la microscopie par immunofluorescence, ils ont pu observer que SPI2 pouvait modifier la localisation de la NOS2 dans les macrophages.

Ils ont observé une colocalisation de la NOS2 avec des bactéries déficientes en SPI2 mais pas chez des *Salmonella* sauvages. Cela suggère que le système SPI2 interfère avec la localisation de la NOS2 pour l'éloigner de la bactérie.

De plus, la localisation des résidus de nitrotyrosine à proximité de la bactérie a été observée pour les souches mutantes SPI2 mais pas pour les Salmonelles sauvages. Comme la

nitrotyrosine est un témoin de l'action du peroxynitrite, cela indique qu'il est exclu des vacuoles contenant *Salmonella* par action de SPI2.

Enfin, le défaut d'infection systémique d'une souche mutante SPI2 a été partiellement restauré chez les souris NOS2 (- / -) [58].

## 4. Conclusion : les voies de défense des bactéries contre le NO

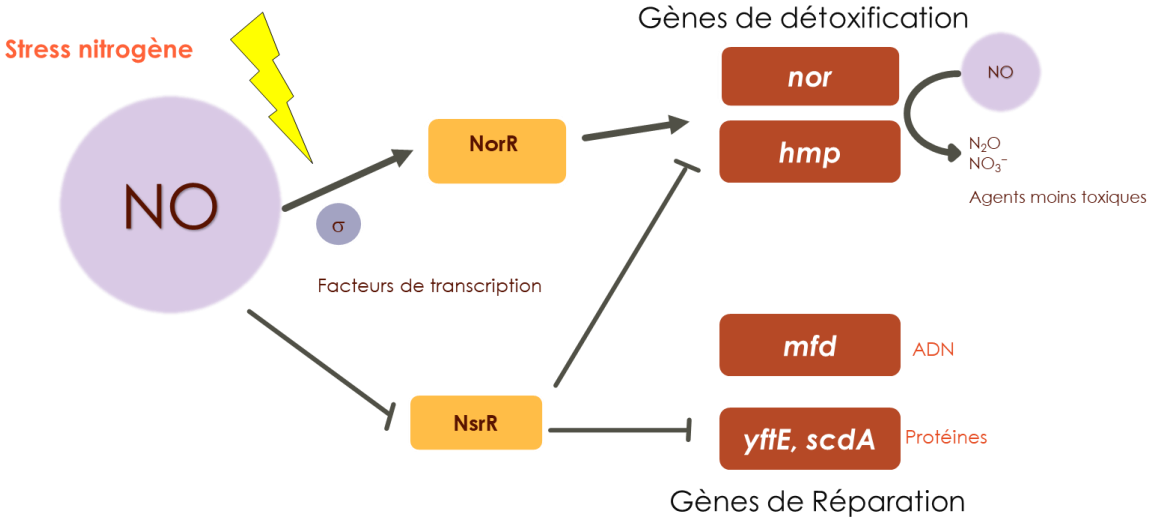



**Figure 12 : Voies de défense des bactéries contre le NO**
La défense contre le NO est en trois étapes : détection, détoxification et réparation des dommages. Des facteurs de transcription sont directement activés par le NO ou indirectement avec l'intervention de facteur sigma. Ces facteurs activent les voies de réponse au stress NO. On peut citer notamment le facteur NorR qui induit l'expression de gènes de détoxification (*nor* et *hmp*). NsrR est un facteur répresseur des gènes de la réponse et le NO lève cette inhibition. Les gènes de détoxification transforment le NO cytoplasmique en agents moins toxiques (nitrates ou protoxyde d'azote) et les gènes de réparation réparent les dommages causés par le NO.

La réponse au NO permet donc à certaines bactéries pathogènes de résister et d'infecter l'hôte. Elle nécessite une étape de détection du NO puis l'activation des gènes de détoxification et de réparation par des facteurs de transcription (Figure 12). Une partie de ces mécanismes sont documentés mais il existe encore des inconnues, en particulier chez les germes à Gram positif. Par exemple, chez *S. aureus* il n'y a pas de régulateurs NsrR [59] et chez *B. cereus*, il n'y a ni NsrR ni NorR. On peut se demander comment la réponse au stress nitrogène est régulée dans

ces cas particuliers. Connaitre ces voies est important pour la compréhension générale de la pathogénèse de certaines bactéries, notamment celles qui se retrouvent en contact avec le système immunitaire inné lors de l'infection. La bactérie modèle du laboratoire pour l'étude de ces mécanismes est *Bacillus cereus.*

## II. Bactérie modèle : *Bacillus cereus*

### A. Le groupe *Bacillus cereus*

Le groupe *B. cereus* appartient à l'embranchement des *Firmicutes,* à la classe des *Bacilli,* à l'ordre des *Bacillales,* à la famille des *Bacillaceae* et au genre *Bacillus.* Le groupe *Bacillus cereus* (groupe *B. cereus*) est composé de huit espèces : *B. mycoïdes*, *B. pseudomycoïdes*, *B. weihenstephanensis*, *B. anthracis*, *B. thuringiensis*, *B. cereus sensu stricto* (*B. cereus*), *B. cytotoxicus* et *B. toyonensis.* Ces bactéries sont ubiquitaires et présentes dans le sol, les aliments, chez les insectes et les mammifères[60]. L'hôte est infecté par une blessure ou par ingestion d'aliments contaminés par des spores ou des bactéries végétatives.
Les bactéries du groupe *B. cereus* sont sporulantes, à Gram positif, aérobies ou anaérobies facultatives [61].

La forme végétative est active métaboliquement, et lorsque les conditions environnementales deviennent défavorables la bactérie peut entrer en sporulation. Les spores sont des formes dormantes, métaboliquement inactives. Elles peuvent retourner à l'état végétatif après germination quand les conditions redeviennent favorables.
La forme sporulée de *Bacillus cereus* favorise sa dissémination dans l'environnement. C'est une forme très résistante à la dessiccation, aux radiations, à la chaleur, aux désinfectants et aux antibiotiques [62].

À l'origine, les espèces du groupe ont été classées sur la base de différences phénotypiques, de propriétés de pathogénies distinctes et la présence d'éléments extrachromosomiques qui reflètent le spectre de virulence des espèces. *B. mycoides* et *B. pseudomycoides* se caractérisent par des colonies rhizoïdes[205]. *B. weihenstephanensis* regroupe des bactéries psychrotrophes capables de se développer à des températures inférieures à 7°C Ces trois espèces sont connu comme des bactéries d'altération de denrées alimentaires[206] Les souches

de *B. thuringiensis* produisent une inclusion cristalline formée de toxines actives sur une grande variété d'insectes [207]. Les souches des espèces *B. cytotoxicus* et *B. cereus* sont associées à des toxi-infections alimentaires. *B. cytotoxicus* peut être différencié des autres membres du groupe par une croissance maximale à 50°C, une croissance minimale à 20°C, l'absence d'hydrolyse de l'amidon et l'absence de croissance sur des milieux synthétiques sans tryptophane[60]. *B. anthracis*, l'agent de la maladie du charbon, possède des facteurs portés par des plasmides spécifiques (pXO1 et pXO2) qui sont responsables de son caractère pathogène vis-à-vis des mammifères. Toutes les souches du groupe *B. cereus* qui ne possèdent pas un de ces éléments distinctifs, que ce soit morphologique, phénotypique, la production de toxines spécifiques ou la présence de gènes de virulence plasmidiques, sont considérées comme des souches de l'espèce *B. cereus*. De nouvelles espèces ont néanmoins été décrites récemment, comme *B. toyonensis* et *B. wiedmannii* [208] [209].

Cependant, la différenciation des espèces au sein du groupe *B. cereus* est complexe et la proximité génétique entre les membres du groupe est si étroite que tous les *Bacillus* du groupe pourraient être considérés comme une seule espèce[87]. La classification des espèces du groupe *B. cereus* est encore débattue

De nos jours, les stratégies utilisées pour établir une classification phylogénétique des souches reposent sur des analyses moléculaires basées sur des hybridations ADN-ADN et sur la comparaison des séquences d'ADN ribosomiques (ADNr)[210].

D'une façon générale, toutes ces études suggèrent que les différentes souches du groupe *B. cereus* présentent un haut niveau de similarité génétique ce qui ne permet pas de distinguer les espèces entre elles et conduit parfois à une identification erronée.

Pour l'étude de *Bacillus cereus*, il existe plusieurs bactéries modèles utilisées en laboratoire, nous pouvons citer *Bacillus cereus* ATCC 14579, isolée aux Etats-Unis en 1916. Au laboratoire, la souche Bc407 aussi appelée Bt407 *cry*- est utilisée comme modèle, c'est un *B. thuringensis* qui a perdu sa toxine Cry. Son génome contenant 6582 gènes répartis sur un chromosome et 9 plasmides a été séquencé en 2012. Il possède un % de GC bas de 34,9[211].

### B. Toxines et facteurs de virulence

La pénétration de *B. cereus* dans l'organisme enclenche la réponse immunitaire et le processus inflammatoire. Cette bactérie possède de nombreux de facteurs de virulence qui lui permettent de résister à cette réponse[74].

Elle possède des toxines, des gènes impliqués dans la colonisation et dans l'échappement au système immunitaire.

Ces gènes sont chromosomiques ou plasmidiques. Parmi ces facteurs de virulence les plus décrits, il y a le céréulide, les entérotoxines Nhe et Hbl, les « pore forming toxins » CytK et HlyII, les phospholipases PI-PLC, PC-PLC et SM-PLC, et les protéases InhA1 et NprA.

1. Le céréulide

Le céréulide, responsable du syndrome émétique de *B. cereus* est un petit polypeptide cyclique de 12 acides aminés codé par le gène *ces* chez les « souches émétiques » [63].

Le céréulide est très résistant à la température (121°C pendant 15 min), au pH acide, aux protéases intestinales [64]. Le céréulide est un ionophore de potassium et permet son transport à travers les membranes. Par ce transport, il cause le gonflement des mitochondries. Il induit alors l'apoptose des cellules par inhibition des mitochondries [66], en particulier les cellules hépatiques [67] et les cellules NK de la réponse immunitaire [68]. C'est pourquoi certaines infections à *B. cereus* peuvent entrainer la mort par insuffisance hépatique aigüe. Les vomissements sont dus à la fixation du céréulide sur des récepteurs du nerf vague [65].

2. Les entérotoxines

Le syndrome diarrhéique causé par *B. cereus* est associé à l'action d'entérotoxines, telles que l'entérotoxine non hémolytique (Nhe) qui sont produites par les cellules végétatives à l'intérieur de l'intestin grêle humain. La toxine Nhe (Non Haemolytic Enterotoxin) se compose de trois sous-unités, NheA, NheB, et NheC [70].

L'hémolysine BL (Hbl) est une autre entérotoxine composée de trois sous unités, B, L1 et L2 codées respectivement par les gènes *hblA*, *hblD*, et *hblC*, [69].

Les entérotoxines sont toxiques pour de nombreux types de cellules (intestinales, sanguines, rénales…) [71]. Elles engendrent une lyse osmotique par la formation de pores transmembranaires[72].

3. Les « pore forming toxins »

La cytotoxine K (CytK) est également produit par *B. cereus* au niveau de l'intestin grêle et est impliquée dans le syndrome diarrhéique. Elle crée un canal ionique transmembranaire qui induit une lyse cellulaire.
Il existe deux variants de la cytotoxine K : CytK-1 et CytK-2. Elles sont responsables d'entérites nécrotiques graves [73].

L'hémolysine II (HlyII) une toxine proche de CytK, qui peut se fixer sur la membrane de différents types cellulaires pour induire leur lyse : érythrocytes, des cellules neuronales, épithéliales, des macrophages, des monocytes et cellules dendritiques [74] [194].
HlyII forme des pores transmembranaires heptamériques dans les érythrocytes et les membranes[195]. La mort cellulaire se produit en deux étapes : HlyII se lie aux cellules dendritiques et / ou aux macrophages et induit la formation d'un pore, conduisant à une perméabilité transitoire de la membrane[194]. La formation de ce pore conduit finalement à l'induction la mort cellulaire par apoptose. Le fer et le glucose régulent l'expression du gène *hlyII*, en activant respectivement les régulateurs Fur et HlyIIR[196].
La capacité de HlyII à tuer les macrophages peut expliquer la persistance et la dissémination de *B. cereus* dans l'hôte. L'induction de l'apoptose par *B. cereus* endommage les tissus et compromet la réponse immunitaire antimicrobienne, favorisant ainsi la propagation bactérienne et induisant les signes et symptômes de la maladie.

4. Les phospholipases

*B. cereus* produit trois phospholipases C qui sont impliquées dans la dégradation des tissus : la phosphatidylinositol phospholipase C (PI-PLC), la phosphatidylcholine phospholipase C (PC-PLC) et la sphingomyélinase (SM-PLC). Ces deux dernières sont actives séparément mais peuvent également s'associer, donnant naissance à la céréolysine AB, qui a une activité hémolytique[75]. PI-PLC pourrait affaiblir la réponse immunitaire de l'hôte en inhibant l'activation des cellules dendritiques via les Toll Like Receptors et ainsi réduire l'induction de la voie des MAPKs (Mitogen-activated protein kinases) ou de la synthèse de TNF-α (Tumor Necrosis Factor-alpha). PI-PLC limiterait également la prolifération des lymphocytes T auxiliaires [76].

5. Les protéases

Les protéases sont des agents impliqués de façon importante dans la virulence bactérienne. Ces protéases peuvent jouer des rôles très variés tels que l'activation des toxines, la lyse des protéines de structure, la protection contre le système immunitaire et l'interférence avec la signalisation cellulaire [77]. *B. cereus* exprime une cinquantaine de protéases. Les deux protéases majeures produites par *B. cereus* sont NprA et InhA1[78].

InhA1 est une métalloprotéase à zinc. Lorsqu'elle est sécrétée, elle hydrolyse des peptides antimicrobiens, tels que les attacines et les cécropines ce qui interfère avec les défenses immunitaires de l'hôte [200]. InhA1 est présent à la surface de la spore de *B. cereus* lui permettant de s'échapper des macrophages[201]. InhA1 a également la capacité de dégrader des protéines de la matrice extracellulaire telles que le collagène et la caséine, et pourrait interférer avec la coagulation sanguine en favorisant la fibrinolyse[202]. Ces propriétés favorisent la pénétration de *B. cereus*, sa survie dans l'organisme et son accès aux tissus plus profonds[203].

NprA (Neutral protease A) est aussi une métalloprotéase. C'est une protéase « thermolysin-like » de la famille des peptidase M4[204]. Elle joue un rôle dans la virulence de *B. cereus* en clivant des composants tissulaires tels que l'élastine et la fibronectine et les protéines impliquées dans la coagulation sanguine (plasminogène et fibrinogène)[202].

### 6. Autres propriétés impliquées dans la virulence

D'autres propriétés peuvent supporter le pouvoir pathogène de *B. cereus* par une action indirecte et non toxinique. Il peut s'agir de la mobilité de la bactérie, de sa capacité d'adaptation à l'environnement. En effet, Bacillus a la capacité de former des spores résistantes à de nombreux stress ou à se défendre dans des situations de compétitions microbiennes.

De plus, des études montrent que les flagelles peuvent être associés à la sécrétion des toxines diarrhéiques pendant la phase de croissance bactérienne [198]. Par exemple, les entérotoxines Nhe, Hbl et CytK possèdent un peptide signal Sec-type et sont sécrétées par la voie de translocation Sec. Elles sont liées à l'appareil d'exportation du flagelle par des mécanismes de régulation de sécrétion[197]. Chez *B. thuringiensis* également, le gène *flhA* est impliqué à la fois dans l'export de la flagelline et de l'entérotoxine *Hbl*, lui conférant ses capacités de motilité, hémolytiques et d'adhérence[198]. Le gène *fliY,* codant une protéine flagellaire impliquée dans

le contrôle de la motilité et dans la régulation du phénomène de chimiotaxie, est indispensable pour la sécrétion de la sous unité L2 de la toxine Hbl chez *B. cereus* [199].

### 7. Régulation de l'expression des facteurs de virulence de *B. cereus*

L'expression de la plupart des facteurs de virulence décrits précédemment est régulée par un régulateur transcriptionnel PlcR (Phospholipase C Regulator). C'est le cas des toxines diarrhéiques Nhe et Hbl, de CytK, des phospholipases PI-PLC, PC-PLC et SM-PLC, de la métalloprotéase InhA2 et de plusieurs bactériocines[79]. PlcR est ainsi reconnu comme le régulateur majeur de la virulence de *B. cereus*. Son régulon compte au total 45 gènes, dispersés sur le chromosome [80].

NprR est un autre régulateur de la famille RNPP important chez *B. cereus,* son régulon contient de nombreux gènes codant des enzymes de dégradation : protéases, estérases, lipases… [81].

Spo0A est un régulateur transcriptionnel pléiotrope présent chez toutes les bactéries sporulantes connues [82]. Il y est qualifié de « régulateur global » car les régulons et les différenciations sous son contrôle sont nombreux. Chez *B. subtilis,* il influence la transcription de plus de 500 gènes, dont 121 contrôlés directement par Spo0A [83].
Les expressions du céréulide et de InhA1 sont régulées par Spo0A et AbrB [84].
De plus, de nombreux facteurs environnementaux peuvent influencer l'expression des gènes de virulence de *B. cereus*. Il peut s'agir de la température, des conditions environnementales, du pH ou de la disponibilité en nutriment, en oxygène et en fer dans le milieu.
Le fer est une ressource cruciale pour la multiplication des bactéries et dans leur capacité à coloniser l'hôte. L'homéostasie du fer est assurée par une régulation fine des systèmes d'acquisition et de métabolisme du fer [85] (Figure 13).

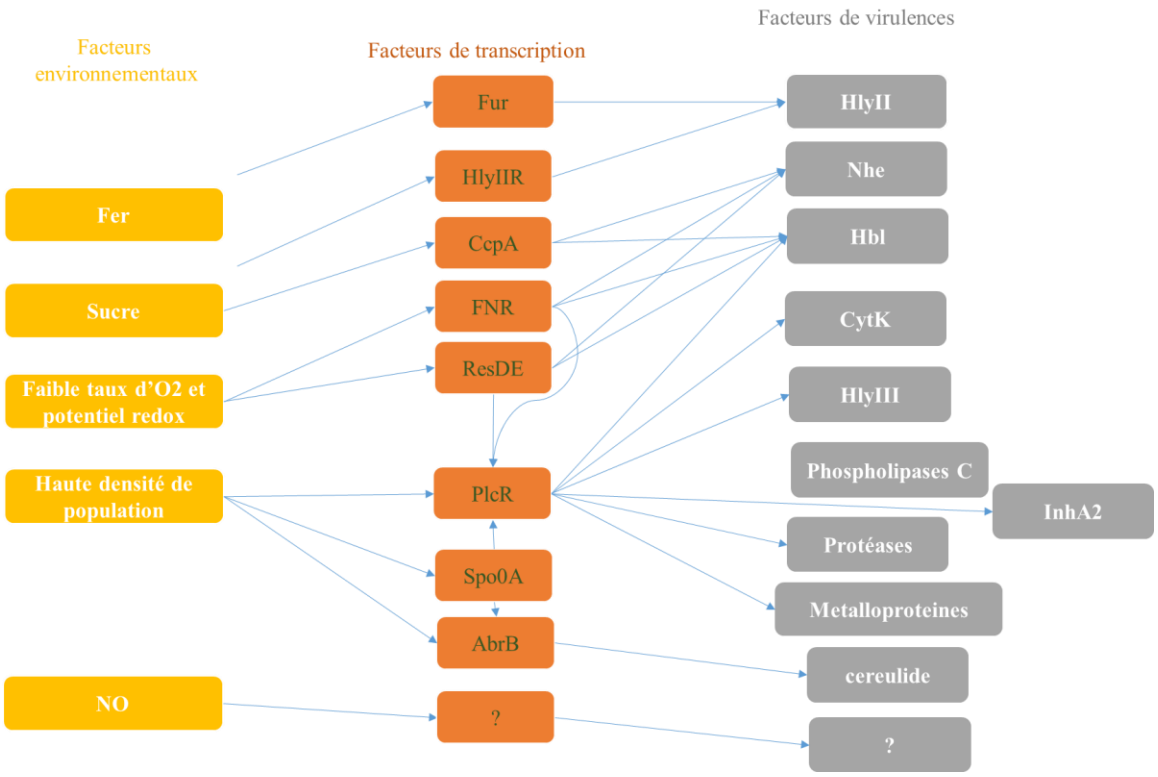



**Figure 13 : Régulation de la transcription des gènes codants pour les facteurs de virulence de *B. cereus***
Les facteurs de virulence de *B. cereus* sont le plus souvent régulés par des facteurs de transcriptions qui sont influencés par l'environnement de la bactérie. L'influence transcriptionnelle du NO est inconnue à l'heure actuelle.

Le potentiel redox du milieu influence également l'expression de nombreux facteurs de virulence [86]. Lors de la réponse immunitaire innée, ce potentiel est modifié par la sécrétion massive de composés oxydants tels que le superoxyde et le NO.
L'influence du NO sur la régulation génique de *B. cereus* est pour le moment inconnue.

A ce jour il existe peu d'étude transcriptomique sur *Bacillus cereus*. Sur la base de données du ncbi on peut trouver 38 projets. La plupart de ces projets sont effectuée sur la souche *B. cereus* ATCC 14579 et aucun sur Bt407.

Notamment, l'équipe de Ceragioli a analysé les réponses physiologiques et transcriptionnelles de *Bacillus cereus* ATCC 14579 exposées à quatre désinfectants différents (chlorure de benzalkonium, hypochlorite de sodium, peroxyde d'hydrogène et acide peracétique). Pour chaque désinfectant, les concentrations entraînant l'atténuation de la croissance, l'arrêt de la croissance et la mort cellulaire ont été déterminées. L'analyse du transcriptome a révélé que *B. cereus*, lors de l'exposition aux concentrations sélectionnées de désinfectants, induisait des

réponses communes et spécifiques. Notamment, la réponse commune comprenait des gènes impliqués dans les réponses au stress général et oxydatif. L'exposition au chlorure de benzalkonium, un désinfectant connu pour induire des dommages aux membranes, a spécifiquement induit des gènes impliqués dans le métabolisme des acides gras. L'exposition à l'hypochlorite de sodium, qui est un agent oxydant, a induit l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme du soufre et des acides aminés soufrés, qui étaient en corrélation avec l'oxydation excessive des groupes sulfhydryle observée dans les cellules stressées par l'hypochlorite de sodium. Les expositions au peroxyde d'hydrogène et à l'acide peracétique ont induit des réponses très similaires, y compris la régulation positive des gènes impliqués dans la réparation des dommages à l'ADN et la réponse SOS[212].

L'équipe de Mols quant à elle a étudié la réponse de *B. cereus* au stress acide. Lors de l'infection, les cellules de *B. cereus* doivent survivre au faible pH de l'estomac humain. Par conséquent, la résistance aux acides est un paramètre clé du potentiel pathogène des souches entérotoxiques de *B. cereus*. Premièrement, la grande résistance des spores leur permet de passer dans l'estomac sans être affectées. La germination dans l'environnement acide de l'intestin grêle est un aspect important de leur potentiel pathogène. *B. cereus* peut également être exposé à des conditions acides dans certains aliments et dans des niches écologiques telles que le sol.

Des analyses comparatives du transcriptome ont révélé que le stress acide (pH5,4 à pH 4,4 avec du HCl) induisait la réponse générale au stress avec une composante oxydante majeure, y compris une régulation positive des catalases et des superoxyde dismutases. Une analyse par cytométrie en flux combinée avec des sondes fluorescentes spécifiques à l'hydroxyle (OH •) et au peroxynitrite (ONOO -) a montré que des radicaux libres se sont formés. Ces radicaux peuvent indiquer un dysfonctionnement des processus cellulaires induit par l'acide qui conduisent à la mort cellulaire[213].

### C. La pathogénicité du groupe *B. cereus*

La différenciation des espèces au sein du groupe *B. cereus* est complexe et la proximité génétique entre les membres du groupe est si étroite que, d'un point de vue phylogénétique, la

classification des espèces qui le composent est encore débattue, si bien que tous les *Bacillus* du groupe pourraient être considérés comme une seule et même espèce[87].

À l'origine, les espèces du groupe ont été classées sur la base de différences phénotypiques. Les souches de *B. thuringiensis* produisent un cristal formé de toxines le rendant pathogène pour de nombreux insectes, c'est pourquoi il est souvent utilisé comme bioinsecticide [88]. *B. anthracis*, l'agent de l'anthrax ou maladie du charbon, possède des facteurs de virulence portés par les plasmides pXO1 et pXO2. C'est un agent pathogène de classe 3 (il donne une pathologie grave et contagieuse mais il existe un traitement ou une prophylaxie (INRS)) capable d'engendrer des infections intestinales, cutanées et pulmonaires chez les mammifères et en particulier chez l'homme[89].
Les souches des espèces *B. cytotoxicus et B. cereus* sont associées à des toxi-infections alimentaires.

1. Infections gastro-intestinales

*B. cereus sensus stricto, B. cytotoxicus* peuvent être responsables de toxi-infections alimentaires collectives (TIAC) chez l'homme en provoquant des infections gastro-intestinales. Elles sont définies par l'apparition d'au moins deux cas d'infection gastro-intestinale présentant les mêmes symptômes avec la même origine alimentaire. En France, les TIAC sont à déclaration obligatoire (DO) [174].
Les infections gastro intestinales à *B. cereus* peuvent causer soit un syndrome diarrhéique avec une production de toxine par les bactéries végétatives dans l'intestin soit un syndrome émétique ou la toxine responsable des symptômes est déjà présent dans l'aliment avant l'ingestion. Cette toxine cause nausées et vomissements très rapidement (entre 30 minutes et 6 h). Ces infections à *B. cereus* sont souvent bénignes avec une résolution sans traitement en 24 heures. Cependant, certains cas de décès ont été rapportés [176] [172].
En France, *B. cereus* était la quatrième cause de TIAC en 2005. En 2014, *B. cereus* est devenu la seconde cause de TIAC en France, après S. *aureus* et suivi de *C. perfringens* et *Salmonella*[192].

2. Infections non gastro-intestinales

*B. cereus* est aussi un pathogène opportuniste émergent responsable d'infection non gastro-intestinale. Elles sont plus rares mais plus graves.

*B. cereus* est à l'origine d'infection locale, des yeux (endophtalmies), de la mâchoire (parodontites), du système nerveux central ou du cœur [90 87 91 92].
Il peut provoquer également des septicémies graves notamment chez les nouveaux nés prématurés[93].

Ces pathologies démontrent que *B. cereus* est un pathogène à part entière. Lors de l'infection il induit une réaction inflammatoire et peut contourner les défenses immunitaires de l'hôte grâce à de nombreux facteurs de virulence

### 3. Prise en charges des infections à *B. cereus*

Il n'y a pas de recommandation spécifique des toxi-infections à *B. cereus*. Il y a seulement des recommandations aux consommateurs en terme d'hygiène domestique : Le nettoyage des légumes afin d'éliminer la terre, le nettoyage des surfaces, du réfrigérateur et des ustensiles de cuisine réduisent la contamination des aliments par des spores. Les aliments cuits (comme les pates ou le riz) doivent être refroidis et placés sans délai au réfrigérateur s'ils ne sont pas consommés immédiatement. De même pour les plats cuisinés ou salades mélangées, etc. conservés plusieurs heures à température ambiante (par exemple, restes de pique-nique) doivent être jetés et ne pas être consommés, même s'ils sont cuits de nouveau[193].
Dans le cadre d'infection grave à *B. cereus*, un traitement empirique peut être nécessaire, en attendant les résultats d'un antibiogramme. *B. cereus* possède des résistances naturelles aux pénicillines par la production de β-lactamases. *B. cereus* est sensible au linézolide, à l'acide fusidique ou à la fosfomycine couramment utilisés contre les Gram positif [173 175]. Malgré l'apparition de résistances à l'érythromycine, à la tétracycline et aux carbapénèmes [94], *B. cereus* est une bactérie qui répond bien au traitement antibiotique.

Ainsi, *B. cereus* est capable de résister aux défenses immunitaires de l'hôte grâce à un arsenal de facteurs de virulence bien décrit dans la littérature. Cependant, les mécanismes lui permettant de résister à la réponse nitrogène de l'hôte sont encore peu connus. C'est pourquoi il est un bon modèle pour l'étude de cette fonction.
L'étude de cette bactérie a permis à l'équipe du Dr Rama Rao de mettre en évidence Mfd en tant que facteur impliqué dans la réponse au stress NO chez *B. cereus*[1], puis en tant que cible d'un antibiotique potentiel. Cependant, *B. cereus* n'est pas une bactérie problématique en termes de résistance aux antibiotiques. C'est pourquoi, il est important d'utiliser également

d'autres modèles bactériens qui ont un réel impact de santé publique en termes de résistance aux antibiotiques.

## III. Les antibiotiques

### A. Histoire : Découvertes et mises au point

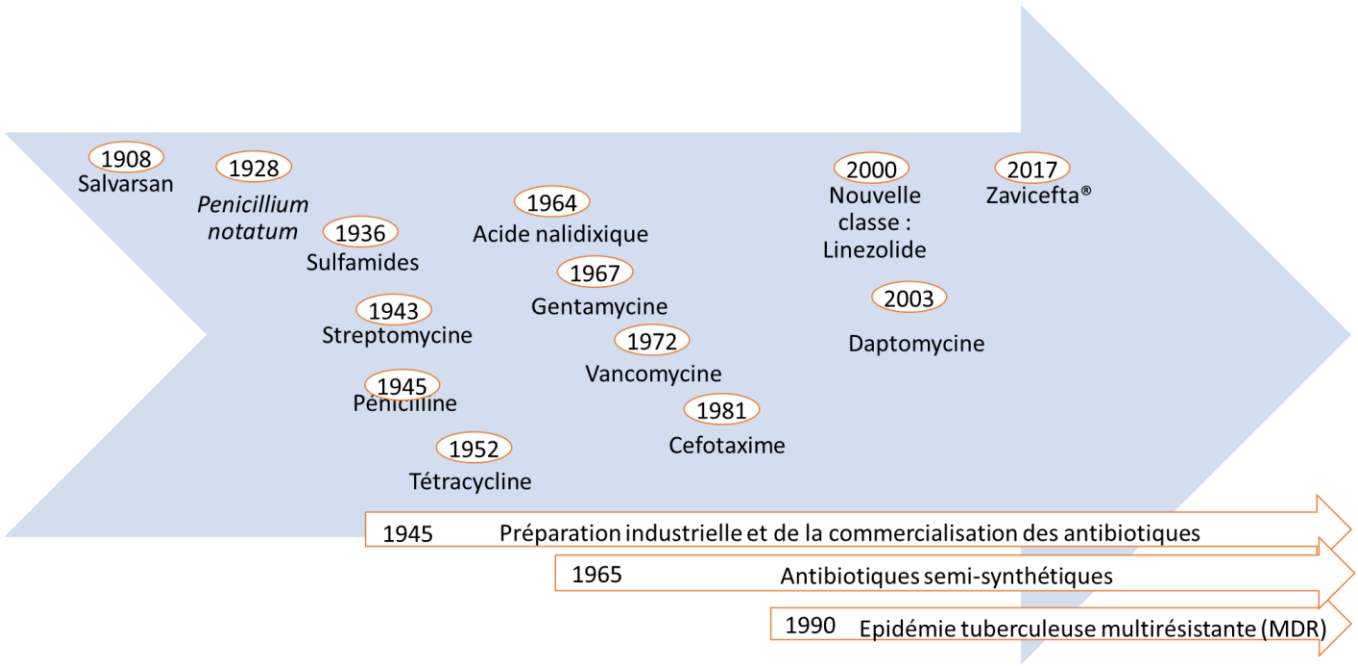



**Figure 14 : Rappels historiques sur les découvertes d'antibiotiques**
1908 : Découverte par Paul Ehrlich du Salvarsan,
1928 : Identification de la moisissure : *Penicillium notatum* par Alexander Fleming
1936 : Découverte des sulfamides par Gerhard Domagk
1943 : Découverte de la streptomycine, première molécule active sur *Mycobacterium tuberculosis*, par Selman Waksman et Albert Schatz
1945 : Débuts de la préparation industrielle et de la commercialisation des antibiotiques.
Prix Nobel pour Fleming, Florey et Chain
1965 : Développement des antibiotiques semi-synthétiques.
1967 : Mise sur le marché de la gentamycine (aminoside)
1972 : Mise sur le marché de la vancomycine (Glycopeptide)
1981 : Mise sur le marché du céfotaxime (céphalosporines de 3e génération (C3G))
1990 : Début de l'expansion de l'épidémie de bacilles tuberculeux multirésistants
2000 : Mise sur le marché du linézolide (oxazolidinone).
2003 : Mise sur le marché de la daptomycine (lipopeptide)
2017 : Introduction en France du Zavicefta® par AstraZeneca (ceftazidime/avibactam) [95]

Depuis l'antiquité l'homme utilise des composés naturels comme agents contre les infections telles que les Kohl (poudre minérale noire), les moisissures de penicillium... Mais c'est à partir du début du siècle dernier (1908) que les premières molécules synthétiques ou purifiées furent spécifiquement utilisées contre les bactéries. Cela marqua l'entrée dans l'ère des antibiotiques.

En 1908, Paul Ehrlich met au point un dérivé de l'arsenic non toxique efficace contre la syphilis, l'arsephénamine qui sera commercialisée sous le nom de Salvaran (Figure 14). C'est la première molécule de synthèse à activité antibactérienne. Paul Ehrlich est un médecin allemand qui travaillait sur les propriétés biologiques des colorants. Ses travaux ont mené à des découvertes dans des domaines variés telles que l'hématologie, la microbiologie, la microscopie et l'histologie. En 1908, il est lauréat du prix Nobel de physiologie pour ses travaux sur l'immunité [96].

Par la suite, les découvertes dans le domaine des antibiotiques se succèdent rapidement grâce aux travaux de scientifiques tels que Fleming et Domagk. En 1928, en Angleterre, Alexander Fleming identifie la moisissure : *Penicillium notatum* comme inhibant la croissance bactérienne. Il concentre la substance antibactérienne qu'il nommera « pénicilline ». Ce n'est qu'en 1945 que débute la préparation industrielle et la commercialisation de la pénicilline pure. Fleming, Florey et Chain reçoivent conjointement le prix Nobel de physiologie ou médecine pour la découverte, « l'isolement et l'emploi thérapeutique de la pénicilline » [95].

En 1936, le scientifique allemand, Gerhard Domagk, qui poursuit les travaux sur les colorants de Paul Ehrlich à l'institut Bayer découvre le sulfamidochrysoïdine qu'il nommera « prontosil ». C'est le premier antibactérien de la classe des sulfamides. C'est une prodrogue, qui acquiert son activité *in vivo* grâce à l'action d'une estérase. Cette découverte lui vaudra également le prix Nobel de physiologie ou médecine de 1939.
Par la suite, les découvertes des autres classes d'antibiotiques se succèdent jusqu'au début des années 80 (Figure14).

L'utilisation et la production des antibiotiques deviennent généralisées en Europe au milieu du XXe siècle. On estime que cela a permis une augmentation de l'espérance de vie de plus de dix ans, soit le plus grand progrès thérapeutique de l'histoire. Par comparaison, on estime que l'ensemble des traitements anticancéreux a augmenté l'espérance de vie d'environ 2 ans. Par exemple, l'utilisation de la streptomycine, première molécule active sur *Mycobacterium tuberculosis* découverte en 1943 par Selman Waksman, a été un apport essentiel dans la lutte

contre la tuberculose après-guerre [177]. Cette découverte a été récompensée par le prix Nobel prix Nobel de physiologie ou médecine de 1952.

C'est le microbiologiste Selman Waksman qui définit le terme « antibiotique » (du grec αντι : « contre », et βιος : « la vie ») en 1941. Il aborde la recherche d'antibiotiques d'une manière nouvelle et systématique, contrairement à la découverte fortuite comme la pénicilline par Fleming, qui a observé une contamination accidentelle d'un pathogène bactérien par une moisissure aéroportée. Waksman et ses étudiants ont mis au point les premières méthodes de « screening » pour la découverte d'agents antimicrobiens produits par des microorganismes du sol[178].

Cependant, l'effet de ces découvertes s'est affaibli peu à peu avec l'apparition croissante de résistances et la diminution de nouvelles alternatives thérapeutiques (Figure14).

En effet, entre 1980 et 2000, il n'y a pas eu de découverte de nouvelle classe d'antibiotique mais en parallèle il y a eu l'émergence de graves résistances. C'est notamment le début de l'expansion de l'épidémie de tuberculeuse multi résistante aux antibiotiques dans les années 90. Les années 2000, marquent un petit sursaut de l'ère des antibiotiques avec la première introduction depuis vingt ans d'une nouvelle classe d'antibiotiques : le linézolide de la famille des oxazolidinones qui est une molécule 100% synthétique.

De nos jours, 150 molécules bénéficient de l'AMM en France (autorisation de mise sur le marché). Un quart sont des bêtalactamines, comme les céphalosporines ou les pénicillines [25]. Il y a peu de nouveaux dépôts d'AMM pour des traitements antibiotiques. On peut citer comme exemple, l'introduction en France en 2017 de l'antibiotique Zavicefta® (produit par AstraZeneca) dans l'arsenal de lutte contre les bactéries multirésistantes, qui est composé de ceftazidime et de avibactam, une céphalosporine et un inhibiteur de β-lactamase : c'est donc une nouvelle association médicamenteuse, mais pas une nouvelle classe d'antibiotique.

### B. Classes et cibles des antibiotiques actuels

Les antibiotiques sont des molécules qui inhibent un mécanisme essentiel à la survie ou à la multiplication de la bactérie. Ils peuvent être bactéricides ou bactériostatiques. Il existe 11 classes d'antibiotiques qui vont cibler 6 voies essentielles à la bactérie.

| **Familles**<br>**Molécules** | **Cibles** | **Mécanismes d'action** | **Mécanismes de résistance** |
|---|---|---|---|
| **2,4-aminopyridines**<br>Trimétoprime<br>Pyriméthamine | Métabolisme : Dihydrofolate réductase | Inhibition de la synthèse des bases puriques et pyrimidiques | Imperméabilité<br>Autotrophie par la thymine<br>Modification ou surproduction de la cible |
| **β-lactamines** :<br>Pénicillines<br>Céphalosporines<br>Carbapénèmes<br>Monobactames | Paroi : Peptidoglycane | Mime le dipeptide D-Ala-D-Ala ce qui inhibe les protéines de liaison aux pénicillines (PLP) | Inactivation enzymatique (β-lactamases)<br>Diminution des porines<br>Mécanismes d'efflux<br>Mutation de la cible (PLP) |
| **Fusidanines**<br>Acide fusidique | Synthèse protéique : Ribosome 50S | Bloque la translocation de l'ARNt du site A au site P | Peu connus, peu de résistance |
| **Amino(glyco)sides**<br>Amikacine<br>Gentamicine<br>Streptomycine | Synthèse protéique : Ribosome 30S | Erreurs de traduction et synthèse de protéines aberrantes | Modification cible<br>Inactivation enzymatique de l'antibiotique |
| **Aminocoumarines**<br>Novobiocine<br>Coumermycine A | ADN Topologie | Inhibition de l'hydrolyse de l'ATP de la topoisomérase II | |
| **(Fluoro) Quinolones** acide nalidixique<br>norfloxacine | ADN | ADN gyrase et les topoisomérases II et IV | |
| **Cyclosérine** | Paroi : Peptidoglycane | Inhibition de la ligase qui crée le dipeptide D-Ala-D-Ala essentiel à la synthèse de la paroi | |
| **Fosfomycine** | Paroi : Peptidoglycane | Inhibe la PEP synthase et la formation du disaccharide pentapeptide | |
| **Glycopeptides et Lipopeptides**<br>Vancomycine<br>Daptomycine | Paroi : Peptidoglycane | Se fixe après D-Ala-D-Ala dans le disaccharide pentapeptide.<br>empêche l'action des PLP | Modification de la cible |
| **Macrolides**<br>Érythromycine<br>Télithromycine | Synthèse protéique : Ribosome 50S | Empêche la translocation du ribosome et inhibe l'élongation | Modification de la cible |
| **Polypeptide**<br>Gramicidine<br>Polymyxine | Membrane | Porine qui augmente la perméabilité des membranes | |
| **oxazolidinones**<br>Linezolide | Synthèse protéique : Ribosome 50S | Fixation sur l'ARN 23S de la sous-unité 50S | |

**Tableau 1 : Les différentes classes d'antibiotiques, leurs mécanismes d'action et les mécanismes de résistance [97].**

1. La paroi bactérienne

La paroi est spécifique aux cellules procaryotes, elle permet à la bactérie de garder sa forme et de résister à la pression osmotique. Elle est composée du peptidoglycane. Les bêta-lactamines

et les glycopeptides ciblent la paroi. Ces antibiotiques empêchent la synthèse de la paroi bactérienne ou introduisent des défauts dans sa structure.

Le peptidoglycane est composé d'un motif qui forme un maillage solide autour de la cellule bactérienne. Ce motif contient deux sucres (le N-acétylglucosamine et d'acide N-acétyl muramique), un pentapeptide terminé par deux résidus de D-alanine (D-Ala-D-Ala). Ces unités sont reliées entre elles lors de la synthèse du peptidoglycane par des transpeptidases. Cette étape est inhibée par les antibiotiques ciblant la paroi. Les transpeptidases sont aussi appelées PLP ou Protéines de Liaison aux Pénicillines.

Les bêta-lactamines se lient aux PLP et inhibent leur activité transpeptidase. Les bêta-lactamines possèdent un noyau bêta-lactame qui présente une homologie de structure avec le dipeptide D-Ala-D-Ala, cela leur permet d'inhiber les PLP [98].

2. La membrane

Les gramicidines et la polymyxine modifient la perméabilité cationique de la membrane, ce qui annule le gradient de proton qui permet à la bactérie de stocker son énergie. Si l'espace intermembranaire devient poreux, il n'y a plus d'énergie dans la bactérie donc elle meurt [97].

3. Traduction des protéines

La traduction des protéines peut être bloquée en attaquant les ribosomes bactériens qui sont différents des ribosomes humains. Les aminosides ciblent la petite sous unité 30 S, les macrolides et les cyclines la grande sous unité 50S. Certains facteurs accessoires de la traduction peuvent aussi être la cible d'antibiotiques (exemple : Acide fusidique).

L'inhibition de la synthèse protéique bloque le développement de la bactérie. Ces antibiotiques sont principalement bactériostatiques.

4. ADN

Les antibiotiques tels que les quinolones ciblent la gyrase ou les topoisomérases bactériennes, ce qui empêche la réplication de l'ADN et donc la multiplication bactérienne. Ces antibiotiques sont donc bactériostatiques.

5. ARN

D'autres antibiotiques empêchent la synthèse de l'ARN en bloquant l'ARN polymérase.

Exemple : rifampicine (traitement de la tuberculose).

### 6. Métabolisme

Les 2,4-aminopyridines bloquent le métabolisme de la bactérie en empêchant la synthèse des bases puriques et pyrimidiques.

## C. La résistance aux antibiotiques

La plupart des antibiotiques sont d'origine naturelle (ou semi-synthétique) et sont produits par des micro-organismes. Ils fabriquent des antibiotiques pour tuer les compétiteurs lorsqu'ils sont dans des conditions défavorables où les nutriments sont rares.
Les bactéries ont pour stratégie de fabriquer un antibiotique et son antidote (ou son mécanisme de résistance) pour ne pas se tuer elles-mêmes. Par exemple, les bactéries qui fabriquent des pénicillines, fabriquent aussi des pénicillinases à l'origine de leur résistance.

Ainsi, les mécanismes de résistance sont aussi anciens sur le plan évolutif que les antibiotiques eux-mêmes et ne sont pas apparus avec l'utilisation des antibiotiques par l'homme. C'est l'amplification du phénomène, de par la sélection de souches résistantes qui résulte de son utilisation par l'homme.

La résistance apparaît au bout de quelques années en clinique ce qui provoque un affaiblissement de l'arsenal thérapeutique. Pour les molécules d'origine naturelle comme les sulfamides qui ont été utilisés dans les années 1930, la résistance a été observée dans les années 1940. Pour les pénicillines, la résistance est apparue 3 ans après leur utilisation [99].

### 1. Mécanismes généraux de résistances aux antibiotiques

#### a. Les mécanismes d'apparition de résistance : la plasticité du génome

Le mécanisme de résistance peut s'acquérir de deux façons, avec d'une part des mutations ponctuelles sur le génome. La probabilité de survenue est constante, très faible et dépend de la plasticité du génome. La solution est un système simple. Par exemple : une modification d'un acide aminé de la cible. Le transfert du nouveau caractère est uniquement vertical. Cependant, la bactérie, en conditions de stress, peut activer des mécanismes génétiques pour évoluer plus vite : il va y avoir plus de mutations. Il y a des phénotypes chez les bactéries qui sont «

hypermutateurs », ce n'est pas un défaut du mécanisme de réparation, mais une extinction temporaire. Ainsi le taux de mutation augmente, ce qui favorise la probabilité d'obtenir des bactéries résistantes. Ces mécanismes ont un coût énergétique pour la bactérie. Mfd favorise l'hypermutation lors de l'infection [57].

D'autre part, l'acquisition de résistance peut se faire par transfert de matériel génétique entre bactéries. Ce mécanisme permet des solutions complexes et multiples et un transfert à la fois vertical et horizontal de la résistance. Il se fait par le biais d'éléments génétiques mobiles tel que des plasmides, transposons, intégrons ou des éléments composites (multiples fonctions).

L'émergence de bactéries résistantes pathogènes peut se faire à deux niveaux, soit directement par la sélection de bactéries résistantes au sein du foyer infectieux, soit indirectement par la sélection au sein de la flore commensale de bactéries non pathogènes résistantes, puis au transfert aux bactéries pathogènes.
Dans le site infectieux, il n'y a qu'une seule espèce bactérienne en faible nombre de bactéries ($10^8$-$10^{10}$). L'apparition de la résistance ne peut se faire que par un seul mécanisme : la mutation ponctuelle. Et la sélection sur le site infectieux ne se fait que chez les patients infectés. Cela réduit donc la survenue de ce phénomène.
Cependant, dans la flore commensale il y a plusieurs centaines d'espèces en très grand nombre de bactéries ($10^{14}$). Les mécanismes d'apparition et de transfert de résistance sont multiples car il existe des échanges (horizontaux) entre les différentes espèces. C'est donc le scénario le plus courant et le plus probable pour l'émergence de bactéries pathogènes résistantes.

Les flores commensales sont présentes chez tous les individus, donc la sélection se fait chez tous les sujets traités aux antibiotiques (homme animaux végétaux) d'où l'importance de la flore commensale, et de cette voie indirecte. L'antibiotique se concentre dans la salive (pharynx), dans la sueur (peau), dans les sécrétions digestives (colon). De plus, il met beaucoup de temps à être totalement éliminé du corps. Ce qui maintient une pression de sélection sur la flore commensale qui peut engendrer l'émergence de résistances.

### b. Mécanismes moléculaires de résistance

Lorsqu'une bactérie est sensible, l'antibiotique rentre, bloque l'activité de sa cible, la bactérie ne peut plus se développer ou elle meurt.

Pour que la bactérie devienne résistante, il existe cinq grands mécanismes de résistance, plus ou moins spécifiques à l'antibiotique.

- Réduction de la perméabilité (non spécifique)

L'antibiotique ne peut plus rentrer dans la cellule, il n'atteint plus la cible, il n'a donc plus d'effet.
Ce mécanisme peut se faire de deux façons. Tout d'abord, certaines bactéries sont naturellement résistantes à certains antibiotiques, car ils ne peuvent pas passer les barrières naturelles (membranes, paroi). C'est particulièrement le cas des bactéries à Gram négatif car elles possèdent deux membranes, une externe et une interne. La paroi est relativement poreuse et laisse passer des molécules. Cependant les membranes sont plus étanches et les antibiotiques doivent utiliser des porines pour pénétrer dans la bactérie.

La porine est un trimère, constituée de 3 sous unités. C'est un petit tuyau (ou pore) avec au milieu un canal polaire qui laisse passer certaines molécules (eau, ions, glucose, antibiotique...). Les souches sensibles à la céfoxitine d'*Escherichia coli* ont 3 protéines principales dans sa membrane externe qui forment des canaux dont la porine OmpF (Outer membrane protein F). La souche résistante n'a plus que deux protéines. La porine a disparu, l'antibiotique ne peut plus passer et ne peut plus atteindre sa cible (ici : le peptidoglycane) [100].

- Efflux actif (peu spécifique)

L'antibiotique est capable de rentrer dans la bactérie, mais il y a une pompe dans la membrane qui reconnaît une classe de composés et les fait ressortir : les pompes à efflux. Ces pompes sont présentes chez toutes les bactéries à Gram négatif.
Par exemple, chez *Escherichia coli*, la protéine TolC est présente sur la membrane externe et AcrB (inner membrane pump) sur la membrane interne. La protéine AcrA (membrane fusion protein) permet de faire le lien entre les deux protéines précédentes [101]
D'autre part, chez *Pseudomonas aeruginosa*, la bactérie fabrique une dizaine de pompes différentes, insérées dans la membrane externe de la bactérie. Elles s'ouvrent pour faire sortir le composé (l'antibiotique) puis se referment. C'est un système sélectif pour une classe de composés donnée qui s'ouvre quand la bactérie en a besoin et qui se ferme quand elle n'en a pas besoin. Cependant certaines pompes peuvent servir à effluer plusieurs classes d'antibiotiques. C'est le cas des pompes MexA-MexB-OprM chez *Pseudomonas aeruginosa*.

Ces systèmes d'efflux permettent à une même souche d'être résistante aux tétracyclines, aux fluoroquinolones et à certaines béta-lactamines [102].

- Amplification de la cible (spécifique)

Une mutation de la bactérie peut conduire à l'amplification de l'expression du gène codant pour la cible de l'antibiotique, la bactérie se met à fabriquer beaucoup de cibles : l'antibiotique ne peut pas saturer toutes les cibles. La résistance de la bactérie est donc augmentée.

- Modification de la cible : mutation ou modification chimique (spécifique)

Une cible d'un antibiotique peut être modifiée soit génétiquement par mutation soit chimiquement après la traduction. Alors, l'affinité de l'antibiotique pour sa cible est diminuée.

Par exemple, la rifampicine est un inhibiteur de la transcription et se fixe sur la sous-unité beta de l'ARN polymérase bactérienne. Il y a une complémentarité de forme entre l'antibiotique et le site actif. Les mutations de la sous-unité beta H406 ou S411 entraine une modification de la forme de la cavité. Il en résulte une perte d'affinité de l'antibiotique pour sa cible. La mutation qui apparait doit empêcher la fixation de l'antibiotique tout en préservant l'activité de l'enzyme : l'ARN polymérase doit être suffisamment fonctionnelle [103].

- Modification/dégradation de l'antibiotique (très spécifique)

C'est un mécanisme très spécifique, c'est le plus sophistiqué. La bactérie produit une enzyme qui dégrade l'antibiotique ou qui le modifie chimiquement (méthylation, acétylation…) et rend l'antibiotique inactif.

Par exemple, des béta-lactamases sont responsables de la résistance aux béta-lactamines. Les premières β-lactamases (TEM-1/2, SHV-1) ont été initialement décrites dans les années 60 chez *Escherichia coli* et *Klebsiella pneumoniae* et ont très vite diffusé parmi d'autres espèces (entérobactéries, *Haemophilus influenzae, Neisseria gonorrhoeae, Pseudomonas aeruginosa*) [104]. Ces enzymes dégradent un noyau béta-lactame spécifique. En effet, les pénicillinases dégradent uniquement les béta-lactamines de la famille des pénicillines, les céphalosporinases dégradent les céphalosporines et les carbapénemases, les carbapénèmes. Plus récemment, des bêtalactamases à spectre étendu (BLSE) ont été découvertes. Elles confèrent une résistance

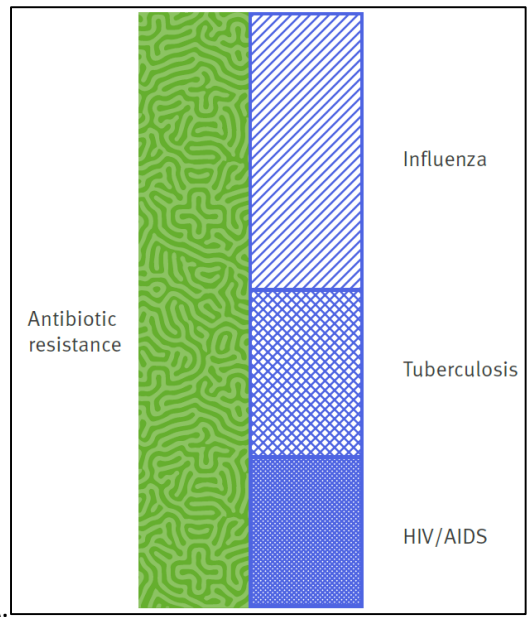
croisée aux pénicillines, aux céphalosporines et à l'aztréonam (monobactame), mais pas aux carbapénèmes. Ces bactéries deviennent donc multirésistantes : des BMR (Bactéries Multi Résistantes). Les BLSE sont retrouvées principalement chez les entérobactéries mais également chez d'autres pathogènes à Gram négatif tels que *Pseudomonas aeruginosa* et *Acinetobacter baumannii* [105].

Le nombre d'infections à bactéries productrices de BLSE a explosé de façon préoccupante ces dernières années et a même dépassé les SARM à l'hôpital (*S. aureus* résistant à la méticilline). L'étude Burden BMR de Santé publique France a évalué le poids des infections à BMR en France : les entérobactéries productrices de BLSE et les SARM sont les plus préoccupantes [106].

### c. Impacts socio-économiques de la résistance aux antibiotiques

L'antibiorésistance a un impact mondial, c'est une urgence de santé publique. En Europe, on estime que le poids des infections par des bactéries résistantes aux antibiotiques est comparable à celui de la grippe, de la tuberculose et du VIH / SIDA combinés (Figure 15). Une étude récente de l'Institut Pasteur a permis d'estimer que le nombre d'infections à germes multi-résistants aux antibiotiques en France s'élevait à 158 000 cas annuels en 2017 et que 12% des infections qui nécessitent une hospitalisation sont dues à une bactérie résistante. Cette étude souligne également que ces phénomènes se traduisent par un surcoût annuel estimé de 290 millions d'euros en France [107].

A.




B.

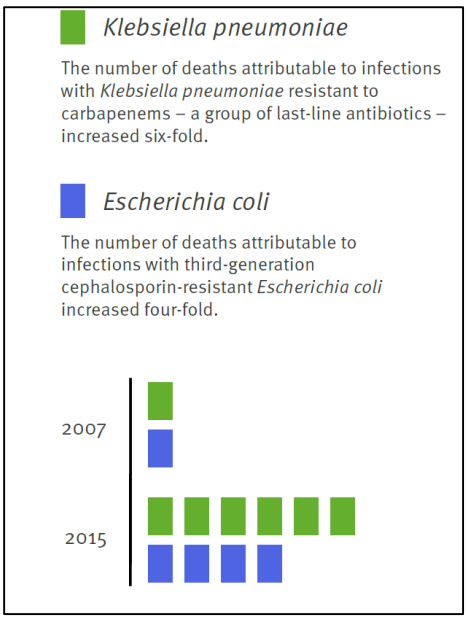


**Figure 15 : Infographie de l'ECDC (Centre européen de prévention et contrôle des maladies) : *Antibiotic resistance : an increasing threat to human health***
A) Le poids des infections par des bactéries résistantes aux antibiotiques sur la population européenne est comparable à celui de la grippe, de la tuberculose et du VIH / SIDA combinés. B) Entre 2007 et 2015, l'impact des 16 bactéries résistantes aux antibiotiques de l'étude a augmenté en particulier pour *Klebsiella pneumoniae* et *Escherichia coli.*

La résistance aux antibiotiques est à la fois un phénomène massif et évolutif : il y a une surconsommation d'antibiotiques chez l'homme et surtout dans l'agriculture. Chez les animaux d'élevages, les antibiotiques sont utilisés comme facteurs de croissance. De plus, la consommation s'accroit de façon exponentielle à cause de l'élevage intensif.
Il s'agit donc d'une situation de crise. On retrouve une évolution générale inquiétante avec l'apparition de souches « totorésistantes » contre lesquelles nos possibilités thérapeutiques sont déjà réduites voire nulles.
Ce phénomène est accéléré par un mauvais emploi des traitements, plus particulièrement dans les pays émergents. Le mauvais emploi de traitements signifie d'enchainer plusieurs cures d'antibiotiques de trop courte durée de façon répétée avec plusieurs types d'antibiotiques, sans suivre les recommandations des autorités de santé. Cela induit une co-sélection des bactéries résistantes et entraine une panrésistance et finit par faire apparaitre des bactéries multi résistantes, ou BMR.

En France, la majorité des antibiotiques est utilisée en ville : 80/90%. Cependant c'est à l'hôpital que la pression de sélection est la plus importante car il y a souvent des poly-antibiothérapies pour une seule personne, ce qui entraine des co-sélections [108,109].

De plus, il y a une augmentation générale de la consommation d'antibiotique. 500 tonnes d'antibiotiques sont utilisées par an chez l'homme en ville rien qu'en France. On arrive sûrement à plusieurs millions de tonnes dans le monde. On estime à 10g/an en moyenne par habitant d'antibiotique avec une augmentation de 4% de la consommation des antibiotiques en général et de 10% des béta-lactamines entre les années 80 et 90[109].

En Europe, tous les pays ne consomment pas autant d'antibiotiques. La France est restée longtemps un mauvais élève. Les hollandais consomment 3 fois moins d'antibiotiques.

Il y a une corrélation statistique entre la surconsommation d'antibiotiques et la résistance [109].

Dans les pays émergents, l'antibiorésistance est beaucoup plus problématique en raison du mésusage, de la forte utilisation dans l'élevage, du mauvais traitement des eaux…
Par exemple, la résistance des entérobactéries aux carbapénèmes se développe rapidement, dans le système de santé indien. Le nombre de sujets atteints, quasi nul jusqu'en 2010, a explosé en 2011. Tous les patients rapatriés de l'étranger sont désormais dépistés pour les bactéries multi résistantes (BMR)[110].

La résistance aux antibiotiques est donc un problème mondial, cependant il y a peu de nouvelles alternatives thérapeutiques. L'innovation dans ce domaine représente un fort coût pour les industriels et, avec l'émergence rapide de résistances, les nouveaux candidats médicaments deviennent rapidement obsolètes ce qui rend cette recherche peu rentable à l'heure actuelle[109].

## D. Quels espoirs ? Quelles options

### 1. Diminuer l'apparition de résistance

#### a. Hygiène et la prévention

La première façon de lutter contre l'antibiorésistance est encore d'éviter l'apparition d'infection et cela commence par de mesure d'hygiène et de prévention. Des campagnes de sensibilisation et d'éducation ont été créées à ces fins (Figure 16).




**Figure 16 : Infographie de la campagne d'information pour lutter contre l'antibiorésistance de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), 2017**

### b. Choisir l'antibiothérapie

Un « bon » traitement antibiotique doit à la fois traiter efficacement chaque patient avec l'antibiotique adapté à sa maladie tout en limitant l'apparition de résistances au sein des écosystèmes.

Cet équilibre peut s'obtenir grâce à plusieurs stratégies de traitement : un bon choix de molécules, des associations médicamenteuses, une durée optimale de traitement, une bonne observance.

Les recommandations des autorités de santé, comme la HAS (la Haute Autorité de Santé) en France servent à maintenir au mieux cet équilibre et à harmoniser la prise en charge thérapeutique sur le territoire.

A l'heure actuelle, les dernières lignes de défense sont les carbapénèmes et la colistine.

Les carbapénèmes sont des β-lactamines qui sont insensibles à la quasi-totalité des β-lactamases. Ils sont utilisés pour le traitement probabiliste des infections nosocomiales sévères. Leur spectre d'action couvre la plupart des bactéries y compris les anaérobies, à l'exception des SARM, *E. faecium* et *P. aeruginosa*. Cependant l'émergence récente d'entérobactéries productrices de carbapénémases a été constatée [111].

La colistine est un antibiotique de la famille des polymyxines actif contre *E. coli, K. pneumoniae, P. aeruginosa* et *Acinetobacter spp* mais inactif contre les Gram positif [25].

### c. Diminuer la consommation des antibiotiques

En France, la consommation a diminué, mais nous pouvons faire encore beaucoup mieux. En 4 ans, la consommation de 17.7 millions de traitements a été évitée. Il faut cependant faire attention car notre consommation a tendance à ré-augmenter [109].

Depuis 2002, les pouvoirs publics et la Caisse nationale d'assurance maladie (CNAM) ont mené des campagnes d'information visant à réduire la consommation d'antibiotiques en France (en tête des pays européens pour ce type de prescription). Cet ensemble de campagnes, intitulé « Les antibiotiques, c'est pas automatique », vise à informer le public sur l'inutilité des antibiotiques dans certaines situations (les infections virales respiratoires, notamment, comme la grippe ou la bronchiolite par exemple). L'effort a porté ses fruits avec une diminution de la consommation des antibiotiques [112].

Plus spécifiquement, Les messages principaux de la campagne étaient :

Il faut respecter la durée et les doses prescrites d'un antibiotique, même si les symptômes diminuent après quelques jours de traitement et que le traitement dure plusieurs semaines.

Il ne faut pas prendre d'antibiotique sans l'avis d'un médecin. L'automédication peut être dangereuse. Les pharmacies sont chargées de recycler les boites de médicaments usagées.

Les antibiotiques sont inefficaces dans la majorité des rhumes, des angines et des otites car ces pathologies sont souvent dues à des virus ou des allergies.

Les antibiotiques n'ont pas d'effet direct sur la fièvre ou la douleur.

Les infections bénignes ne nécessitent pas d'antibiotiques.

La vaccination est un moyen très efficace de se protéger contre de nombreuses maladies infectieuses graves.

Les antibiotiques peuvent induire parfois des effets indésirables possiblement graves (hypersensibilité, troubles rénaux/cutanée.) [25].

Plus récemment, au printemps 2019, le Premier ministre Edouard Philippe avait annoncé l'intention du gouvernement de promouvoir l'utilisation en pharmacie du test rapide d'orientation diagnostique (TROD) oro-pharyngé de l'angine à streptocoque A, afin d'améliorer la prise en charge des patients et d'éviter la prescription d'antibiotiques non nécessaires. Cette mesure, initialement prévue pour le 1er Janvier 2020 est reportée au printemps.

### 2. Alternatives et innovation thérapeutique : Les avancées récentes

Après « l'âge d'or des antibiotiques », les entreprises du médicament ont été confrontées à des défis scientifiques majeurs pour la mise au point de nouveaux antibiotiques, notamment en ce qui concerne les bactéries à Gram négatif. De plus, les "big pharma" ont perdu tout intérêt pour ce domaine qui ne promettait pas une croissance importante du marché et des bénéfices. Le désintérêt des grandes sociétés pharmaceutiques a suscité des inquiétudes parmi la communauté scientifique et les pouvoirs publiques [113]. La majeure partie de la recherche et du développement d'antibactériens est actuellement effectuée par des PME (environ 80% de toutes les institutions). La plupart de ces PME sont basées en Amérique du Nord (États-Unis et le Canada ; 56%) et en Europe (y compris Israël ; 36%). Les PME européennes se trouvent le plus souvent aux Royaume Uni, suivi par la France, la Suisse, le Danemark et les Pays-Bas[114]. Ces projets

innovants emploient différentes stratégies pour lutter plus ou moins directement contre les infections (Figure 17).

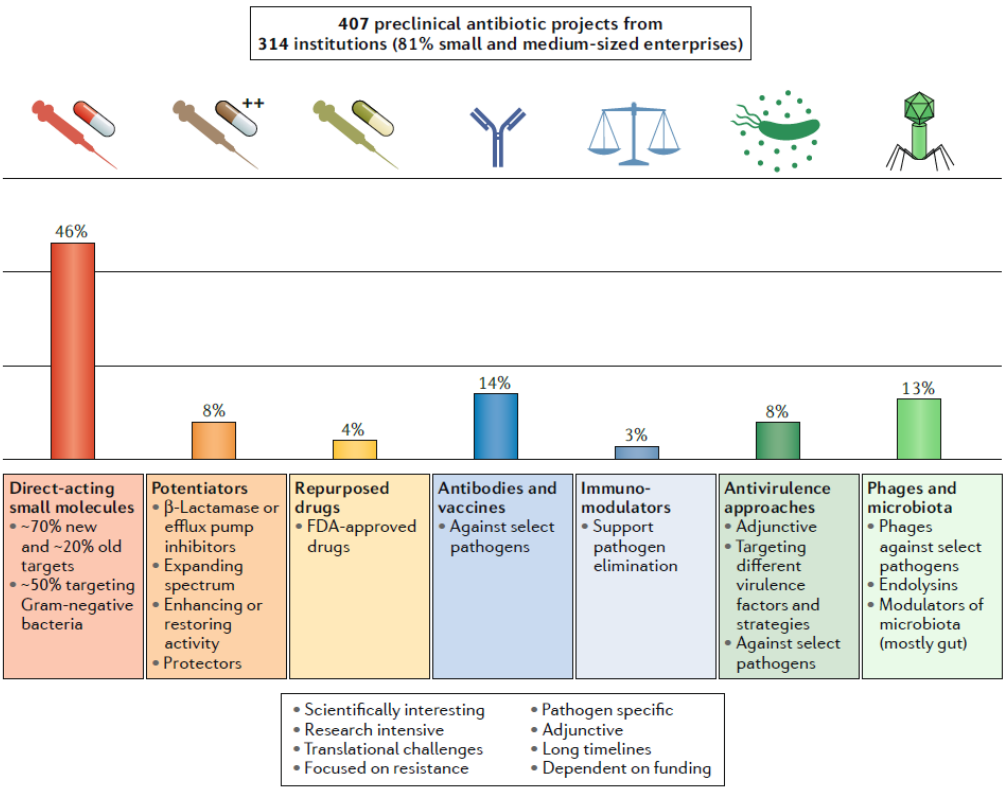



**Figure 17 : Projets de développement d'antibactériens en phase préclinique dans le monde en 2019.**
Theuretzbacher *et al.* ont identifié 314 institutions de recherche et développement et 407 projets précliniques. Les projets ont été classés en 7 groupes en fonction de l'action antibactérienne recherchée : Molécule à action directe, anticorps et vaccins, phages et produits apparentés aux phages, modulateur du microbiote, approches sur l'antivirulence, potentialisateurs de médicaments à action directe, extension d'indication, immunomodulateurs ou autres.

### a. Peptide antimicrobien, Polymères

Nature Microbiology a publié en 2016 une étude consacrée à l'emploi de polymères microscopiques en forme d'étoile pour tuer des bactéries résistantes aux antibiotiques. Ces polymères SNAPP (structurally nanoengineered antimicrobial peptide polymers) sont formés de courtes chaînes protéiques. Ils se sont révélés efficaces pour détruire des bactéries à Gram négatif. Le polymère était par contre inoffensif pour l'organisme. Il n'induirait pas de résistance chez les microbes. Le problème de l'utilisation de ces composés est la fragilité des peptides, ce qui rend très compliqué l'administration par voie orale. De plus, les peptides sont des macromolécules, ce qui induit souvent des problèmes de solubilité et de biodisponibilité [115].

### b. Bactériophagiques

Les bactériophagiques sont des médicaments à base de cocktails de phages ou bactériophages, des virus qui dévorent la bactérie cible. Découverts par le Français Félix d'Hérelle en 1916, ils ont été immédiatement utilisés, notamment pour traiter les blessés de la Première Guerre mondiale, jusqu'à l'essor des antibiotiques qui étaient plus faciles d'emploi et qui les ont remplacés.

La phagothérapie fait l'objet de nombreuses recherches partout dans le monde. Les bactériophagiques sont cependant encore en usage dans l'ancien bloc soviétique. Par exemple, en Russie ou en Géorgie, le traitement de *Klebsiella* par phagothérapie est courant. Il existe des « cocktails » bactériophagiques contenant des phages spécifiques aux klebsielles. [116]. En France il existe de nombreuses barrières législatives, ils ne peuvent être prescrits que dans le cadre d'une ATUn (Autorisation Temporaires d'Utilisation nominative).

Il existe une synergie lorsque l'on combine les traitements par antibiotique et par bactériophagique. [117]

### c. Thérapie à l'aide de CRISPR/Cas9

Une découverte récente d'un outil moléculaire trouvé initialement chez les bactéries pourrait s'avérer être un espoir thérapeutique. La technologie CRISPR se sert d'une enzyme appelée Cas9 qui agit à la façon de ciseaux moléculaires pouvant couper des séquences spécifiques de l'ADN. L'enzyme est en mesure de trouver une séquence cible grâce à un ARN guide pouvant être construit de sorte qu'il corresponde à la séquence cible que l'on désire éditer.

L'idée serait donc de concevoir un système CRISPR qui viserait uniquement les gènes de résistances bactériens dans le but de supprimer les parties du génome responsables de résistances aux antibiotiques. Le point fort de cette méthode est qu'elle permettrait de s'adapter constamment aux nouveaux gènes de résistances qui apparaissent avec l'évolution des bactéries. Des études suggèrent que cette technologie pourrait vaincre la résistance à la méticilline chez *Staphylococcus aureus* (SARM), responsable d'infections dans les hôpitaux.

Cette méthode prometteuse se veut non seulement efficace mais également peu coûteuse. Cette technique, comme pour les peptides laisse supposer de gros problèmes d'administration dus à la fragilité des ARN et des problèmes de diffusion (macromolécule) [118].

## E. Les bactéries ESKAPE

La découverte d'agents antimicrobiens puissants et sûrs est sans doute la plus grande avancée de l'histoire en matière de soins de santé. La disponibilité de ces agents a rapidement réduit la morbidité et la mortalité associées à de multiples maladies autrefois mortelles.

L'utilisation généralisée d'antibiotiques a entrainé à l'émergence de résistances dues à la flexibilité génétique des agents pathogènes.

Ces résistances ont une plus grande importance à l'hôpital, car les patients dont les défenses sont altérées sont particulièrement vulnérables aux maladies bactériennes. Bien que de nombreuses bactéries restent sensibles à la plupart de nos agents antimicrobiens, un groupe de bactéries résistantes est apparu, échappant à l'action des antibiotiques. Dans les hôpitaux des pays développés et en développement, ce petit groupe - *Enterococcus faecium, Staphylococcus aureus* (SARM), *Klebsiella pneumoniae, Acinetobacter baumanni, Pseudomonas aeruginosa et Enterobacter*, est surnommé « les bactéries ESKAPE » [119].

Les bactéries ESKAPE sont d'une importance capitale, non seulement parce qu'elles sont à l'origine de la majorité des infections nosocomiales, mais également parce qu'elles représentent les caractéristiques de pathogénie, de transmission et de résistance partagées par les autres pathogènes.

En France, on estime, que près de 10 % des *Escherichia coli* et 15,5 % des *Klebsiella pneumoniae* sont sécrétrices de BLSE (bêta-lactamases à spectre étendu) responsables de résistances croisées aux béta-lactamines et que 18,9 % des *Staphylococcus aureus* étaient résistants à la méticilline [120]. Ceci est très problématique car les bétalactamines, les céphalosporines, les carbapenèmes restent une des premières lignes de défense.

Lors de mon projet de thèse, nous avons utilisés 4 d'entre elles comme modèles en plus de *B. cereus* pour la mise au point de notre nouvelle classe d'antibiotique.

| Règne | Bactérie | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| Embranchement | Protéobactéries | | | *Firmicutes* | |
| Classe | Gammaprotéobactéries | | | *Bacilli* | |
| Ordre | *Pseudomonadales* | *Enterobacteriales* | *Pseudomonadales* | *Bacillales* | |
| Famille | *Moraxellaceae* | *Enterobacteriaceae* | *Pseudomonadaceae* | *Staphylococcaceae* | *Bacillaceae* |
| Genre | *Acinetobacter* | *Klebsiella* | *Pseudomonas* | *Staphylococcus* | *Bacillus* |
| Espèce | *Acinetobacter baumannii* | *Klebsiella pneumoniae* | *Pseudomonas aeruginosa* | *Staphylococcus aureus* | *Bacillus cereus* |
| Souche utilisée | *CIP7034* | *CIP700603* | *CIP27853* | *CIP658* | *Bc407* |

**Tableau 2 : Classification des souches utilisées dans ce projet de thèse**

### 1. *Acinetobacter baumannii*

*Acinetobacter baumannii* est une bactérie à Gram négatif en forme de bâtonnet court (coccobacille). Il est un agent pathogène opportuniste chez l'homme, affectant les personnes immunocompromises. Il est presque exclusivement isolé des environnements hospitaliers.

Les îlots de résistance de type AbaR sont retrouvés chez les *A. baumannii* résistants aux antibiotiques. Il s'agit de transposons d'environ 16,3 Kb facilitant le transfert horizontal de gènes. Les AbaR contiennent plusieurs gènes de résistance aux antibiotiques, tous flanqués de séquences d'insertion. Ces gènes fournissent une résistance aux aminosides, aux aminocyclitols, à la tétracycline et au chloramphénicol [121].

Parmi ces gènes de résistances, il y a des pompes à efflux qui permettent d'évacuer des antibiotiques et d'autres petites molécules qui pénètrent dans le cytoplasme bactérien et dans l'espace périplasmique en dehors de la cellule. On sait que *A. baumannii* possède deux pompes à efflux majeures qui diminuent sa sensibilité aux antimicrobiens. Le premier, AdeB, s'est révélé responsable de la résistance aux aminosides. Le second, AdeDE, est responsable de l'efflux d'un large éventail de substrats, y compris la tétracycline, le chloramphénicol et divers carbapénèmes [122]. Cette bactérie possède au moins une bêta-lactamase : OXA-51 [123].

### 2. *Staphylococcus aureus*

*Staphylococcus aureus* est un cocci à Gram positif, qui appartient aux Firmicutes. Il est anaérobie facultatif. C'est une bactérie commensale, que l'on trouve fréquemment dans les voies respiratoires supérieures et sur la peau. Il peut cependant causer des infections cutanées,

notamment d'abcès, d'infections respiratoires telles que la sinusite et des intoxications alimentaires. Les souches pathogènes ont comme facteurs de virulence de puissantes toxines protéiques et une protéine de surface qui lie et inactive les anticorps [124].

*S. aureus* peut provoquer diverses maladies, allant d'infections cutanées mineures, telles que boutons, impétigo, furoncles, cellulite, folliculite et abcès, à des maladies graves telles que la pneumonie, la méningite, ostéomyélite, endocardite, syndrome de choc toxique, bactériémie et septicémie. Il reste l'une des cinq causes les plus courantes d'infections nosocomiales.

L'émergence de souches de *S. aureus* multi-résistantes aux antibiotiques telles que les SARM (*S. aureus* résistant à la méticilline) est un problème mondial en médecine clinique. Il existe de nombreux mécanismes d'acquisition de résistance par les SARM, comme le gène *mecA* qui code pour une PLP mutée résistante aux béta-lactamines [125].

### 3. *Pseudomonas aeruginosa*

*Pseudomonas aeruginosa* est un bacille, à Gram négatif, en forme de bâtonnet. *P. aeruginosa* est une bactérie ubiquitaire. C'est un pathogène des plantes et des animaux, y compris l'homme. Elle est associée à des maladies graves et des infections acquises à l'hôpital telles que la pneumonie sous ventilation, des infections cutanées et des sepsis. Cette bactérie ubiquitaire est retrouvée dans le sol, l'eau, la flore cutanée et la plupart des environnements créés par l'homme. Cette bactérie est également présente sur les équipements médicaux, y compris les cathéters, provoquant des infections nosocomiales. *P. aeruginosa* est capable de coloniser de nombreuses surfaces et produire des biofilms durables. *Pseudomonas* est naturellement résistant à un grand nombre d'antibiotiques car elle produit une bêta-lactamase qui n'est pas inhibée par l'acide clavulanique (un inhibiteur de béta-lactamase) [126].

### 4. *Klebsiella pneumoniae*

*Klebsiella pneumoniae* est une bactérie à Gram négatif immobile. C'est un pathogène opportuniste impliqué dans les cas de pneumonie nosocomiale, d'infection urinaire, infection hépatobiliaire et de septicémies.

Chez les immunodéprimés (cirrhose, diabète, cancer, greffés, traitement par cortisone…), ces infections sont plus souvent localisées dans les poumons et le foie, ou généralisées (septicémies).

Cette bactérie est présente dans l'eau, sur les plantes, le sol, la peau, les muqueuses et le tube digestif de l'homme. La bactérie se transmet par contact avec des objets, les mains, les végétaux contaminés.

La résistance aux antimicrobiens est principalement due aux pompes à efflux et à l'acquisition de pénicillinase. La capacité de *K. pneumoniae* à coloniser l'environnement hospitalier, y compris la moquette, les éviers, les fleurs et diverses surfaces, ainsi que la peau des patients et du personnel hospitalier, a été identifiée comme un facteur majeur de propagation des infections nosocomiales [127].

# Chapitre 1 : Caractérisation d'une région clé impliquée dans la réponse au stress NO de *Bacillus cereus*

Dans ce chapitre, nous avons utilisé une approche transcriptomique, pour étudier les mécanismes utilisés par *B. cereus* pour lutter contre le NO.

La réponse bactérienne au monoxyde d'azote (NO) est d'une importance majeure car le stress NO est un acteur principal de la réponse immunitaire. Les micro-organismes ont développé des systèmes de régulation de gènes impliqués dans la détoxification et dans la réparation des dommages causés par le NO. Les mécanismes bactériens de résistance au NO sont mal décrits chez les bactéries à Gram positif et en particulier *Bacillus cereus*. Ce pathogène d'origine alimentaire ne possède pas la plupart des armes connues contre le NO, comme les régulateurs transcriptionnels NorR et NsrR ou la NO réductase… décrits dans d'autres bactéries pathogènes ou non pathogènes.

Lors de cette étude, un groupe de 6 gènes a été identifié comme étant particulièrement surexprimé dans la réponse précoce au stress NO. Cette région semble jouer un rôle pivot dans les mécanismes de défense utilisés par *B. cereus* pour lutter contre le stress NO pendant l'infection. Ce groupe contient une enzyme de réparation de cluster fer-soufre (RIC), une nitrite réductase et trois enzymes de la biosynthèse du sirohème.

RIC est une enzyme de réparation des clusters fer-soufre. Ce sont des groupements présents dans certaines métalloprotéines [42]. La nitrite réductase est une enzyme impliquée dans le métabolisme de l'azote et du NO. Cette enzyme possède un cluster fer-soufre et lie le sirohème pour fonctionner [128]. Le sirohème est un groupement prosthétique proche de l'hème qui confère des propriétés d'oxydoréduction à certaines enzymes. Le sirohème et les clusters fer-soufre contiennent des atomes de fer, qui peuvent être ciblés par le NO [129].

Lors de ce projet, nous avons montré une co-expression, une co-localisation et un lien fonctionnel entre les gènes de cette région.

Cependant, la fonction de ces enzymes chez *B. cereus* lors du stress NO et lors de la virulence reste à être vérifiée.

Les mutants *scdA* et *ytfE* de *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*, respectivement, sont plus sensibles au NO que les souches de type sauvage [42] [43]. Chez *Aspergillus fumigatus*, le mutant qui ne produit pas de sirohème a une résistance diminuée au NO et à la virulence chez l'insecte [129].

Une mutagénèse sur le gène *scdA* a été entreprise par double recombinaison homologue afin de générer un mutant Bc407 qui n'exprime pas cette protéine. Plusieurs tentatives de recombinaison ont été infructueuses (*cf.* Détail de la stratégie de mutagénèse en Annexe 6). Des études rapportent une « morphologie cellulaire extrêmement aberrante » chez des mutants de *S. aureus* n'exprimant pas un homologue de RIC [130].

Cependant, d'autres tentatives de production de ce mutant sont actuellement en cours. Par insertion d'un plasmide en amont de *ric*, BTB_RS10825 et *cobA*, nous souhaitons générer des mutants n'exprimant pas les gènes de la région d'intérêt afin de vérifier leur implication dans la résistance au stress NO et dans la virulence lors d'infection *in vivo*.

De plus, cette étude a mis en évidence que *B. cereus* ne possédait pas le régulateur transcriptionnel NsrR connu pour réguler l'expression de gènes impliqués dans la réponse au stress NO comme les protéines RIC et la flavohémoglobine [32].

Cependant une région putative de liaison de NsrR a été trouvée au début de cette région, en amont du gène *ric*. Et une analyse approfondie des séquences protéiques a permis d'identifier trois protéines proches de NsrR : WP_000877649.1, WP_000704116.1, WP_001083465.1.

La présence d'autres régulateurs a également été trouvée dans cette région : FNR et ResD. Leurs implications doivent, elles aussi, être confirmées.

L'étude de ces protéines permettrait potentiellement de mettre en évidence les régulateurs de la réponse au NO chez *B. cereus.*

De plus, ce projet s'est concentré sur les gènes de la réponse précoce au NO. L'étude de la réponse tardive reste à faire : il y a notamment de nombreux gènes impliqués dans le transport du fer (sidérophores et ABC transporteurs) et également des gènes impliqués dans la réparation de l'ADN (DNA mismatch repair protein MutS et MutL, DNA repair protein RecO), et 700 autres gènes de fonctions connues ou non.

Ce chapitre est présenté sous forme d'article scientifique en anglais. Il sera complété avant d'être soumis à un journal pour publication. Nous souhaitons incrémenter les résultats transcriptomiques par une validation expérimentale à l'aide de mutants bactériens notamment.

# Characterization of a key region involved in the NO stress response of *Bacillus cereus*

Porrini C[1], Guérin C[2], Dervyn R[1], Lebreuilly L[1], Gzara F[1], Tran SL[1], Nicolas P[2], Ramarao N[1].

Author information

1 Université Paris-Saclay, INRAE, AgroParisTech, Micalis Institute, 78350, Jouy-en-Josas, France.

2 Université Paris-Saclay, INRAE, MaIAGE, 78350, Jouy-en-Josas, France.

Bacterial response to nitric oxide (NO) is of major importance as NO stress is a main actor of eukaryote immune response. Micro-organisms developed gene regulation systems involved in detoxification and in repairing caused damages. The bacterial mechanisms of NO resistance are poorly described in Gram positive bacteria and especially *Bacillus cereus*. This food born pathogen does not have the common weapon against NO, such as transcriptional regulators norR and nsrR, NO reductase…described in other pathogenic or non-pathogenic bacteria.
With a transcriptomic approach, we investigated the mechanisms used by *B. cereus* to fight NO. A cluster of 6 genes was identified to be particularly overexpressed in the early response to NO stress. This cluster contains an iron-sulphur cluster repair enzyme, a nitrite reductase and three enzymes from the siroheme biosynthesis. We show a co-expression, a co-localization and a functional link between those genes. This cluster may play a pivotal role in the defence mechanisms used by *B. cereus* to fight against NO stress during infection.

## I. Introduction

*Bacillus cereus* is a spore forming human pathogen; it is currently the second leading cause of collective foodborne outbreaks in France after *Staphylococcus aureus* [131] [132]. *B. cereus* can also cause severe systemic infection [133] [134]. During infection, *B. cereus* is able to resist the host immune system. It can indeed survive to phagocytosis by macrophages and induce their apoptosis [78]. Macrophages major mechanisms of cytotoxicity is by the massive production of nitric oxide. Its production is above 10 µM, at the peak of inflammation [6].

Nitric oxide is a free radical, and a powerful oxidizing and nitrating agent. It can target every component of the cell. In particular, it can bind and modify the properties of nucleic acids,

lipids, sugars and proteins. NO is able to bind to transition metal such as Fe, Mn, Cu… present in metalloproteins and modify their activity. All those modifications can lead to cell death.

However, pathogenic bacteria have developed several mechanisms to defend themselves against this antimicrobial weapon. The entire machinery triggered by bacteria is not fully understood nowadays.

The bacterial response to NO occurs in four steps: sensing, signalling, detoxification and repair [7]. When bacteria detect NO with receptors or transcriptional factors such as NsrR, regulation pathways are induced, leading to expression of genes involved in the resistance to NO. There are proteins of detoxification (NOR and Hmp), which transform the NO in the cytosol into less toxic compounds like nitrate or nitrous oxide. Damage repair proteins restore the integrity of nucleic acid (Mfd) [135]or proteins (YtfE, ScdA). Those enzymes are described in bacteria such as *Escherichia coli, Staphylococcus aureus)* [42] [43].

YtfE and ScdA belongs to the RIC family (iron cluster repair). They are involved in repairing iron-sulphur clusters. These clusters are groups of iron and sulphur atoms present on certain metalloproteins. NO can act on these groups by nitrosylating or by disassembling them. This action modify the activity of the enzymes. In *E. coli*, *ytfE* restore the activity of iron cluster enzyme and its transcription is regulated by NsrR, FNR and Fur [42] [136]. NsrR is a negative regulator of NO response genes. FNR activates the expression of genes encoding the nitrate, nitrite, fumarate reductase system [137]. NsrR and FNR have an iron-sulphur cluster that is disassembled by NO, which affect their DNA binding [138]. Fur is an iron uptake regulator [139].

*Bacillus cereus* is particularly resistant to NO and it did not seem to have most of the common genes involved in NO response: nor, nsrR, norR. We wanted to investigate NO defence mechanisms in this emerging pathogen.

Our transcriptomic approach allowed to specify *B. cereus* ways to defend against NO and we particularly focus our attention on a cluster of 6 genes that seems to be a key weapon in the early stage of response to NO. They encode a RIC enzyme, a nitrite reductase and a siroheme biosynthesis enzymes.

## II. Material and method

### 1. Bacterial strains

The strain used for experiments is *Bacillus thuringiensis* 407 Cry⁻ (also sometimes referred to as Bc407). It is an acrystalliferous strain cured of its *cry* plasmid [140]. It is genetically close to the *Bacillus cereus* reference strain ATCC 14579 [141].

Genomes used for alignment are:

*Bacillus thuringiensis Bc*407: NC_018877.1

*Bacillus cereus* ATCC 14579: NC_004722.1

*Bacillus anthracis* CZC5 DNA: AP018443.1

*Bacillus subtilis subsp. subtilis str*. ATCC 6051: NZ_CM000488.1

*Staphylococcus aureus subsp. aureus taxid:46170*

### 2. Growth and stress conditions

Bc407 was grown in LB medium at 37°C with agitation (200rpm) until the end of the exponential growth phase ($OD_{600}$= 2). Then bacteria were diluted 1/100 in RPMI 1640 Medium GlutaMAX™ (SKU 61870-010, Thermofisher), and exposed to diverse stresses for 15min or 60min at 37°C without agitation. NOC5 (146724-82-5, Calbiochem) was used as NO donor at a final concentration of 10 and 50µM. Sodium nitrite (7632-00-0 Sigma-Aldrich) was used at 2.5 mM, Potassium nitrate (7757-79-1, Merck) at 20 mM and hydrogen peroxide solution (7722-84-1, Sigma-Aldrich) at 0.03% (V/V).

The iron stresses were induced during 15min after one extra hour growth in RMPI at 37°C with agitation. As RPMI composition is free of iron, this condition allows the bacteria to starve from it. Then the stresses (excess or iron starvation) were induced with: Iron III citrate (6100-05-6, Sigma-Aldrich) at 81µM and 2,2′-Bipyridyl (366-18-7, Sigma-Aldrich) at 4,4 µM as an iron chelator[142,143].

After the stresses bacterial pellets were frozen in liquid nitrogen. The pellet is introduced in Lysing Matrix B tubes (MP Biomedicals) and high-speed homogenized in FastPrep-24™ 5G Instrument in presence of phenol. Then impurities were extracted from the aqueous phase in three stages: one step with trizol and two with chloroform. The RNAs in the aqueous phase are then precipitated with isopropanol and dissolved in purified water [144]. The quality of the RNA samples was tested by bioanalyzer (Agilent). Only samples with an RIN (RNA integrity number) above 7 were used for experiments.

### 3. RNAseq library preparation and data analysis

RNA samples of Bc407 were prepared as described in the previous section for different NO stress (0, 10 and 50 µM of NO) at different time points (0, 15 and 60 minutes after NO stress) as described in supplementary table (*cf*. Annexe 2). Transcriptome library preparation and sequencing was performed by I2BC Paris-Saclay platform on the Illumina NextSeq sequencer to generate paired-end 40 bp reads bearing strand specificity. Reads were trimmed based on sequencing quality using Sickle (v1.33) [145]and mapped on Bc407 reference genome assembly (NC_018877.1) using Bowtie2 (2.2.6; options "-N 1 -L 16 -R 4")[146] before read-count aggregation on the sense and antisense strand of each transcribed region with Htseq-count (0.10.0; standard options). Experiments were made in triplicates to allow statistical differential expression analysis. RPKM (Reads Per Kilobase Million) normalization [147] served for a first level of exploratory analysis. Differential expression analysis of *B. cereus* Bc407 relied on R library "DESeq2" [148] and associated "median ratio method" normalization procedure. DESeq2 p-values were converted into q-values using R library "fdrtool" [149]. Overexpressed genes were considered over expressed under NO stress if the signal exhibited differential expression according to the specified amplitude (effect $\geq \log_2(2)$) and false discovery rate (q-value $\leq 0.05$) cut-offs. Reciprocally, under expression was considered detected when effect $\leq -\log_2(2)$, q-value $\leq 0.05$.

### 4. Bio-informatical analysis of the region

The region of interest is defined between the nucleotides 2,097,000 and 2,140,000 (NC_018877.1) for all bioinformatical analysis.

The mapped paired-end reads were visualised along the genome with IGV tools [150].

The prokaryotic promoter search has been done through the Fruitfly seq tool (only results with a score between 0.8 and 1 were taken into account) and by FGENESB: Bacterial Operon and Gene Prediction [151].

The presence of putative regulator-binding regions was identified using the FIMO tools version 5.0.3. Only sequence with a pvalue < $10^{-6}$ and q-value < 0,01 were taken into account [152]. The Fur box were found using the Pairwise Sequence Alignment, EMBOSS Needle.

| Regulators | Consensus sequences | Sources |
|---|---|---|
| FNR | TGTGANNNNNNTCACA | [153] |
| NsrR | AANATGCATTT | [154] |
| ResD | TNTNANNANTNTNTGACAANT | [155] |
| Fur | GATAATGATAATCATTCT | [156] |

**Table 1: Consensus sequences of DNA binding sites**

5. Reverse transcription quantitative PCR (RT-qPCR)

For the analysis of the gene expression in different conditions of stresses, RT-qPCR was performed. The RNA harvested after stresses were reverse transcript with Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (04897030001, Roche) followed by the PCR reaction with Brilliant II SYBR Green qPCR Master Mix (600828, Agilent) in the StepOnePlus™ Real-Time PCR system. Each sample was quantified in technical duplicates.

| Locus Tag | Primer forward | Primer reverse |
|---|---|---|
| BTB_RS10830 | GAAAATGAACATAACCACGCTG | TGTAAACAAGTCGATAAGTGCC |
| BTB_RS10825 | GACCAAATACGCAAATAGCAAG | TTCATAAAGAGGGGCAACAAG |
| BTB_RS10820 | TCATAAAAACGGACCATTAGCC | TGTCACCATCAATGACTTCTAC |
| BTB_RS10815 | CGACAAGCAGGAAAAAAAGAAG | GTAATGAAACGACATCACCAAC |
| BTB_RS10805 | AGAATCATCGTTTCACACACC | GTTCCTGCTTCATACGCTTC |
| BTB_RS00795 | TAACTCCTTACGTCGTATTC | ATTTCCAACGTCTTCTCTTC |

**Table 2: List of qPCR primers**

The gene *rpoA* (BTB_RS00795) was used as endogenous control, and were included for each sample. The condition without stress was used as the reference condition.

The average and the standard deviation of RQ for each condition were calculated from the expression values of biological triplicates.

As a result, the relative quantification of gene expression was shown.

RQ = Relative quantification = $2^{-\Delta\Delta Ct}$

## III. Results

### A. Resistance of *B. cereus* to NO stress

In order to understand *B. cereus* resistance to NO, an NO stress was applied to the bacteria for a short time (15min) and a longer time (60min) at concentrations close to *in vivo* ones (10 and 50µM). With a transcriptomic approach, the *B. cereus* response was investigated.

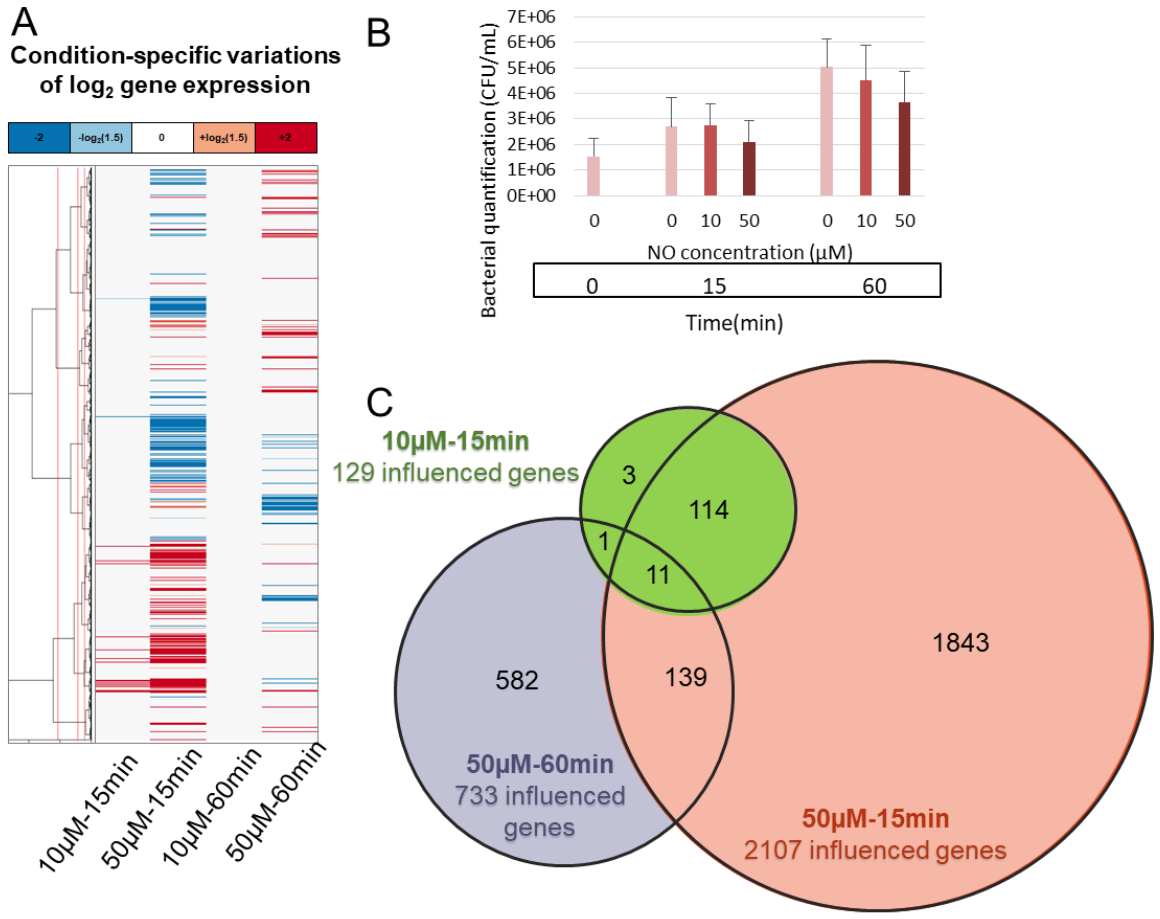



**Figure 1: RNA sequencing on *Bacillus cereus* after nitric oxide stress**
Bacteria were exposed to NO stress (10µM or 50µM) for 15 or 60 minutes at 37°C without agitation. mRNA was extracted and sequenced by NextSeq**. A)** Differentially expressed genes profiles based on reads mapped on reference genome of Bc407 (NC_018877.1) aggregated at gene level shows the overexpressed (in red) or under expressed (in blue) genes. Genes are clustered in co-expression groups; **B)** the bar chart represents the bacterial load for each condition; **C)** the repartition of the influenced genes in each conditions.

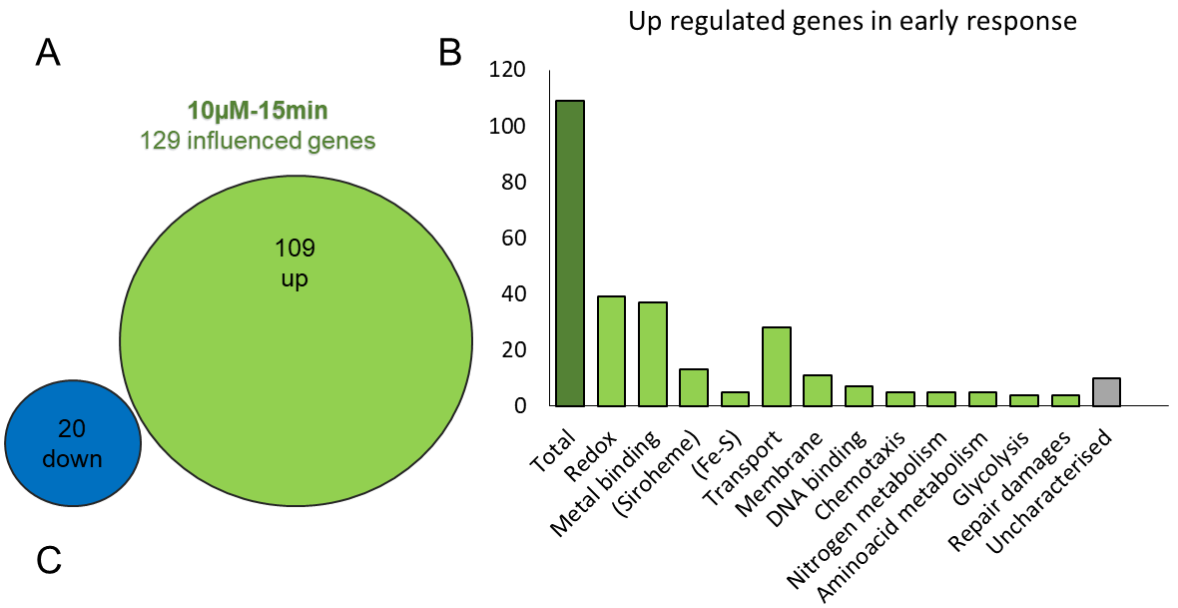
First, the actual NO concentration was verified by the Griess assay for each condition. At 15 min the average concentrations were close to the ones expected (9.4 and 60.1µM) and slightly decrease after 1 hour (4.6 and 39.0 µM) (*cf.* Annexe 2). Then, the quantification of bacterial before and after the NO stress shows that 10µM of nitric oxide induce a slight but not significant decrease of bacterial survival which is amplified at 50µM. This result indicates that those NO stress conditions do not have a significant impact on bacterial survival.

The impact on gene expression was then investigated. Nitric oxide at 10 or 50 µM does have an influence on gene regulation. After 15 min there are 129 and 2107 genes influenced by 10 or 50 µM of nitric oxide. But after 60 min there were no more gene significantly influenced at 10µM of nitric oxide and 733 at 50µM. There is a dose response effect, the more NO is added the more genes transcription level are changed (16 times more genes at 50 µM than at 10). 2107 genes represent one third of *B. cereus* gene (6758 genes in total).

The effect of nitric oxide on gene expression is higher after a short period of time and dose dependent (Figure 1).

After 15 min, the influenced genes at 10 µM are also at 50 µM except 4 (BTB_RS05820, BTB_RS16655, BTB_RS18840, BTB_RS34095). Most of the genes involved after 15min are different from those at 1 hour (Figure 1C). This indicates an early transcriptomic response after 15 min and a late one after one hour.

Our study focuses on the early response to 10µM of nitric oxide. At this condition, 109 genes are up regulated and 20 are down (Figure 2A).




C

| Effect ($Log^2$) | Locus_tag | Gene name | Product | Start |
|---|---|---|---|---|
| + 8.7 | BTB_RS10830 | *ric* | iron-sulfur cluster repair di-iron protein | 2102904 |
| + 5.8 | BTB_RS07355 | | NO-inducible flavohemoprotein | 1434746 |
| + 5.3 | BTB_RS17205 | | hydroxylamine reductase | 3399147 |
| + 4.3 | BTB_RS09885 | *cydC* | thiol reductant ABC exporter subunit | 1925663 |
| + 4.2 | BTB_RS10820 | *nirD* | nitrite reductase small subunit NirD | 2099957 |
| + 4.2 | BTB_RS10810 | | sirohydrochlorin chelatase | 2097767 |
| + 3.9 | BTB_RS09880 | *cydD* | thiol reductant ABC exporter subunit | 1923945 |
| + 3.7 | BTB_RS09875 | *cydB* | cytochrome d ubiquinol oxidase subunit II | 1922929 |
| + 3.6 | BTB_RS04380 | | hypothetical protein | 851653 |
| + 3.5 | BTB_RS10815 | *cobA* | uroporphyrin-III C-methyltransferase | 2098474 |
| + 3.2 | BTB_RS10805 | | precorrin-2 dehydrogenase | 2097301 |
| + 3.2 | BTB_RS18075 | *nrdD* | anaerobic ribonucleoside triphosphate reductase | 3592867 |
| + 3.2 | BTB_RS10825 | | NADPH-nitrite reductase large subunit | 2100290 |
| + 3.1 | BTB_RS09870 | | cytochrome ubiquinol oxidase subunit I | 1921539 |
| + 3.0 | BTB_RS25855 | | methyl-accepting chemotaxis protein | 5049165 |

**Figure 2: Early response to NO stress at 10µM**
Analysis of the gene expression after 15min of NO stress with 10µM; **A)** the sequencing of the mRNA shows 129 genes influenced by the addition of 10µM of NO, 109 are up and 20 are down regulated; **B)** repartition of the 109 up regulated genes (dark green) in functional groups (light green) or with uncharacterized functions (grey); **C)** the table lists the 15 most impacted genes by 10µM of NO stress for 15min. The first column is the effect on the transcriptional level. Genes highlighted in yellow are in close proximity within the genome.

The analysis of the genes up-regulated in these conditions shows that one third of them are involved in redox process and another third in metal binding (Figure 2B). The table (Figure 2C) represents the 15 most influenced genes after 15min under the 10 µM condition, all 15 genes are highly over-activated: between 8 to 400 times more expressed in

presences of NO. During this early response, the most activated gene in the presence of NO is the *ric* gene that encodes an enzyme involved in the repair of iron-sulphur clusters, followed by a flavoheamoglobine (*cf.* Annexe 3).

In addition, an *in silico* analysis of the Bc407 genome reveals that among the upregulated genes, 5 genes are neighbours of the *ric* gene on the genome. They are encoding the two subunits of nitrite reductase, and enzyme of siroheme biosynthesis: uroporphyrin-III C-methyltransferase, sirohydrochlorin chelatase, precorrin-2 dehydrogenase (Figure 2C).

We can see that 13 genes out of 109 up regulated after NO stress are related to siroheme and 5 to iron-sulphur cluster

**B. A 6 genes region over activated by nitric oxide in the early response**

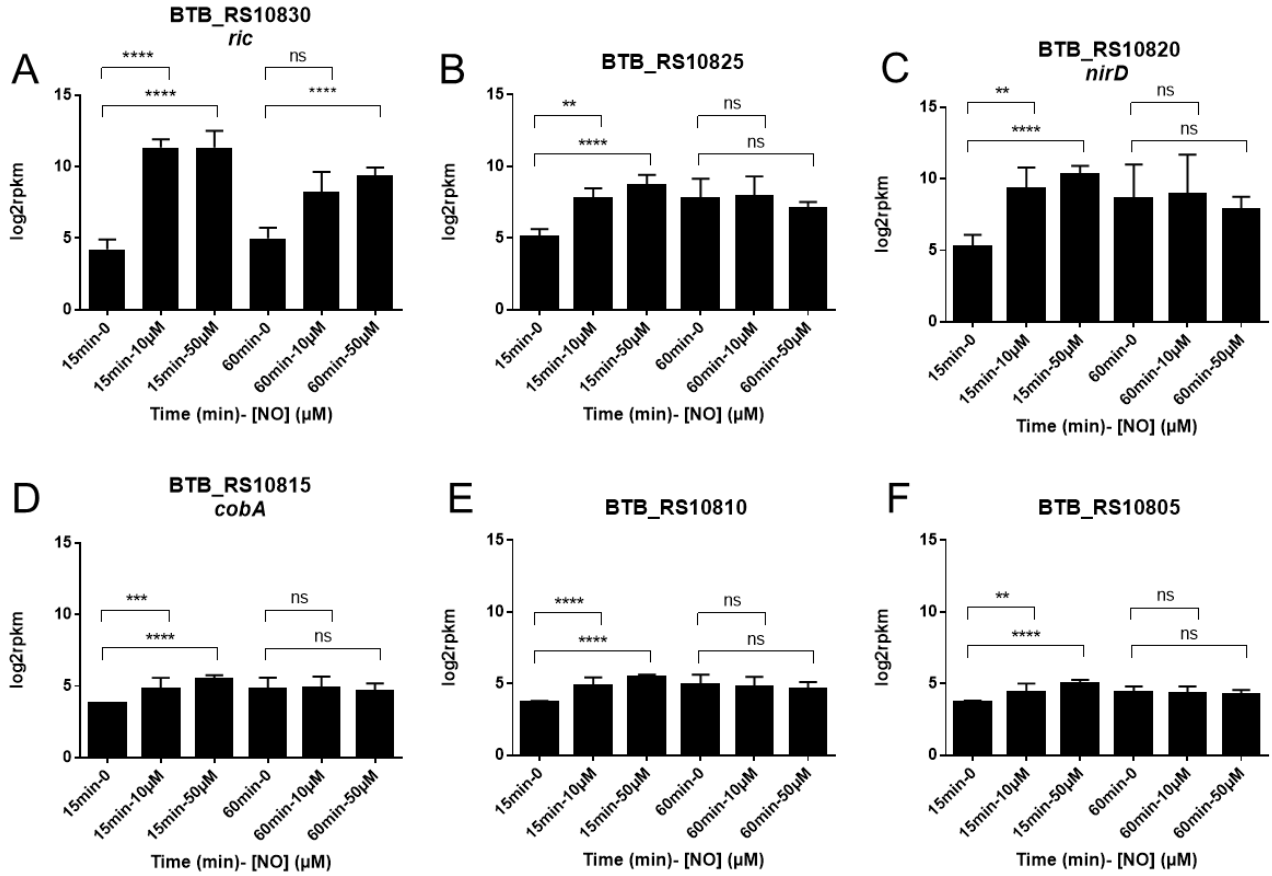



**Figure 3: Expression of the gene cluster by RNA sequencing during NO stress**

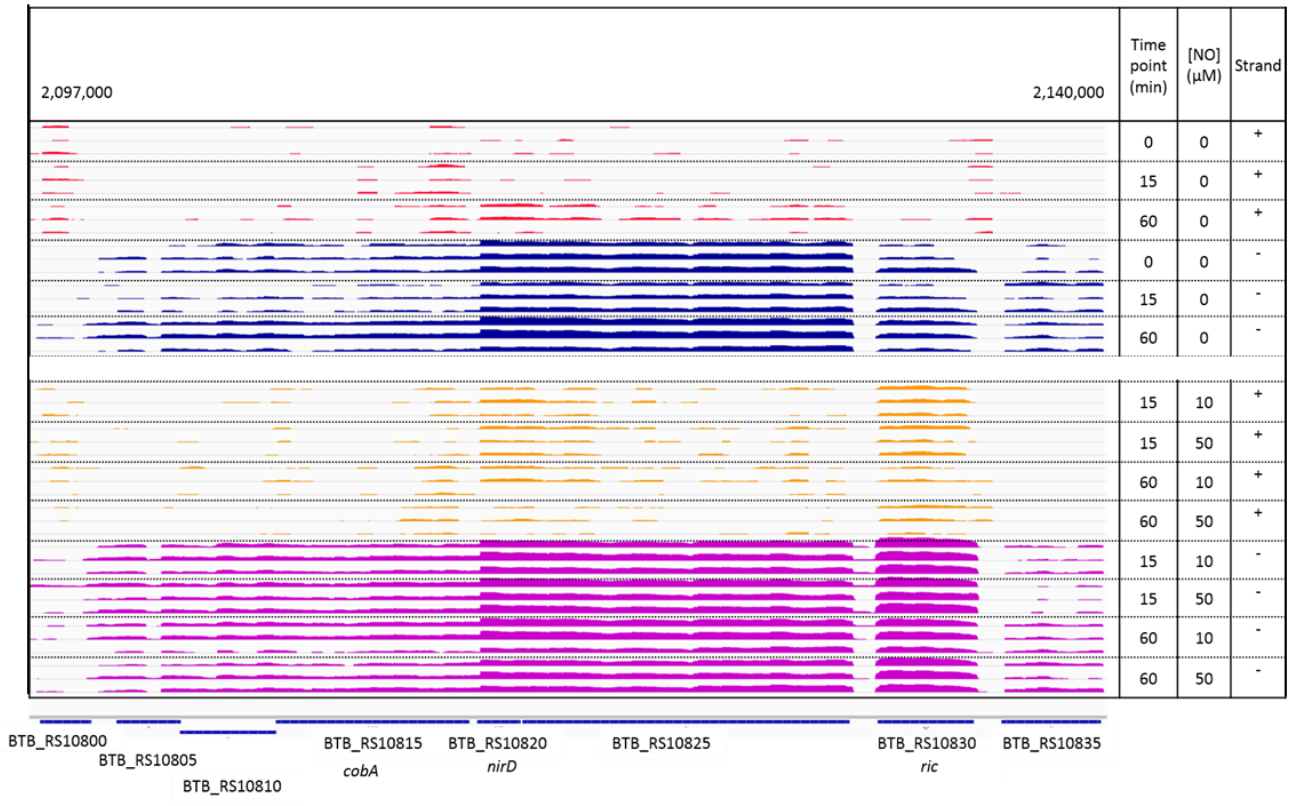
Gene expression (in Log2 of Reads Per Kilobase Million) under each condition was normalized to the condition 15min without stress. Bacteria were exposed to NO stress (10µM or 50µM) for 15 or 60 minutes at 37°C without agitation. Average and standard deviation from three independent experiments are shown. (ns, not significant, * q-value<0.05, ** <0.01 *** <0.001, **** <0.0001); **A)** BTB_RS10830 encoding for RIC; **B)** BTB_RS10825 encoding for the large sub unit of the nitrite reductase; **C)** BTB_RS10820, the small sub unit of the nitrite reductase (NirD); **D)** BTB_RS10815 the uroporphyrin-III C-methyltransferase; **E)** BTB_RS10810, the sirohydrochlorin chelatase; **F)** BTB_RS10805, the precorrin-2 dehydrogenase;

The analysis of messenger RNAs sequencing made it possible to demonstrate that the 6 genes of the region of interest were significantly overexpressed in the presence of NO at 10 µM and at 50 µM after 15 minutes of stress. Those 6 genes are part of the top 15 genes most influenced by 10µM of nitrite oxide after 15min.

However, it seems that after 1 hour of stress, only the *ric* gene is still overexpressed (Figure 3A). The other genes BTB_RS10825, BTB_RS10820, BTB_RS10815, BTB_RS10810 and BTB_RS10805 do not appear to be influenced by induced stress after 1h (Figure 3B, C, D, E, F).

## C. Organization and regulation of the region of interest

A



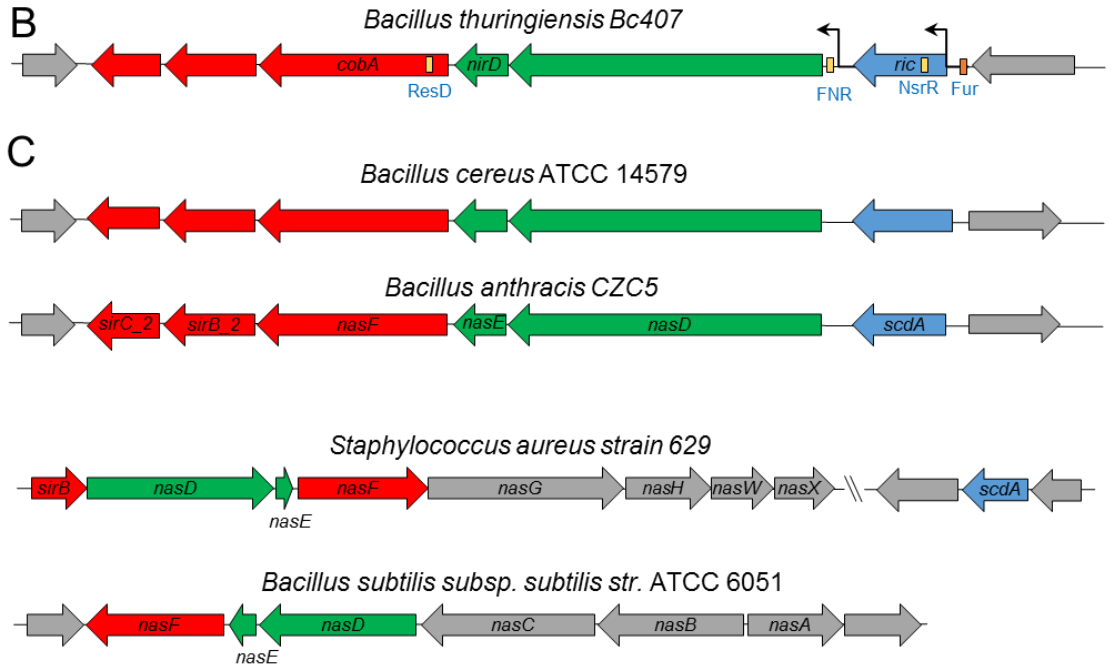



**Figure 4: Visualization of the area of interest**
**A)** Representation of the mRNA fragment mapped to the area of interest on the positive strand (red and yellow) and on the negative strand (blue and purple). Each line corresponds to each replicate of each condition: Without NO (red and blue) or with NO (yellow and purple). The last line is the annotated area of the reference strain *Bacillus cereus* Bc407 (NC_018877.1). **B)** Schematic representation of the area (not to scale). The yellow boxes indicate the putative presence of regulatory binding regions. The black arrows indicate putative promoters. **C)** Schematic representation of the area of interest in other species of *firmicutes* (not to scale).

In order to characterize this region, the IGV tool was used to visualize the sequenced transcripts mapped along the region. The thickness of the line corresponds to the number of reads mapped on the sequence in a log scale. Each line represents a biological replicate of each conditions.

The mapping occurs mostly in the negative strand (blue and purple) suggesting that the genes of region are located on the negative strand, which is in agreement with the ncbi annotation (Figure 4A).

The representation makes it possible to visualize the increase of expression in the presence of NO (in purple) and especially the *ric* gene.

There is a decrease of transcription after the *ric* gene. Then the two nitrite reductase genes seem to be transcripted together at the same level. Followed by 3 genes coding for uroporphyrin-III C-methyltransferase, sirohydrochlorin chelatase and precorrin-2 dehydrogenase, which maintain the same level of expression in a given condition.

In view of these levels of expression, three sub-groups of genes can be identified within this cluster. The first contains only *ric* (in blue) Figure 4B, then the two subunits of nitrite reductase (in green) and finally the genes BTB_RS10815, BTB_RS10810 and BTB_RS10805.

To identify potential promoters and terminators, a pattern analysis of the sequence was performed. The fruityfly tool was used and two promoter regions were identified with scores of 0.98: one upstream of the *ric* gene and the other upstream of the BTB_RS10825 gene. However, with this same tool, no promoting region with a score greater than 0.8 could be identified upstream of *cobA* gene, or anywhere else in the region. FGENESB tools confirms those results: it found the *ric* genes followed by an operon of 5 genes.

In addition, FIMO tools were used to identify patterns of regulators fixation. At the beginning of *ric* gene there is a putative region of attachment of the NO-sensitive inhibitor, NsrR. There is no homolog of the protein NsrR in Bc407 genome. But a PSI-Blast analysis highlights three proteins (WP_000877649.1, WP_000704116.1, WP_001083465.1) with less than 30% identity with *B. subtilis* NsrR. Those protein functions are unknown, but they belong to Rrf2 family of transcriptional regulator such as NsrR.

Upstream of the BTB_RS10825 gene, there would be an FNR binding site. At the beginning of *cobA* gene there is a putative region of attachment of ResD.
Upstream of the *ric*, a putative fur box were identify by pairwise alignment, but its score was not high enough to be found with FIMO tools.

To assess the specificity of this region in *B. cereus* group, other close related bacteria were analysed. Homolog genes were found in other species using Blast and their localization were compared using ncbi database.
First, we confirmed that *Bacillus cereus* ATCC 14579 and Bc407 had a similar organization. Moreover the organization of this region is preserved in *Bacillus anthracis*, which belongs to the *Bacillus cereus* group (Figure 4C).
However this organization is not preserved in other members of the *firmicutes*. In *Staphylococcus aureus*, the homolog of *ric* is not in the neighbourhood of the nitrite reductase genes (Figure 4C).
In *Bacillus subtilis*, the nitrite reductase (green) and the siroheme synthesis genes (red) are associated but this bacteria does not have a *ric* homolog.
Other species (*Escherichia coli Pseudomonas aeruginosa*, *Mycobacterium tuberculosis)* were compared too. They are more distant from *Bacilli* on the phylogenetic tree. No region containing the associated three parts could be identified (results not shown).

### D. Specificity to NO stress

Putative regulators binding region were identified by sequence analysis: NsrR, and FNR, which are respectively involved in resistance to NO and in nitrate/nitrite reductase systems. The impact of NO, nitrite, nitrate on *ric* and the region was assessed by RT-qPCR.

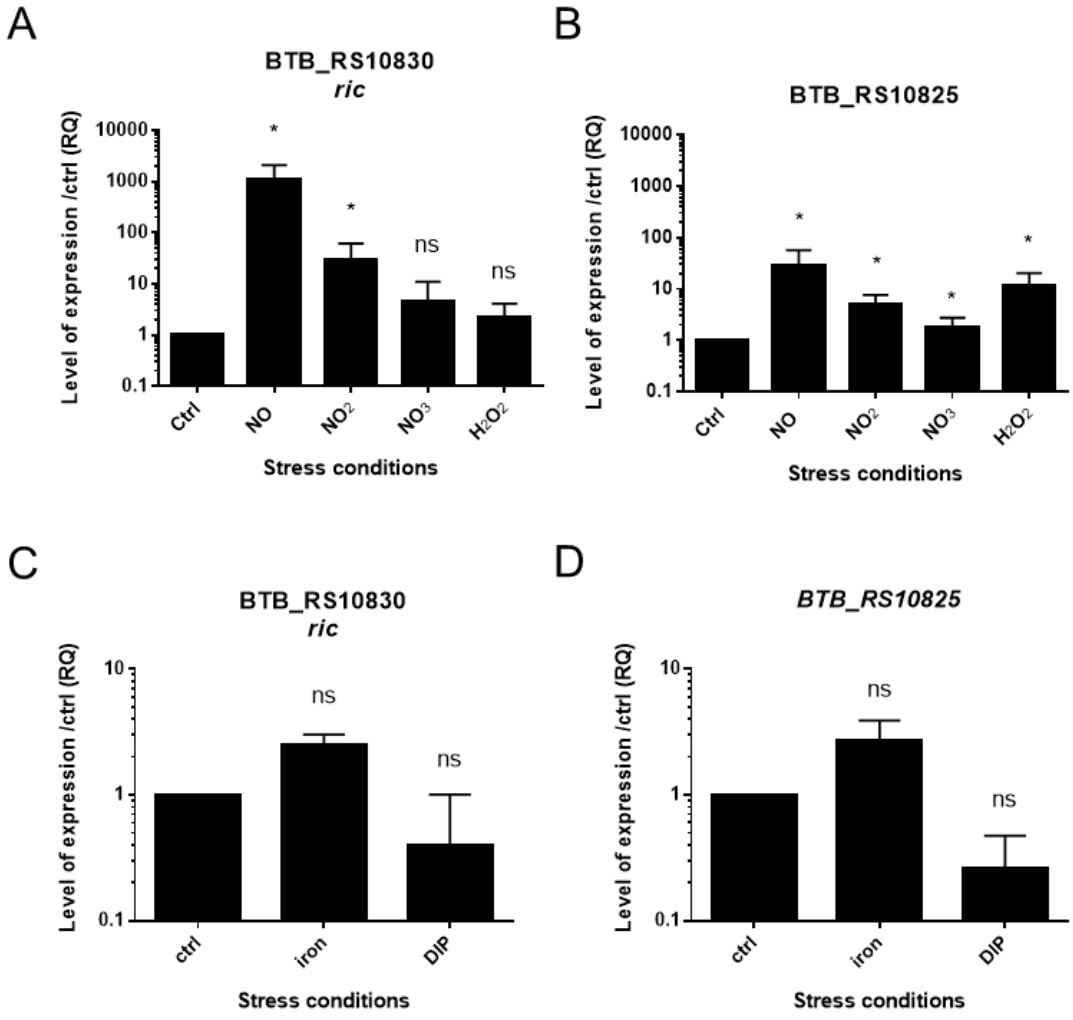



**Figure 5: Gene expression analysis by RT-qPCR during multiple stresses.**
Gene expression of *ric* and BTB_RS10825 that encodes the large subunit of the nitrite reductase under each condition was normalized to the reference gene *rpoA* and to the non-stressed condition (Ctrl) (RQ: relative quantification). **A,B)** Bacteria were stressed for 15 minutes at 37°C without agitation with 10µM of NO, 2.5mM of sodium nitrite, 20mM potassium nitrate, 0.03% of hydrogen peroxide, respectively**. C,D)** Bacteria were grown for 1 hour in an iron-free medium (RPMI). They were then incubated for 15 min in the presence of excess iron (81µM of iron citrate) or an iron-specific chelating agent (4,4µM 2,2'-dipyridyl (DIP)) or RPMI medium alone. Average and standard deviation from three independent experiments are shown. Statistically significant increases of expression in comparison to the control are indicated with asterisks (Mann-Whitney; ns, not significant, *p-value<0.05).

RT-qPCR analysis confirms the activation of *ric* and BTB_RS10825 (nitrite reductase, large sub-unit) genes in NO (10µM) conditions. There is consistency between RT-qPCR analysis and RNAseq.

Figure 5A shows that the *ric* gene is significantly upregulated by nitrites, but not significantly by nitrates.

In addition, Figure 5B shows that the BTB_RS10825 gene encoding the large subunit of nitrite reductase is upregulated by an excess of nitrite, nitrate.

On another hand, NO stress is a nitrating and oxidizing stress. In order to see if another oxidizing agent such as $H_2O_2$ also regulates the gene of this region, the bacteria were stressed for 15min by $H_2O_2$ and gene expression was measured by RT-qPCR. The gene of the nitrite reductase is over-activated by hydrogen peroxide, but not *ric*.

The expression of *cobA*, BTB_RS10810 and BTB_RS10805 was also investigated, but its level of expression was low and close to the noise, so the results were not conclusive.

A putative Fur (Ferric uptake regulator) box was also found in the promoter region of *ric*. The gene expression of the region of interest was investigated to observe impact of iron. *ric* and BTB_RS10825 are slightly activated by an excess of iron and inhibited by a starvation, but those results are not significant according to the variation between the replicates.

## IV. Discussion

*Bacillus cereus* is an emerging pathogen capable of resisting macrophages [74]. During phagocytosis a lot of nitric oxide is secreted (10µM) [6]. The bacteria has to trigger pathways to fight it. By a transcriptomic approach, *B. cereus* response to NO is investigated.

We induce a stress with NO donor to mimic the NO production during host immune response. In this conditions, *B. cereus* does survive the stress (Figure 1B). Then the gene expression was investigated to understand how it did resist.

The mRNA sequencing shows a dose effect and a time effect of NO. There is a strong early response and a weaker late response where less gene transcription is influenced. This correlates with the diminution of NO concentration after one hour. Indeed several genes encoding NO detoxification enzymes are highly upregulated: flavohaemoglobin, nitrite reductase, hydroxylamine reductase (Figure 2C).

During the early response, the most upregulated gene is *ric*. The *ric* (repair of iron center) gene encodes a protein involved in the repair of iron-sulphur clusters of proteins. An iron-sulphur cluster is an atom group containing two to four iron atoms, linked to $S^{2-}$ sulphide anions present in some proteins [12]. These groups are present on metalloproteins and give them oxido-reduction properties. Iron-sulphur group-containing proteins are one of the main targets of NO. Some of the [Fe-S] proteins are regulatory proteins whose [Fe-S] react with NO to control their transcriptional or translational activity [14].

NO, as well as its derivatives, can therefore modulate the function of these proteins by nitrosylating or disassembling [Fe-S] clusters, which contributes to the effect that NO has on bacteria [15].

The RIC (Repair of Iron Center) protein of *Bacillus cereus* is conserved in prokaryotes, Gram positive and negative pathogenic bacteria. It has between 40.0% and 36.2% identity with variant of *Staphylococcus aureus* ScdA (E-value = 2.00E-52), 36% identity with YtfE of *Escherichia coli* (E-value = 4E-40) 35.7% identity with DnrN or NorA from *Klebsiella pneumoniae* (E-value = 2E-40).

YtfE and ScdA have two iron atoms. They belong to the RIC family (repair of iron center). Those proteins are involved in the assembly and repair of iron-sulphur groups. The expression of their genes is regulated by FNR and by iron trough Fur. *ytfE* is regulated by NsrR in *E. coli* but this regulator is absent in *S. aureus* and *B. cereus* [59].

*ric* expression is upregulated by NO and nitrite. The sequence analyse highlights a putative Fur and NsrR binding sites that might regulate *ric* expression or the entire region.

Fur is a regulator of iron uptake, but its involvement could not be confirmed.

The region between nucleotides 2,097,000 and 2,140,000 (NC_018877.1) in the neighbourhood of *ric* contains 5 genes on the negative strand that are also overexpressed in NO condition. According to ncbi annotation these genes are *ric* followed by BTB_RS10825 and BTB_RS10820 (*nirD*) which encode the large and small subunit of NADPH-nitrite reductase and by BTB_RS10815, BTB_RS10810 and BTB_RS10805 which respectively code for uroporphyrin-III C-methyltransferase, sirohydrochlorin chelatase and precorrin-2 dehydrogenase.

NADH-dependent nitrite reductase exists in fungi and bacteria and is used for the assimilation of nitrogen from nitrate or nitrite in anaerobic condition. It is also involved in metabolism and

resistance to NO. This cytosolic enzyme is an oxidoreductase that catalyzes the reduction of nitrite to ammonia through an Iron-Sulphur cluster and three cofactors, FAD, iron and siroheme. In *E. coli*, its expression is regulated by FNR [44,128].

In this study, we showed that BTB_RS10825 encoding the nitrite reductase of Bc407 is upregulated by NO, nitrate, nitrite and $H_20_2$. A FNR binding site was found upstream. FNR is a global regulator that controls numerous pathways: nitrate and nitrite uptake, ROS and NO resistance and iron might also play a role in FNR regulation [137,157].

In our region of interest on the Bc407 chromosome, the three genes that follow *nirD* code for an uroporphyrin-III C-methyltransferase, a sirohydrochlorin chelatase and a precorrin-2 dehydrogenase. These three enzymes are part of the pathway and biosynthesis of siroheme from uroporphyrinogen III [158]. Siroheme is a tetrapyrroleic group that can bind to certain enzymes that have redox activities, including nitrite reductase. This cofactor is used by prokaryotes, plants and fungi, but is absent from higher eukaryotes. It participates in the assimilation of nitrites and sulphites by these organisms as sources of nitrogen and sulphur [129].

Thus, this region includes a key enzyme for the metabolism of the bacterium, the nitrite reductase. The genes encoding this enzyme are in a region that is overexpressed in NO condition. In addition, this enzyme requires a sulphur iron group and siroheme to be functional. These two groups containing at least one iron atom, and are thus NO targets. In addition, the genes that encode this enzyme are surrounded by genes involved in the synthesis or repair of these two ferrous moieties.

This enzyme, which is involved in the metabolism of NO, is also a preferred target of this powerful oxidizing agent. Therefore, *B. cereus* seems to have at his disposal the weapons to fight against the host NO response. On the one hand, the *ric* gene repairs the sulphur iron cluster of the nitrate reductase and on the other hand the three enzymes encoded by BTB_RS10815, BTB_RS10810 and BTB_RS10805 synthesize siroheme to maintain its reducing activity.

In conclusion, there are a co-expression, a co-localization and a functional link between the genes of this region.

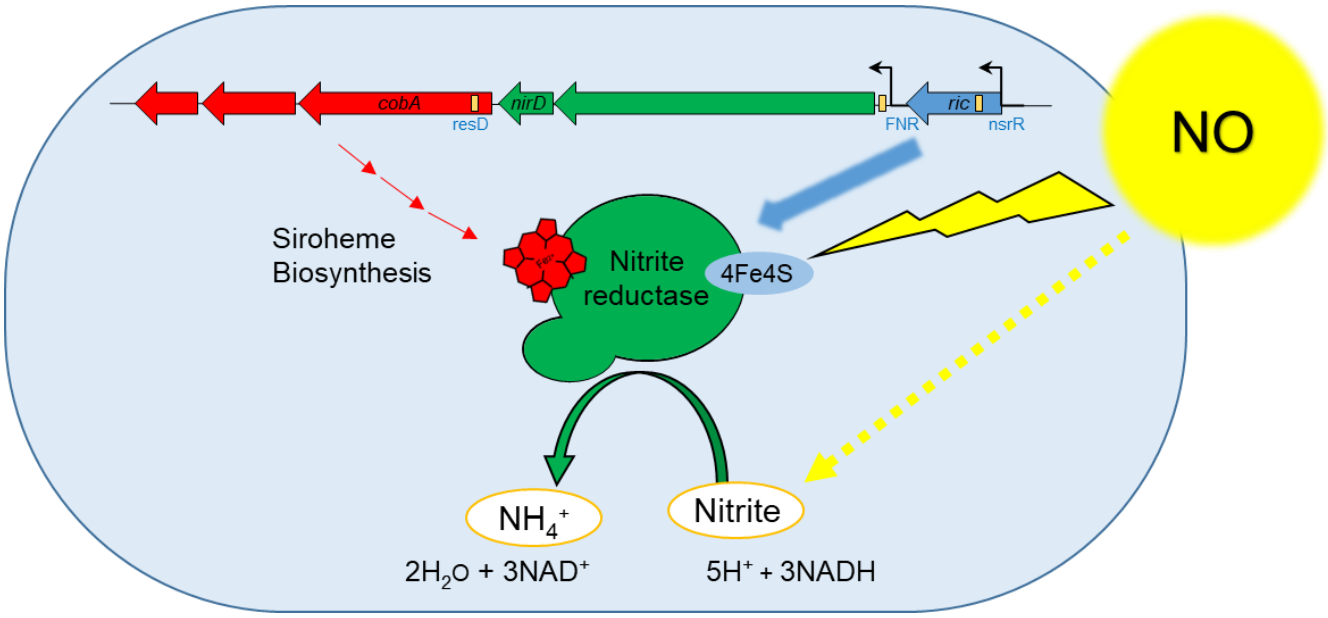



**Figure 6: Study model in *Bacillus cereus***
The three genes in red encode proteins involved in the biosynthesis of siroheme. Siroheme is a cofactor required by nitrite reductase to function. The green genes encode the two subunits of a soluble enzyme: the nitrite reductase. Nitrite reductase possesses an iron-sulphur cluster. Owing to its cluster and its cofactor, the enzyme reduces nitrites to ammonium. NO can be oxidized into nitrite. It is also capable of binding iron (Cluster Fe-S and siroheme). The *ric* gene in blue encodes for a protein involved in iron cluster repair.

The *scdA* and *ytfE* mutants of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*, respectively, are more sensitive to NO than wild-type strains [42,43].

This cofactor is little studied at present. In *Aspergillus fumigatus*, the mutant that does not produce siroheme has diminished resistance to NO and virulence in the insect [129].

Now, the involvement of this region in resistance to NO and in virulence of *B. cereus* must be identified.

**Acknowledgment**

Great thanks to the Professor S. Bury Moné from the University Paris Saclay and the students from the Fundamental Microbiology Master (2018-2019) for their work with the RNAseq data and the RT-qPCR, I2BC Paris-Saclay platform for the RNAsequencing and Océane Bataille for the helpful manuscript corrections.

# Chapitre 2 : La réponse au NO cible d'un antibiotique innovant - Un inhibiteur dirigé contre Mfd-

## I. Introduction

Les antibiotiques ont considérablement réduit la mortalité associée aux maladies infectieuses. Cependant, leur efficacité et leur accès facile ont conduit à une sur utilisation, poussant les bactéries à développer une résistance contre ces composés. Les principaux cas de bactéries résistantes chez les patients hospitalisés comprennent *Staphylococcus aureus* (SARM), *Pseudomonas aeruginosa* et *Klebsiella pneumoniae* induisant des septicémies et des pneumonies.

Les antibiotiques actuels et nouvellement développés sont souvent basés sur des voies générales et essentielles à la bactérie et ainsi ont un large spectre d'action. L'inconvénient, comme ils ciblent des voies essentielles, est qu'ils ne sont pas spécifiques des pathogènes. Le risque de développer une résistance est élevé et ils peuvent être nuisibles pour la flore hôte. Depuis 20 ans, la découverte de nouveaux antibiotiques est en diminution constante et aucune nouvelle classe ou nouvelle cible bactérienne n'a récemment été proposée sur le marché. Dans le même temps, des bactéries résistantes aux médicaments se sont propagées dans les établissements de soins et provoquent 23 000 décès par an dans l'UE.

De nouveaux médicaments pour lutter contre les infections bactériennes sont donc nécessaires de toute urgence. C'est un défi majeur, mais pour une conception efficace de nouveaux médicaments il faut trouver la cible bactérienne appropriée.

L'équipe du Dr Rama Rao de l'Institut Micalis a identifié et caractérisé la protéine Mfd (Mutation Frequency Decline) comme une nouvelle cible thérapeutique dans la lutte contre les infections bactériennes. Mfd est une protéine de réparation de l'ADN présente dans presque toutes les bactéries et absente chez les eucaryotes supérieurs [159].

Dans le cadre de mon projet de thèse, une méthode de test d'efficacité d'inhibiteur de Mfd a été mise au point sur cinq modèles bactériens, pathogènes de l'Homme, lors de tests sur bactéries seules et sur un modèle d'infection *in vivo*, sur l'insecte. J'ai donc pu démontrer une efficacité de ce composé sur la survie bactérienne et sur la survie de l'insecte.

Pour des raisons de confidentialité et de protection des propriétés intellectuelles, cette partie de ma thèse ne peut pas être diffusée et a donc été supprimée de cette version du manuscrit.

# Discussion Conclusion

Le monoxyde d'azote est un composé radicalaire très intéressant. Il est ubiquitaire et a des fonctions importantes notamment chez les animaux, les bactéries, les plantes et les champignons. Il est également présent dans la nature en tant qu'intermédiaire du cycle de l'azote dans l'atmosphère où il est considéré comme un polluant.

Chez les animaux, il est impliqué dans la neurotransmission et l'homéostasie des vaisseaux lorsqu'il est produit en faible concentration et dans la réponse immunitaire innée pour lutter contre les infections quand il est produit en grande quantité [6].

En effet, les pathogènes comme les bactéries ou les champignons déclenchent la réponse immunitaire innée et doivent y résister pour infecter l'hôte. Le NO cible de façon non spécifique tous les composants cellulaires qu'ils soient eucaryotes, procaryotes, du pathogène ou de l'hôte. Les organismes ont dû mettre au point des mécanismes de résistance à ce stress.

Lors de ce projet, nous avons plus particulièrement étudié la réponse de la bactérie *B. cereus*. C'est une bactérie de l'environnement qui peut induire des infections locales, gastro-intestinales ou systémiques chez l'homme. Au cours de l'infection, cette bactérie est capable de résister aux macrophages, cellules de l'immunité productrices de NO[74].

Dans cette thèse, j'ai tout d'abord analysé la réponse de *B. cereus* lors du stress NO, puis j'ai participé à l'étude d'un antibiotique dirigé contre les mécanismes de résistance au NO. Enfin, j'ai participé à un projet confidentiel sur la caractérisation du biomarqueur « A » de *B. cereus* qui semble entre autre être impliqué dans la résistance au NO.

Par une approche transcriptomique, nous avons pu caractériser la réponse de cette bactérie au NO pour la première fois. Nous avons aussi mis en évidence une région du génome particulièrement activée en présence de NO. Cette région code pour 6 protéines : la première, RIC, est impliquée dans la réparation des clusters fer soufre endommagés par le NO, suivie de la NADPH-nitrite réductase et par trois enzymes de la biosynthèse du sirohème. Ce dernier est un groupement porphyrique proche de l'hème.

Ces clusters fer-soufre sont présents sur les métalloprotéines et leur confèrent des propriétés d'oxydo-réduction. Les protéines contenant des groupes fer-soufre sont l'une des principales cibles du NO [14]. Les protéines de réparation peuvent restaurer l'activité de ces protéines[136].

La nitrite réductase dépendante du NADH existe chez les champignons et les bactéries. Elle est impliquée dans le métabolisme et la résistance au NO. Cette enzyme cytosolique est une oxydoréductase qui possède un cluster fer-soufre et lie le sirohème [44 128].

Il faut donc vérifier que la présence de RIC, de la nitrite réductase, d'une ou plusieurs enzymes de biosynthèse du sirohème sont également nécessaires à la résistance au NO et/ou à la virulence de *B. cereus*. Lors de l'infection, ces enzymes peuvent être nécessaires pour lutter contre le NO du système immunitaire mais également pour assimiler l'azote, le fer et résister au stress oxydant.

L'approche transcriptomique de ce projet offre de nombreux axes pour la recherche de nouveaux facteurs de virulence. Il reste en effet près de 120 gènes de la réponse précoce et 700 de la réponse tardive au NO à analyser.

En outre, comprendre les mécanismes des bactéries pour résister aux attaques du système immunitaire permet la découverte de nouvelles armes de lutte contre les infections. Avec l'augmentation de l'antibiorésistance, la recherche d'alternatives thérapeutiques contre les bactéries pathogènes devient un enjeu majeur de santé publique.

Grâce à l'étude de la réponse NO, l'équipe du Dr Rama Rao a mis en évidence une cible d'antimicrobien. Mfd (Mutation Frequency Decline) est une enzyme impliquée dans les réparations des dommages de l'ADN causés par le NO. Une nouvelle classe d'antibiotiques dirigés contre Mfd est en train d'être développée. Lors de ce projet, nous avons montré qu'un inhibiteur de Mfd, le NM102 était capable de diminuer la survie des bactéries en présence de NO et que cela se traduisait par un léger effet antibiotique lors de l'infection. Par la suite, de nouvelles formulations vont être testées pour augmenter la solubilité du composé et améliorer son efficacité.

Le projet repose sur une approche pluridisciplinaire combinant une expertise en interactions hôte-pathogène, utilisation de modèles animaux originaux, microbiologie, biochimie, modélisation *in silico*, analyse structure / fonction, validation de médicaments, stratégies de valorisation et ciblage du marché pharmaceutique. À ce titre, il s'agit d'un projet novateur devant aboutir au développement de nouvelles molécules à fort potentiel biotechnologique et pharmaceutique. Cela aidera à proposer des options thérapeutiques nouvelles et efficaces comme complément ou alternative aux antibiotiques existants. En outre, il fournira également des informations sur les mécanismes utilisés par les agents pathogènes pour résister à la réponse immunitaire de l'hôte.

Ce projet a donc permis de mettre en place des méthodes d'évaluation précises de l'efficacité d'antibiotiques sur 5 pathogènes de l'homme dont *Bacillus cereus*, notre modèle d'étude, et 4 très préoccupants en terme de résistance aux antibiotiques : *Acinetobacter baumanii, Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae, Pseudomonas aeruginosas.*

Ces agents pathogènes se différencient des autres en raison de leur résistance accrue aux antibiotiques couramment utilisés tels que les pénicillines, la vancomycine, les carbapénèmes, etc. Cette résistance accrue, combinée à l'importance clinique de ces bactéries, se traduit par la nécessité de comprendre leurs mécanismes de résistance et de les combattre avec de nouveaux médicaments. Ces agents pathogènes constituent une menace supplémentaire pour la sécurité de la population, en particulier dans l'environnement hospitalier, car ils contribuent le plus souvent aux infections nosocomiales.

L'antibiorésistance ne concerne pas que les bactéries. Les virus, les champignons et les protozoaires échappent également à leurs traitements. Trouver des armes contre ces agents pathogènes est également crucial.

Actuellement, ils existent 4 classes d'antifongiques, les polyènes, les azolés, les antimétaboliques, les échinocandines. Ils ciblent des mécanismes essentiels à la survie des fungi. Ces médicaments ont de nombreux effets secondaires qui peuvent être graves (toxicité hépatique, rénale, hématologique et troubles neuropsychiques). Ils sont souvent dus à la ressemblance structurelle et métabolique des cellules fongiques et de celles des mammifères. De plus, les antifongiques sont classés comme « médicaments onéreux » et nécessitent une

tarification particulière à l'hôpital. Comme les antibactériens, le développement d'antifongiques a de nombreux impacts socio-économiques.

Lors de ce projet nous avons mis en évidence que le sirohème était impliqué dans la réponse au NO. Ce cofacteur présent chez les bactéries et les champignons, est très peu étudié actuellement. Il participe à l'assimilation des nitrites et des sulfites comme sources d'azote et de soufre. Il a été découvert en 1973 chez *E. coli* par Matthew J. Murphy et Lewis M. Siegel [168] et depuis il n'est retrouvé que dans 211 publications sur ncbi (plus de 50 000 sur l'hème).

Son rôle a été étudié chez le champignon pathogène *Aspergillus fumigatus*, où son mutant qui ne produit pas de sirohème a une résistance au NO et une virulence chez l'insecte diminuées [129].

Le sirohème est présent chez les procaryotes et les champignons, mais il est absent chez les eucaryotes supérieurs. Si son rôle dans la virulence bactérienne est confirmé, sa biosynthèse pourrait être une cible originale pour le développement d'un antibactérien antifongique combiné. Hélas, les gènes de synthèse du sirohème semblent absents des virus et des protozoaires (*Entamoeba histolytica*, *Plasmodium spp*).

Un inhibiteur de la synthèse du sirohème ainsi qu'un inhibiteur de Mfd ont pour but de rendre plus sensible le microorganisme pendant l'infection. Ces nouvelles classes d'antibiotiques épargneraient donc les agents « non infectants » et auraient donc un impact écologique réduit.

La consommation d'antibactériens dans le monde est estimée entre 100 000 et 200 000 tonnes par an, dont environ 50% pour l'usage vétérinaire. Cette surconsommation se traduit par une augmentation de la concentration d'antibiotiques dans l'environnement. Ils sont détectés dans les eaux usées et les systèmes de traitement ne les dégradent pas complètement.

En plus de l'usage médical, les antifongiques sont employés dans l'agriculture pour la conservation du bois, des semences agricoles ou des denrées alimentaires. Les antifongiques sont les deuxièmes pesticides les plus massivement utilisés dans l'agricultures en Europe [169].

Le mouvement « one health » crée dans les années 2000 vise à intégrer l'écologie aux problématiques de santé humaine et animale. Cette dimension écologique est très souvent relayée au second plan dans la recherche et développement biomédicale.

Les voies du NO peuvent également avoir un impact écologique. En effet, le NO et ses dérivés sont aussi retrouvés dans l'environnement et sont considérés comme des polluants de l'atmosphère nocifs pour la santé humaine. Le NO et le dioxyde d'azote ($NO_2$) conduisent à la formation de pluies acides et d'ozone troposphérique (ou « de basse altitude »). Le protoxyde d'azote ($N_2O$) se trouve dans la stratosphère où il joue un rôle dans l'effet de serre. La concentration de ces gaz devient préoccupante en termes environnementaux et sanitaires d'où la création de normes strictes pour l'industrie. Il y a un besoin de développer des technologies efficaces de réduction d'émission d'oxyde d'azote à faible coût [170].

Kartal *et al,*. ont découvert une bactérie anaérobie oxydant l'ammonium (appelée anammox) qui dépolluerait l'environnement du NO. *Kuenenia stuttgartiensis* utilise le NO par réduction et ne produit que du diazote ($N_2$) dans le processus.

Cette dernière capacité est particulièrement intéressante : il était connu que certaines bactéries convertissaient le NO en protoxyde d'azote ($N_2O$), qui est un puissant gaz à effet de serre. Le $N_2$, en revanche, est inoffensif. De cette façon, *K. stuttgartiensis* réduit la quantité de NO disponible pour la production de gaz à effet de serre. Ce micro-organisme contribue de manière significative à la diminution des rejets de $N_2O$ et de NO par les écosystèmes naturels et artificiels, tels que les usines de traitement des eaux usées [171].

## Conclusion

La réponse au NO est donc au centre de la pathogénèse de divers agents infectieux, elle peut être la cible d'antimicrobiens innovants et est également utile pour lutter contre la pollution atmosphérique.

Ainsi comprendre et maitriser les mécanismes de gestion du NO et de ses dérivés par les microorganismes pourraient avoir des débouchés en termes d'écologie en plus des applications médicales. Cette petite molécule est donc au centre de nombreuses problématiques actuelles : les infections, l'antibiorésistance, l'écologie et le réchauffement climatique.

# Bilan de la thèse

J'ai effectué ma thèse à l'institut Micalis de Jouy en Josas après avoir obtenu un financement de l'IDI (Initiative Doctorale Interdisciplinaire) de l'IDEX Paris Saclay en 2016. Ce programme doctoral interdisciplinaire avait pour objectif de « soutenir des projets de recherche interdisciplinaire, et d'encourager, dans ce cadre, les actions vers les applications de la recherche et en particulier celles en relation avec l'industrie ».

Ces travaux de thèse m'ont permis d'acquérir des compétences en bio-informatique et en analyse de données de séquençages haut débit. J'ai eu accès à des formations dans ce domaine (Analyses bio-informatiques des séquences moléculaires, Initiation aux traitements bio-informatiques des données du séquençage haut débit, 35h à l'INRA Jouy-en-Josas) et j'ai collaboré avec l'unité Maiage (Mathématiques et Informatique Appliquées du Génome à l'Environnement) de l'INRA par le biais de Cyprien Guérin et Pierre Nicolas.

L'implication dans les étapes de développement préclinique d'un projet d'innovation thérapeutique m'a permis de découvrir les réalités de ce domaine et de consolider mes compétences en microbiologie et en chimie thérapeutique et de me former à la manipulation de 5 bactéries pathogènes et à l'expérimentation *in vivo*.

Au cours de ma thèse, j'ai participé à l'encadrement de stagiaires de Master, Cassandre Bedu Ferrari (M1) et Fairouz Gzara (M2). J'ai également été impliquée dans l'enseignement et la conception de travaux pratiques pour les Masters : Master 1 Biodiversité & Génomes (4 semaines) et M2 Microbiologie fondamentale (3 semaines) de l'Université Paris-Saclay. Ces expériences étaient très enrichissantes et formatrices.

D'autre part, j'ai eu l'opportunité d'assister à deux congrès internationaux : *Challenges and new concepts in antibiotics research* à l'Institut Pasteur de Paris et au Colloque *Bactéries Sporulantes Pathogènes et d'Intérêt Technologique* par la SFM à Paris et de présenter mon projet de thèse au séminaire DocMicalis à l'INRAE de Jouy en Josas.

Enfin, le travail de bibliographie sur le monoxyde d'azote a été valorisé sous forme d'article : *Dr. NO and Mr. Toxic – the versatile role of nitric oxide,* Porrini, C., Ramarao, N. et Tran, S. L. Les travaux de transcriptomiques feront également l'objet d'une publication et les travaux sur le NM102 et le marqueur de virulence de *B. cereus* seront tout d'abord brevetés puis publiés.

# Annexes

**Annexe 1: Publication *Dr. NO and Mr. Toxic – the versatile role of nitric oxide*[7]**
(p125 à p150)

Review

Constance Porrini[a], Nalini Ramarao* and Seav-Ly Tran[a]

# Dr. NO and Mr. Toxic – the versatile role of nitric oxide

https://doi.org/10.1515/hsz-2019-0368
Received September 13, 2019; accepted December 4, 2019

**Abstract:** Nitric oxide (NO) is present in various organisms from humans, to plants, fungus and bacteria. NO is a fundamental signaling molecule implicated in major cellular functions. The role of NO ranges from an essential molecule to a potent mediator of cellular damages. The ability of NO to react with a broad range of biomolecules allows on one hand its regulation and a gradient concentration and on the other hand to exert physiological as well as pathological functions. In humans, NO is implicated in cardiovascular homeostasis, neurotransmission and immunity. However, NO can also contribute to cardiovascular diseases (CVDs) or septic shock. For certain denitrifying bacteria, NO is part of their metabolism as a required intermediate of the nitrogen cycle. However, for other bacteria, NO is toxic and harmful. To survive, those bacteria have developed processes to resist this toxic effect and persist inside their host. NO also contributes to maintain the host/microbiota homeostasis. But little is known about the impact of NO produced during prolonged inflammation on microbiota integrity, and some pathogenic bacteria take advantage of the NO response to colonize the gut over the microbiota. Taken together, depending on the environmental context (prolonged production, gradient concentration, presence of partners for interaction, presence of oxygen, etc.), NO will exert its beneficial or detrimental function. In this review, we highlight the dual role of NO for humans, pathogenic bacteria and microbiota, and the mechanisms used by each organism to produce, use or resist NO.

[a]Constance Porrini and Seav-Ly Tran: These authors contributed equally to this article.
*Corresponding author: Nalini Ramarao, Université Paris-Saclay, INRAE, AgroParisTech, Micalis Institute, 78350, Jouy-en-Josas, France, e-mail: nalini.ramarao@inra.fr.
https://orcid.org/0000-0001-6045-8521
Constance Porrini and Seav-Ly Tran: Université Paris-Saclay, INRAE, AgroParisTech, Micalis Institute, 78350, Jouy-en-Josas, France

**Keywords:** bacterial resistance; immune response; microbiota; nitric oxide; physiological functions.

## Introduction

Nitric oxide, also called nitrogen monoxide or NO, is a diatomic molecule that serves as an intercellular messenger in almost all living organisms including plants, bacteria, fungi and animals. It is also present in the air, and NO was first considered as a toxic air pollutant generated principally from motor engine. If present in very high quantities in the atmosphere, NO participates in environmental damages by reducing the ozone layer and generating acid rains. It was only in the 20th century and after the discovery of NO as an endothelium-derived relaxing factor (EDRF) that a positive conception of NO has been considered (Stryer, 1995). Since this discovery, there was a growing interest for NO in the research and medical fields.

NO is a relatively unstable molecule that possesses an unpaired electron (Figure 1). As a free radical, NO is highly reactive, and its small size and gaseous properties allow an easy and rapid diffusion across the cell membranes without channels or receptors. As such, NO is one of the most important signaling molecules in mammalian physiology. For instance, NO is crucial for the regulation of vascular homeostasis and in neurotransmission. Within the body, NO is able to react spontaneously with hemoglobin, myoglobin, water and oxygen, which limits its diffusion gradient and explains why it has a very short lifetime of around 1–5 s (Sennequier and Goff, 1998). Moreover, the local release of NO allows the synchronization of various biological processes in a limited and specific area. The beneficial properties of NO have consequently been used for various applications in medicine.

NO is also essential for host defense. Indeed, during inflammation, increase in NO production plays a central role in innate immunity by eliminating pathogens and malignant cells. NO's microbicide and cytotoxic activities may also be increased by the production of reactive nitrogen and oxygen species.

Bereitgestellt von | De Gruyter / TCS
Angemeldet
Heruntergeladen am | 25.02.20 16:06




**Figure 1:** Nitric oxide is a small diatomic molecule consisting of one nitrogen covalently linked to oxygen by a double bond. NO is a free radical with an unpaired electron. In mammals, NO is mainly produced from the oxidation of the amino acid L-arginine in a highly controlled process that requires oxygen, NADPH and various cofactors. This reaction is catalyzed by specialized nitric oxide synthases (NOS) enzymes. Three isoforms of NOS exist: neuronal (NOS1, nNOS), endothelial (NOS3, eNOS) and inducible (NOS2, iNOS). nNOS and eNOS are constitutive and their activity depend on the level of intracellular calcium, while iNOS expression is induced under inflammatory conditions.

Alongside NO's positive physiological roles, there are growing evidences of NO's implication in the physiopathology of diverse diseases, usually due to a prolonged production. Dysregulation of NO may cause cardiovascular and neuronal dysfunctions and have also been linked to chronic inflammatory diseases.

NO's versatility is also visible during infection when the "good NO" in the human point of view may actually turn into "bad NO" for the pathogenic bacteria. Bacteria also produce NO as an intermediate of the nitrogen cycle, but when there is an increase in NO produced during inflammation, it becomes toxic and may lead to bacterial elimination. Some pathogenic bacteria have, however, developed means to resist the deleterious effect of NO.

Taken together, depending on each organism and the context, NO can act positively toward the organism, or show its evil face and be deleterious. In this review, we describe the two faces of NO in mammals, and the consequences in the development of health and diseases. We also review most of the strategies elaborated by bacterial pathogens to evade the toxic effect of NO produced during the host immune response.

## NO: the eukaryotic point of view

NO is a major signaling molecule in mammalian cells. NO is involved in signal transduction principally through its reduction-oxidation properties. It is capable of performing post-translational protein modifications, which consequently modify activity of the target protein. The best-described receptor of NO is guanylate cyclase (GC). NO reacts with high affinity to the heme-group of GC. Activated GC catalyzes the conversion of guanosine triphosphate (GTP) into the second messenger guanosine 3,5′-cyclic monophosphate (cGMP) with the release of a pyrophosphate. GC is ubiquitous in the body, so the physiological effect of NO depends on the target cell (Montfort et al., 2017). Neurotransmission, vasodilatation and platelet inhibition are three important biological functions regulated by NO through protein post-translational modifications.

## NO production by NO synthases

In mammals, NO can be synthesized by a large variety of cell types through nitric oxide synthases (NOS) by catalyzing the oxidation of the amino acid L-arginine to L-citrulline using various cofactors (Figure 1). There are three isoforms of NOS that are structurally similar but can be differentiated in terms of their expression and regulation: NOS-1 (or nNOS, neuronal), NOS-2 (or iNOS, the inducible isoform) and NOS-3 (or eNOS, endothelial) (Sennequier and Goff, 1998), which were named according to their order of discovery and cloning.

NOS proteins have a heme group and an oxygenase domain. They use NADPH and dioxygen to oxidize the L-arginine to L-citrulline with the liberation of NO. nNOS and eNOS are constitutively expressed and $Ca^{2+}$-dependent: their expression increases when the intracellular concentration of calcium increases. The rapid activation and inactivation of nNOS and eNOS through changes in intracellular calcium levels, and the facility with which NO crosses cellular membranes allow a very efficient transmission of cellular signals.

In physiological conditions, NO is mainly produced by the constitutive NOS isoforms eNOS and nNOS, at concentrations around $10^{-9}$M (Pacher et al., 2007). The NO produced by constitutive NOS plays a crucial role in physiological mechanisms such as vascular homeostasis and neurotransmission by mediating cell signalization (Sennequier and Goff, 1998).

In contrast with the two constitutive NOS, expression of iNOS (NOS2) is induced under pro-inflammatory conditions after cell activation by bacterial endotoxins [lipopolysaccharide (LPS)] or pro-inflammatory cytokines. Expression of iNOS is not calcium-dependent

Bereitgestellt von | De Gruyter / TCS
Angemeldet
Heruntergeladen am | 25.02.20 16:06

but is instead regulated by transcriptional regulators [i.e. nuclear factor kappa B (NF-κB)]. Once induced, a large amount of NO is produced and for a long period of time as iNOS catalyzes NO synthesis until the substrate is depleted. NO production by iNOS is 100 times stronger than that by the constitutive NOS (Pacher et al., 2007). The NO produced is involved in inflammatory and infection control phenomena (Rivero, 2006).

Beside its initial description as an inducible isoform, iNOS is also found to be constitutively expressed in platelets and respiratory epithelium where it produces a constant basal level of NO, which adds complexity to the NOS nomenclature (Sennequier and Goff, 1998).

Apart from NOS, an alternative route of NO synthesis was discovered in 1994: the nitrate-nitrite-nitric oxide route. NO is generated by the sequential reduction of inorganic nitrates derived from food. Some vegetables are naturally rich in nitrate. Once in the oral cavity, facultative anaerobic bacteria from the microbiota (e.g. *Staphylococcus* spp., *Escherichia coli*) rapidly reduce dietary nitrate to nitrite (Benjamin et al., 1994). In the acidic condition of the stomach, the nitrites are converted in nitrous acid, which is further transformed to NO and other nitrogen oxides. Benjamin et al. showed that acidification of nitrite from swallowed saliva in the stomach could generate enough NO to control the development of pathogenic microorganisms (Benjamin et al., 1994).

## NO in neurotransmission

NO produced by the constitutive nNOS isoform serves as a messenger in the central and peripheral nervous systems (Figure 2). Under physiological conditions, nNOS is induced following activation of *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors by two neuromediators: glutamate and glycine. Once activated, the ionotropic NMDA receptor opens up and allows an influx of calcium that activates nNOS (Vincent, 2010). The NO produced diffuses into the synaptic cleft and activates the transmembrane GC present in postsynaptic cells. The cGMP produced triggers the entry of calcium into the postsynaptic neuron, which will activate the calmodulin and thus allow a transmission of the nerve impulse.

In the central nervous system, nNOS is localized in the cerebellum and the brain. NO produced serves neuronal plasticity, which helps in the memory and learning processes (Tricoire and Vitalis, 2012).

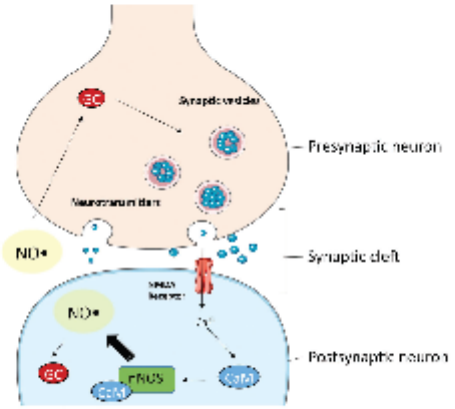



**Figure 2:** During the transmission of the signal, neurotransmitters are released from the presynaptic neuron into the synaptic cleft after exocytosis from synaptic vesicles. Neurotransmitters recognize and bind to the *N*-methyl-D-aspartic acid (NMDA) receptor present at the surface of the postsynaptic neuron, which induces an influx of calcium ($Ca^{2+}$) inside the postsynaptic neuron. This increase in intracellular calcium triggers the activation of nNOS in a calcium-bound calmodulin (CaM)-dependent manner. The postsynaptic neuron can communicate with the presynaptic neuron through a retrograde signal cascade mediated by NO. NO produced by nNOS diffuses into the presynaptic neuron terminal and activates soluble guanylate cyclase (GC) to propagate and amplify the signal transmission.

## NO function in vasodilatation

NO was first identified as an EDRF because its effect on vessel relaxation was identified even before the molecule itself had been chemically characterized (Stryer, 1995).

When NO is produced by endothelial cells or cardiomyocytes, thanks to its high affinity for GC, NO induces a strong production of cGMP. This cyclic nucleotide activates a G protein kinase, which triggers a signaling pathway that leads to a decrease in intracellular calcium and the activation of protein kinase G (PKG). PKG induces the phosphorylation of myosin light chain kinases, which decreases their activity, and by doing so indirectly blocks the activity of the myosin light chain involved in muscle contraction. All this cascade of events ultimately leads to smooth muscle relaxation (Figure 3).

At the cardiovascular level, NO induces a quick vasodilatation that predominantly affects the venous system. This decreases the global blood pressure and increases the perfusion of certain organs. By decreasing

Bereitgestellt von | De Gruyter / TCS
Angemeldet
Heruntergeladen am | 25.02.20 16:06

the blood pressure, NO reduces the heart labor; it then has a cardioprotective effect (Zhang et al., 2014).

NO is also involved in erectile function. NO is released in the cavernous body, which increases blood flow through the GC pathway and triggers erection (Hotta et al., 2019).

## NO inhibition of platelet aggregation

Platelets are small anucleate subcellular fragments that circulate within blood vessels where they preserve homeostasis. In case of damages to the vascular endothelium, components of extracellular matrix such as collagen are exposed to the lumen of the vessel. Platelets recognize and bind to collagen, which induces their activation. Once activated, platelets can accumulate at the site of vascular injury to form a thrombus and in combination with the process of blood coagulation can stop the bleeding (Figure 3).

However, too much activation of platelets can lead to thrombosis and trigger an inflammatory response. Therefore, it is essential that during normal vascular hemostasis, platelet activation is tightly controlled. NOS expression increases after platelet aggregation (Sennequier and Goff, 1998). The NO produced by platelets and the endothelial cells at the vicinity of vascular lesions can directly lower platelet aggregation (Walter et al., 1993).

Thus, NO is essential for cardiovascular function as it regulates blood circulation and blood pressure. In patients presenting metabolic disorders such as diabetes, atherosclerosis or arterial hypertension, the NO pathway is often impaired, resulting in a pathological and chronic increase in blood pressure (Pacher et al., 2007).

## NO use in therapeutics

Development of therapeutics using NO has principally targeted the vasoactivity of NO. In neonatology, NO is used in the intensive care unit as an $NO/O_2$ gas mixture that induces a local vasodilatation for the treatment of pulmonary hypertension in newborns (Finer and Barrington, 2006).

Nitrate derivatives such as nitroglycerin are NO donors that are used for the treatment or prevention of acute angina, myocardial infarction or acute pulmonary edema. These derivatives have a peripheral venous vasodilator action, which decreases the cardiac preload, which has an anti-anginal effect. However, if used in excess, a strong coronary and arterial venous vasodilatation causes a reflex tachycardia following hypotension,

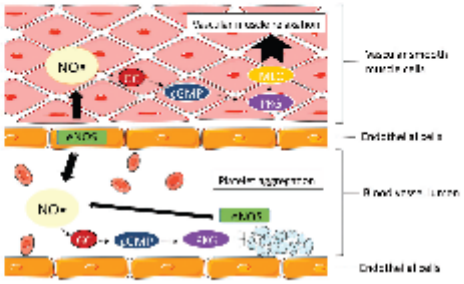



**Figure 3:** In the blood vessels, nitric oxide (NO) is produced constitutively by the eNOS of endothelial cells present in the inner layer of the vascular wall.
NO participates in the regulation of processes that are essential to maintain vascular homeostasis. First, NO diffuses to the layer constituted by the smooth muscle cells. Here, NO stimulates soluble guanylate cyclase (GC), which, once activated, catalyzes the production of the second messenger cyclic guanosine 5′-monophosphate (cGMP). The elevation of cGMP activates protein kinase G (PKG) and induces the relaxation of vascular smooth muscles and vasorelaxation through activation of myosin light chain (MLC). Secondly, NO diffuses through the blood vessel lumen where it controls platelet aggregation and prevents thrombosis. Platelets can also produce NO, which have been shown to regulate platelet function.

and thus an increase in the cardiac work, which can lead to hypovolemia and an aggravation of the anginal pain (Murrell, 1879).

All these nitrate derivatives have a narrow therapeutic window and illustrate the importance of NO doses and balance in the body. They are associated with many side effects, although their effectiveness and speed of action make them a very used treatment.

Recently, NO was used as a treatment in cystic fibrosis patients due to its capacity to disperse bacterial biofilms (Barraud et al., 2015), and antibiotic tolerance was observed following NO treatment (Vazquez-Torres and Baumler, 2016).

## NO during innate immunity

Innate immune response is the first line of defense against invading pathogens. The major cells involved in innate immunity are macrophages, dendritic cells and polynuclear cells. Following recognition of specific pathogen determinants, the pathogen-associated molecular patterns (PAMPs), these cells engulf the pathogens and sequester them inside the phagolysosome. In this

Bereitgestellt von | De Gruyter / TCS
Angemeldet
Heruntergeladen am | 25.02.20 16:06

vacuole, many bactericidal substances are produced in large quantities such as lytic enzymes, antimicrobial peptides and myeloperoxidase that produce reactive oxygen species (ROS) at acidic pH (hypochlorous acid). In addition, activated phagocytes produce a high quantity of NO that is crucial for pathogen (bacteria, viruses, fungi, etc.) destruction. iNOS has been found in different cells, but macrophages and neutrophils are the two principal producers of NO during inflammation. NO and its derivatives can act on bacterial DNA, membrane lipids and enzymes (Yang et al., 2009). Phagocytosis ultimately causes pathogen elimination (Figure 4).

In general, most of the bacteria are sensitive to the high concentration of NO produced by the host NO response. For instance, iNOS-deficient mice (iNOS-KO) are more susceptible to *Bordetella pertussis* infections than wild-type (WT) mice and an increase in bacterial growth in KO mice was observed (Canthaboo et al., 2002). Similar results have been observed in other bacteria such as *Bacillus cereus*, *Shigella flexneri* (Guillemet et al., 2016) and *Salmonella typhimurium* (Umezawa et al., 1997).

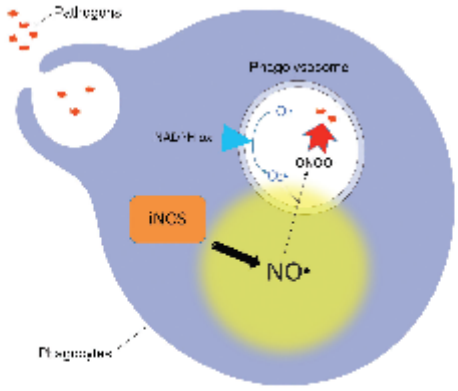



**Figure 4:** Phagocytes are major effectors of the innate immune response.
They are capable of sensing and capturing pathogens via a mechanism called phagocytosis. Inside the cells, pathogens are contained inside phagolysosomes, where they are degraded through the combined action of various processes. First, phagocytosis induces the activation of the NADPH oxidase, which permits the production of superoxide anion ($O_2^{\cdot-}$) and of reactive oxygen species (ROS). Secondly, infection and the proinflammatory environment activate iNOS and leads to the production of a large amount of NO. Interaction of NO and $O_2^{\cdot-}$ produces peroxynitrite ($ONOO^-$). $ONOO^-$ and ROS have bactericidal properties and contribute to the pathogen degradation.

NO response can directly exert its toxic effect on pathogen-specific factors. As such, it has been shown that NO response attenuates *Clostridium difficile* virulence probably by inactivating two major virulence factors, the bacterial toxins TcdA and TcdB (Savidge et al., 2011). Control of the pathogen proliferation can also be driven indirectly by acting toward the cells or environmental factors. Indeed, NO response has been shown to modulate cell signaling to exert its antimicrobial mechanism. For instance, NO response is a key component of the defense system against *Mycobacterium tuberculosis*, the agent responsible for tuberculosis. Once inside the lungs, the resident alveolar macrophages capture and eliminate the bacteria (Jamaati et al., 2017). A recent study has shown that the NO response of activated human macrophages can induce cell apoptosis of adjacent cells, which is the strategy used to control the bacterial intracellular proliferation (Herbst et al., 2011). Interestingly, autophagy can also be a mean to eliminate *mycobacterium* (Vergne et al., 2006). Autophagy is a cellular mechanism that allows the degradation of defective cellular components and invading pathogens present inside the phagolysosome (Gutierrez et al., 2004; Nakagawa et al., 2004). NO response can induce autophagy through the recruitment of the downstream mediator 8-nitro-cGMP, which has been demonstrated to permit the elimination of invading pathogens such as group A *Streptococcus* (Ito et al., 2013).

Host NO response can also affect environmental factors in order to restraint a bacterial infection. Iron is an essential factor for both host and pathogen, so iron is at the center of a huge competition during infection. In mammalian cells, iron is principally imported via the transporter divalent metal transporter 1 (DMT 1) and released via the exporter ferreportin 1 (fpn1) (Donovan et al., 2000; Le and Richardson, 2002). A study has revealed that *fpn1* expression is upregulated by the host NO response (Nairz et al., 2013). The host can, therefore, deprive iron to starve a pathogen or use iron toxicity at high doses to eliminate invading pathogens (Nairz et al., 2018). Similarly, macrophages containing *Salmonella* display an increase in iron export due to a NO response-dependent activation of *fpn1* expression. Therefore, iNOS mediates antibacterial activity of macrophages via iron restriction (Nairz et al., 2018).

Other antimicrobial activities have been correlated with NO response including modulation of bacterial toxin production and bacterial biofilm dispersion (Vareille et al., 2007; Barraud et al., 2015; Ichimura et al., 2017). Deeper analysis might be required to reveal the importance of these pathways in the context of infection.

Bereitgestellt von | De Gruyter / TCS
Angemeldet
Heruntergeladen am | 25.02.20 16:06

## NO toxicity

### RNS formation

In host defense against infection, NO is co-produced with ROS such as the superoxide radical. Superoxide and NO are not particularly toxic by themselves because there are effective ways to minimize their accumulation. Superoxide is removed by superoxide dismutases (SODs). NO is evacuated by its rapid diffusion through the tissues in red blood cells, where it is converted to nitrate by reaction with oxyhemoglobin. However, the NO and superoxide radical interaction induces the formation of reactive nitrogen species (RNS), which are more harmful (Figure 5) (Fang and Vazquez-Torres, 2019). The toxicity induced by RNS is not species-specific and can affect both eukaryotes (cancer or healthy cells) and prokaryotes: bacteria, virus or parasites.

RNS are strong nitrosative and/or oxidative agents. They can react directly with various biological targets and cell components, including lipids, amino acid residues, DNA bases and low-molecular-weight antioxidants (Figure 6). Production of RNS allows redirecting the role of NO from a signaling molecule to a stress molecule that is able to target various components of the cell and trigger major damages (Tharmalingam et al., 2017).

### Effect toward proteins

NO reacts with the metal ions of proteins, and the principal targets are Fe–S-, heme group- and cysteine thiol-containing proteins. [Fe-S] groups within these proteins are converted into nitrosyl iron derivatives such as dinitrosyl iron complexes (DNICs). NO can modulate the function of these proteins by nitrosylating or disassembling [Fe-S] centers (Butler and Megson, 2002). Indeed, many [Fe-S] proteins, which generate DNICs, are regulatory proteins whose [Fe-S] groups react with NO to control their transcriptional or translational activity (Fitzpatrick and Kim, 2015). Through this modification, NO is able to activate or inhibit certain enzymes and thus influence all the mechanisms in which they are involved. Among the proteins that are sensitive to NO, we can find enzymes of the mitochondrial respiratory chain. NO also targets aconitase, which plays an essential role during the Krebs cycle, where it catalyzes the reaction of citrate to isocitrate (Beinert and Kennedy, 1993). NO action on aconitase ultimately leads to the inhibition of energy production generated by the Krebs cycle and subsequent cell death. Interestingly, aconitase is also present in bacteria where it has a similar function in metabolism. NO disrupts aconitase function of both organisms in a similar way (Butler and Megson, 2002).

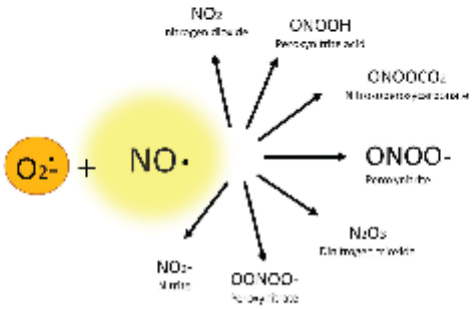



Figure 5: Reactive nitrogen species (RNS) formation: interaction of NO, superoxide, peroxynitrite and nitrogen dioxide.
When NO and superoxide are present, they can react to generate peroxynitrite that is highly reactive. On the other hand, $NO_2$, superoxide and nitrogen dioxide ($NO_2$) form dinitrogen trioxide ($N_2O_3$) and peroxynitrate ($NO_4^-$). Peroxynitrate breaks down to give nitrite and oxygen. Altogether, they are powerful nitrative and oxidative agents that can act on proteins, lipids and nucleic acids.

Another example of NO altering similar function in bacteria and eukaryotic cells is through its actions on the heme group of cytochrome C oxidase. Cytochrome C oxidase is an enzyme of the respiratory electron transport chain present in aerobic bacteria and within mitochondria. Disruption of the respiratory chain potentially leads to bacterial death (Blomberg and Adelroth, 2017).

Another post-translational modification mediated by RNS, especially peroxynitrite, is the nitration of tyrosine to produce nitrotyrosine compounds that alter the function of the proteins.

Apart from the heme-group, NO can act on cysteine residues to specifically and reversibly modify target proteins. NO reacts with thiol groups present within the cysteine residues of a protein to form S-nitrosothiol (SNO) derivates. S-nitrosation only concerns free cysteine that are not involved in a disulfide bridge and that are located in an acidic or hydrophobic structural unit. Denitrosation, which reverses the effect of S-nitrosation, can happen spontaneously or be catalyzed by S-nitrosoglutathione reductase. SNO derivatives are involved in very different cellular mechanisms including the mitogen-activated protein (MAP) kinase pathway, the NF-κB pathway implicated in inflammation and the NMDA receptor involved in neurotransmission (Stamler et al., 2001).

### Effect on lipids

A major aspect of RNS cytotoxicity is based on peroxynitrite ability to trigger peroxidation of polyunsaturated

Bereitgestellt von | De Gruyter / TCS
Angemeldet
Heruntergeladen am | 25.02.20 16:06

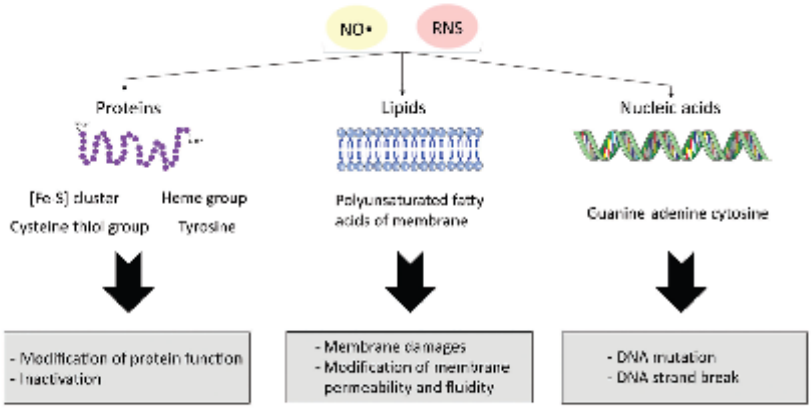



**Figure 6:** NO and RNS produced during the NO response have three main biotargets: proteins, lipids and nucleic acids. NO reacts with proteins by acting on the iron centers of biological molecules particularly ferrous heme proteins such as soluble guanylate cyclase, hemoglobin and cytochrome C oxidase. NO also affects the iron-sulfur [Fe-S] centers of proteins. Thiol groups of cysteine and tyrosine interact with NO to form S-Nitrosothiol derivates and nitrotyrosine, which are signaling molecules and potent carcinogens, respectively. In addition, RNS are potent oxidants that can oxidize membranes and lipoprotein lipids principally by acting on polyunsaturated fatty acids. The modification of the membrane affects its fluidity and function. Finally, RNS induce deamination of cytosine, guanine and adenine, which is mutagenic and induce cross-links in DNA and DNA strand breaks. All these processes create DNA damages that can ultimately induce cell death.

fatty acids (PUFAs), which are components of lipids and lipoproteins of the cell membrane. Peroxydation of PUFA generates nitro-fatty acid products including phospholipid hydroperoxyl radicals, conjugated dienes and aldehydes. Ultimately, these reactions cause a degeneration of membrane lipids, leading to changes in membrane permeability and fluidity that have significant biological consequences (Pacher et al., 2007).

### Effect on nucleic acids

RNS are responsible for DNA mutations, in particular peroxynitrite ion and dinitrogen trioxide. Dinitrogen trioxide is able to deaminate DNA bases guanine, adenine and cytosine to xanthine (dX), hypoxanthine (dHX) and uracil (dU), respectively (Wink et al., 1991). These three components are highly mutagenic for the DNA molecule and are responsible for transition mutations such as G:C to A:T or A:T to G:C.

Peroxynitrite is an oxidizing and nitrating agent that preferentially targets guanine residues in DNA and produces 8-oxoguanine and 8-nitroguanine. 8-oxoguanine has high reactivity and generates cytotoxic oxidizing components. 8-nitroguanine is very unstable and can cause DNA strand breaks.

## NO regulation

NO diffuses freely and easily across biological membranes, without the need for an active process of release. As a consequence, NO effect is not confined to the place where it has been produced, but has autocrine and paracrine effects. This phenomenon of gradient concentration is a determining aspect of NO functions. However, during infection, to limit the damages to the host, the macrophages produce NO locally usually within phagocytic vacuoles, and the diffusion area is thus rather limited (Pacher et al., 2007).

In higher eukaryotes like humans, two mechanisms of detoxification of NO exist to avoid excessive damages at the NO production site.

On the one hand, in the presence of blood, and thus red blood cells and oxygen, NO is degraded by oxyhemoglobin. The hemoglobin, present in large excess, is able to bind NO through its heme group. NO is then converted to nitrate and methemoglobin is produced (Scorza et al., 1997). The accumulation of methemoglobin in blood can, however, be toxic. Methemoglobinemia becomes abnormal beyond 3% of total hemoglobin and leads to cyanosis as well as other symptoms such as lethargy; beyond 70% poisoning can become fatal. In anoxic conditions, NO in solution is spontaneously converted

Bereitgestellt von | De Gruyter / TCS
Angemeldet
Heruntergeladen am | 25.02.20 16:06

into nitrite, which is potentially toxic if in excess (Kapil et al., 2013).

On the other hand, NO produced in excess is not completely degraded at the production site and can also be transported by binding to plasma proteins. NO can nitrosylate the sulfur residues of circulating proteins and be evacuated from the production site. The main agents responsible for this event are ascorbate and albumin, which are present in large amounts in the plasma. NO can thus bind to these components, be displaced by blood flow and by transnitrosylation reaction. This mechanism does not allow to eliminate NO, but to move it into a stable form.

## Mr. Toxic or when NO misbehaves

As we have seen, NO is a fundamental biological compound used for neurotransmission, cardiovascular homeostasis and defense against infection. Inflammation is part of the immune response to eliminate tumor cells as well as pathogens. However, when inflammation deregulates, the uncontrolled production of RNS can show an evil aspect and be at the origin of pathologies such as cancer, autoimmune disease, chronic infection and inflammation. An extensive description of NO-induced disorders has been reviewed elsewhere (Pacher et al., 2007). In this review, we will highlight the major contributions of NO in human diseases. In many cases, these pathologies arise from an excess of NO and thus an overproduction of peroxynitrite and other RNS for which toxicity is the same irrespective of the pathogen, microbiota or host cells (Figures 7 and 8).

## NO contribution in cardiovascular diseases

NO pathways play a major role in the homeostasis of cardiac and vascular functions especially through eNOS and nNOS. This system controls cardiovascular contractility and regulates the metabolism and composition of the cardiovascular tissue. However, reduction in the bioavailability of endothelium-derived NO serves as a key link between metabolic disorders and cardiovascular risk (Huang, 2009).

NO's role as a vasodilator and platelet inhibitor helps to prevent thrombosis and ischemia. If there is an endothelial dysfunction, ischemia is prolonged. This induces a prolonged production of NO, which accumulates in the presence of pro-inflammatory oxidizing agents. The redox environment favors the deleterious effect of this extended NO production. Then, NO induces tissue damage, which in turn generates inflammation accompanied by an

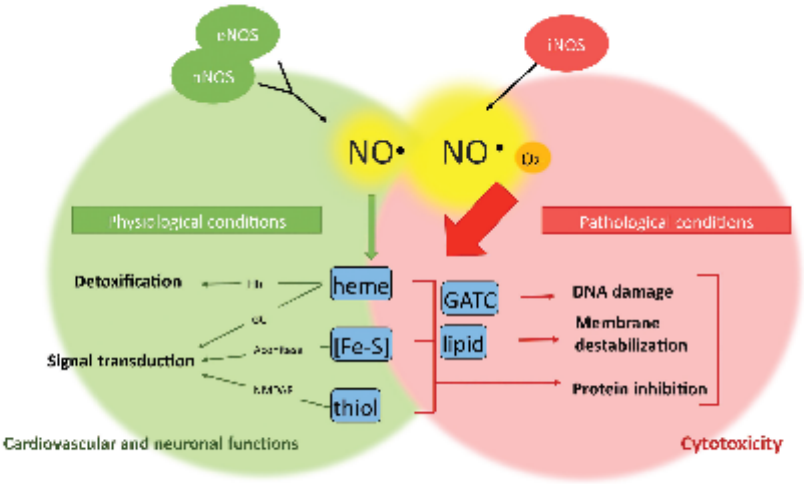



Figure 7: NO can act on proteins (heme groups, iron-sulfur cluster and thiol groups), on nucleic acid and on lipids. At low concentrations, when the NO is produced by constitutive NOS (eNOS, nNOS), its action regulates proteins and it is involved in physiological pathways. But at high concentrations in the presence of oxidative agents, NO can trigger irreversible damages to cell compounds.

Bereitgestellt von | De Gruyter / TCS
Angemeldet
Heruntergeladen am | 25.02.20 16:06

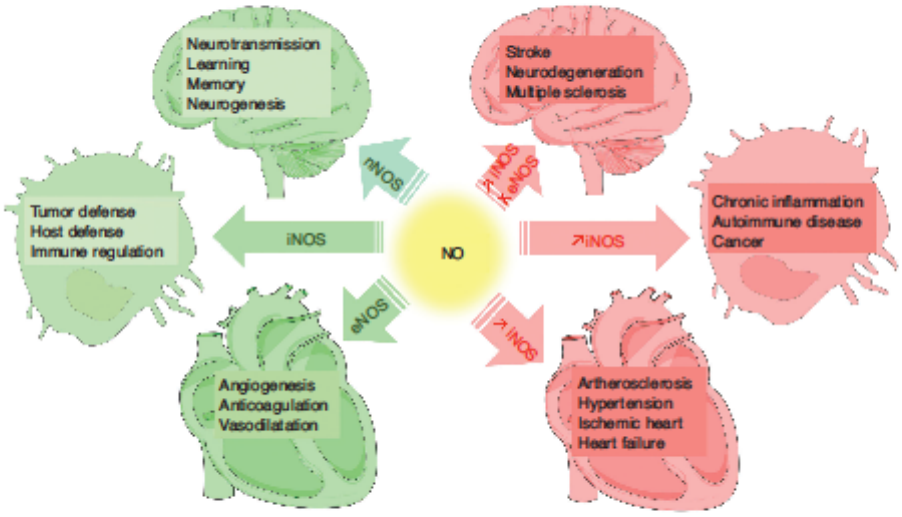



**Figure 8:** Overview of the versatility of NO in human physiology and pathology.

overproduction of oxidizing and nitrating agents. It creates a vicious circle with permanent damages. This phenomenon occurs during heart infarction and strokes (Pacher et al., 2007).

Abnormally prolonged NO production also contributes to inflammatory conditions such as atherosclerosis. Atherosclerosis is characterized by an accumulation of atherosclerotic plaques, which can lead to the obstruction of the vessel lumen. Atherosclerosis has multifactorial causes; however, excess of NO and mostly production of peroxynitrite seems to participate in the initial step of the disease. Mice deficient for iNOS seem less susceptible to atherosclerosis (Miyoshi et al., 2006). By contrast, NO originating from nNOS and eNOS has an atheroprotective effect. Consistent with this observation, attenuation of iNOS coupled with restoration of eNOS reduces nitrosation-induced lesions (Mercanoglu et al., 2015).

## NO's role in septic shock

Pro-inflammatory signal serves to initiate immune response in order to eliminate pathogens. In contrary, anti-inflammatory signal is essential to contain and control the intensity of inflammation. If not controlled, the inflammatory response could potentially lead to damages to host tissues and organs, which can be responsible for the progression of sepsis to septic shock. Septic shock is characterized by hypersecretion of pro-inflammatory cytokines and NO produced by iNOS, resulting in massive vasodilation, an increase in vascular permeability and therefore a large decrease in blood pressure. Drop in blood pressure causes organ failure due to the lack of oxygenation and ultimately to death (Singer et al., 2016). The formation of peroxynitrite is a key pathophysiological mechanism contributing to the cardiovascular collapse of septic shock. One of the cytotoxic effects of peroxynitrite is related to the induction of DNA damages and the subsequent activation of the nuclear enzyme PARP [poly (ADP-ribose) polymerase]. Activation of PARP induces consumption of NADH, a breakdown of cellular energetics and ultimately induces cell death by necrosis, resulting in sepsis (Zingarelli et al., 1996; Islam et al., 2017).

## NO's link in the development of cancer

As it has been observed for CVDs, action of NO is ambivalent toward cancer (Choudhari et al., 2013). NO can be genotoxic under certain circumstances indicating that it could be involved in the development of cancers.

Phagocytic cell anti-tumoral activity is an integral part of the immune response. Phagocytes can recognize specific markers expressed by tumor cells and through the liberation of NO, can eliminate them, therefore participating in the repression of tumorigenesis (Hussain et al.,

Bereitgestellt von | De Gruyter / TCS
Angemeldet
Heruntergeladen am | 25.02.20 16:06

2004; Duan et al., 2015). Paradoxically, inflammation and especially chronic inflammation, constitutes a favorable environment for the development and progression of cancer. Indeed, RNS, and more particularly peroxynitrite, is genotoxic and induces an increase in genomic mutations. Local inflammation is associated with enhanced immune cell migration and invasion that participate in the increase of NO production. NO has also been associated with enhanced migration and invasion of tumor cells (Jadeski et al., 2003). Lastly, NO plays an important role in tumor progression through vasodilatation of arteriolar vessels, which stimulate angiogenesis, facilitating the progression of tumors (Morbidelli et al., 2003). Consistently with NO's role in tumorigenesis, it has been shown that deletion and inhibition of iNOS in mice reduces their susceptibility to tumor formation (Kisley et al., 2002; Penarando et al., 2018).

The two-face roles of NO toward cancer probably depend on environmental conditions. Parameters such as redox state of cells, NO concentration, and origin and duration of exposure will likely influence the disease outcomes.

## NO: the pathogen point of view

### Endogeneous NOS

We have previously seen that the host NO response is a crucial antibacterial weapon. Interestingly, homologs of NOS, bacterial NOS, have been found in bacteria. Bacterial NOS are mainly found in Gram-positive bacteria including *Deinococcus*, *Streptomyces*, *Bacillus* and *Staphylococci* species (Choi et al., 1997; Adak et al., 2002a,b; Sudhamsu and Crane, 2009). Amino acid sequence alignment of *B. cereus* bacterial NOS shows similar identity with other bacterial NOS than with eukaryotic NOS, demonstrating similarities within all the NOS (Montgomery et al., 2010). With the exception of the Gram-negative bacterium *Sorangium cellulosum*, which is the only bacterium to produce a complete NOS enzyme (Agapie et al., 2009), all bacterial NOS are produced as truncated enzymes. Indeed, bacterial NOS have an oxygen domain highly similar to the eukaryotic NOS but do not possess the reductase domain. They need to hijack a separate reductase partner as an electron donor (Adak et al., 2002a,b; Gusarov et al., 2008). Nevertheless, bacterial NOS present similar functional properties with eukaryotic NOS, they function as homodimers and also catalyze the production of NO from L-arginine. However, most bacteria do not synthesize the BH4 cofactor as they are able to use tertrahydrofolate as the cofactor (Adak et al., 2002a,b).

Bacterial NOS have been shown to be important components of the host pathogen interaction *in vivo*. *Bacillus anthracis* baNOS protects the bacteria *in vivo* against immune oxidative burst and promotes its survival inside macrophages. If *B. anthracis* is pre-treated with a non-lethal dose of NO, the bacteria are 100 times more resistant to a lethal exposure of hydrogen peroxide than the untreated one. baNOS protection against oxidative stress certainly participates in the bacterial ability to survive inside macrophages (Shatalin et al., 2008).

The most studied bacterial NOS is probably from *Staphylococcus aureus*. saNOS contributes to *in vivo* virulence phenotypes and protects the bacteria against oxidative stress. It promotes bacterial survival inside neutrophils (Vaish and Singh, 2013). Studies have also shown that saNOS is necessary for nasal colonization and development of skin abscess in a mouse model of infection (van Sorge et al., 2013; Kinkel et al., 2016).

It seems evident that endogenous NO is not necessary or only serves to stimulate resistance to exogenous NO response but is implicated in virulence and functions associated with metabolic adaptation in order to survive hostile environments. As such, saNOS is upregulated during low oxygen growth and the derived NO mediates the passage from aerobic to nitrate-based respiration during microaerobic growth (Sapp et al., 2014; Kinkel et al., 2016). In addition, environmental bacteria naturally produce NO through nitrification and denitrification processes during the nitrogen cycle.

### Resistance to NO response

The ability of a pathogen to cause disease is strongly dependent on its ability to survive the host immune response, and bacteria are unequal toward the host NO response.

To the best of our knowledge, the only bacterium able to subvert the negative effect of the host NO to favor itself is *Listeria monocytogenes*. *Listeria monocytogenes* is a Gram-positive bacterium responsible for foodborne diseases such as gastroenteritis. At the site of infection, bacteria are taken up by phagocytes but are able to escape the immune response and, through a unique cell-to-cell spread mechanism, *Listeria* can disseminate. Cole et al. have shown that NO produced during the host NO response favors bacterial *in vivo* dissemination in mice (Cole et al., 2012). Indeed, *Listeria* highjacks a host intracellular system of bacterial sensing, the oxidoreductase RECON, to promote NO

Bereitgestellt von | De Gruyter / TCS
Angemeldet
Heruntergeladen am | 25.02.20 16:06

production by the host cell (McFarland et al., 2018). This production of host NO triggers bacterial survival inside the recipient cells, which ultimately promotes bacterial cell-to-cell spreading (Cole et al., 2012).

Nevertheless, most of the bacteria are sensitive to NO response and have developed strategies to escape its bactericidal effect. For instance, *S. typhimurium* has developed a mechanism to resist by suppressing or inhibiting the functions of iNOS. Inside the cells, *Salmonella* is able to survive and replicate within large vesicles, the *Salmonella*-containing vacuoles (SCVs) (Fabrega and Vila, 2013). *S. typhimurium* is able to avoid the NO response by preventing colocalization of iNOS in the SCV (Chakravortty et al., 2002). Indeed, the *Salmonella* pathogenicity island 2 (SPI2) modifies the localization of iNOS and suppresses iNOS induction, which might explain why SPI2-mutant intracellular growth is reduced compared to the WT strain (Zhao et al., 2017). In addition, localization of peroxynitrite in the vicinity of the bacterium was observed for SPI2-mutant strains only. Thus, *Salmonella* uses SPI2-related factors to exclude antimicrobial compounds of the NO response from the bacteria-containing vesicle. In addition, recent studies have shown the importance of the two efflux pumps, ZntA and ZitB, for the maintenance of zinc homeostasis during *S. typhimurium* infection. More specifically, this efflux pumps work cooperatively to prevent accumulation of free zinc induced by the macrophage NO response and participates in *Salmonella* resistance to the host NO response, which is essential for *Salmonella* virulence *in vivo* (Huang et al., 2017; Frawley et al., 2018).

Other pathogens have to directly face the NO response. To resist the NO response, bacteria must first detect NO, then neutralize its effect and finally repair the damages induced especially to proteins and DNA molecules (Figure 9). Resistance to the NO response varies between bacterial species, and in this review we only describe some of the most conserved mechanisms focusing mainly on bacterial pathogens.




**Figure 9:** The bacterial stress response can be described in four main steps: sensing, signaling, detoxification and repair. First, the bacteria detect NO with receptors or transcriptional factors (like NsrR). This detection triggers regulation pathways that induce expression of genes involved in the resistance to NO. The bacteria produce proteins of detoxification (NOR and Hmp) and of damage repair (YtfE). They can also activate DNA repair pathways.

## Sensing and stress regulon

Bacteria constantly face changes in their environment such as extreme pH, immune response or nutrient starvation. To adapt to or resist these changing conditions, they have developed various responses that may be specific to a given stress and/or a general stress response (GSR) (Mitchell and Kogure, 2006). Establishment of GSR pathways require the detection of the stress signal and activation of alternative sigma factors. Sigma factors are bacterial transcription initiation factors that allow a promoter-specific recognition and, through their association with the catalytic core RNA polymerase, an initiation of transcription. Each sigma factor regulates a specific repertoire of multiple genes called regulon.

As an example, the alternative Sigma B factor is present in Gram-positive bacteria and regulates more than 150 genes. Sig B is activated in response to a large set of stimulations that include heat, oxidative and NO responses. NO has been shown to trigger a Sig B-mediated stress response to resist the deleterious effects of NO and RNS (Moore et al., 2004; Kint et al., 2017).

Besides the GSR, the initial step of bacterial response to NO response is the detection of NO and RNS, which will permit to activate the detoxification and repair pathways. As oxidative and NO response overlap during the immune response, it is not surprising that mechanisms of bacterial resistance against ROS and RNS share similarities. In 2007, Stephen Spiro classified the sensors into two groups: those that detect NO response as unique or primary signal, and sensors that do not solely respond to NO. The dedicated sensors regulate genes that are dedicated exclusively to respond to NO exposure (Spiro, 2007) (Figure 10).

Bereitgestellt von | De Gruyter / TCS
Angemeldet
Heruntergeladen am | 25.02.20 16:06

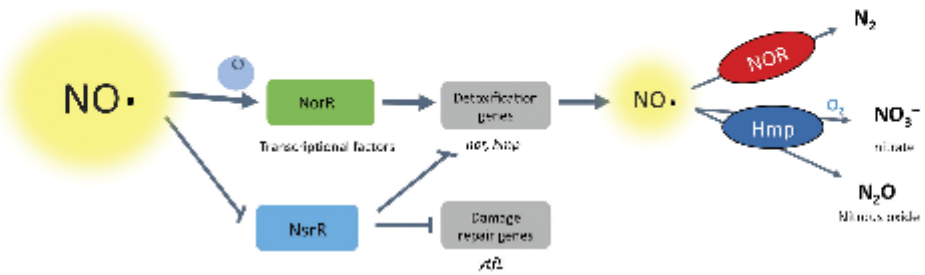



**Figure 10:** Detoxification pathways.
In the presence of NO, NorR factors are activated and induce the expression of detoxification genes. In addition, the inhibition of NsrR by NO derepresses the expression of genes involved in the resistance to NO (damages repair and detoxification genes). There are two main NO detoxification enzymes: NOR, which reduces NO to dinitrogen ($N_2$) and Hmp, which is a NO dioxygenase. Hmp transforms NO into nitrate in the presence of dioxygen or into nitrous oxide under anaerobic conditions.

## NsrR

NsrR is a NO-dedicated sensor that modulates the expression of numerous genes implicated in adaptation to NO response (Rodionov et al., 2005; Nakano et al., 2006). NsrR is a transcriptional repressor of the Rrf2 family and was first described as a repressor of the nitrite reductase *nirK* in *Nitrosomonas spp.* (Rodionov et al., 2005). NsrR is a major transcriptional regulator of the NO response in numerous γ- and β-proteobacteria, but it is also present in Gram-positive species such as *Bacillus* and *Streptomyces*. NO modulates NsrR probably by modifying its [Fe-S] cluster, which decreases the regulator affinity to DNA and leads to the derepression of NsrR target genes (Volbeda et al., 2017). Analysis and comparison of the regulatory regions of the NO detoxification genes have permitted to characterize the putative NsrR binding motif. The most conserved member of the predicted NsrR regulon is the *hmp* gene, encoding the (NO)-detoxifying flavohemoglobin, which was first identified in *E. coli* (Vasudevan et al., 1991). NsrR also regulates *ygbA*, *nrfA* and *ytfE* (Bodenmiller and Spiro, 2006). In the Gram-positive *Bacillus subtilis*, the ResD-ResE signal transduction system is responsible for the regulation of *hmp* expression. NO activates the *resD-resE* genes via derepression of NsrR; therefore, NsrR effect on target genes is not direct as seen for proteobacteria (Nakano et al., 2006; Tucker et al., 2010).

It is interesting to note that NsrR is absent in the two γ-proteobacteria *Vibrio cholerae* and *Pseudomonas aeruginosa* (Rodionov et al., 2005). Lack of NsrR is compensated by the presence of another NO-dedicated senor, NorR, which has been shown to activate expression of *hmp*.

## NorR

NorR is another transcription factor present in γ- and β-proteobacteria. NO binds to NorR iron center which activates its ATPase activity inducing expression of NO reductases (NorVW in *E. coli*) (Bush et al., 2011). NorR expression is under the control of the factor sigma-54. Three DNA promoter sequence sites have been described for NorR, which have allowed the identification of the NorR regulon. NorR-binding sites have been detected upstream of *norA* and *norB* genes in *Ralstonia* species, *norVW* in *Salmonella* species, *hmp* in *V. cholerae* and *P. aeruginosa*, and *hcp* in *Vibrio vulnificus*. All these genes encode enzymes involved in the detoxification of NO.

NorR importance in resistance against NO response *in vivo* has been shown in *V. cholerae*, the pathogen responsible for cholera. Using WT and iNOS KO mice, Stern et al. have shown that NorR allows *V. cholerae* to deal with the host NO response *in vivo*, which is critical for the long-term bacterial colonization of the adult mouse intestine (Stern et al., 2013).

## FNR

The fumarate and nitrate reduction regulator (FNR) belongs to the large family of the FNR- cyclic AMP receptor protein (CRP) regulator that is present in various bacteria (Korner et al., 2003). Reaction of NO with the FNR [4Fe-4S] cluster inhibits its ability to bind to DNA *in vitro* and blocks the expression of the FNR regulon genes *in vivo* (Cruz-Ramos et al., 2002; Crack et al., 2013). The prototype member of this family, *E. coli* FNR, is able to react to NO

Bereitgestellt von | De Gruyter / TCS
Angemeldet
Heruntergeladen am | 25.02.20 16:06

but also with $O_2$ to regulate transcription under anaerobic growth. Binding of NO to *E. coli* FNR derepresses *hmp* allowing its expression (Wu et al., 2000; Green et al., 2009). Other members of the FNR-CRP family include dissimilatory nitrate respiration regulator (DNR) in *P. aeruginosa*, NssR in *Campylobacter jejuni*, NnrR in *Rhodobacter sphaeroidesand* and NnrA in *Brucella melitensis*, but less information is known regarding how these ortholog proteins interact with NO. Interestingly, it has been shown that NnrA is necessary for intracellular resistance to NO response and virulence of the pathogen *B. melitensis*, one of the causative agents of human brucellosis (Mirnejad et al., 2017). Indeed, NO response produced by activated macrophages affects the intracellular growth of the *nnrA* mutant compared to the WT. The role of NnrA in *Brucella* resistance to NO response probably explains the importance of NnrA for *Brucella* virulence in mice model of infection (Haine et al., 2006).

## Fur

The ferric uptake regulator Fur is a transcriptional repressor of genes involved in the metabolism of iron but has also been shown to participate in signaling toward NO response. In *E. coli*, NO can directly bind to Fur, which inactivates the regulator and therefore induces expression of the Fur regulon (D'Autreaux et al., 2002; Mukhopadhyay et al., 2004). A recent study has shown that the Fur regulon is upregulated in the presence of NO in *S. aureus*, one of the most common human pathogens. The Δ*fur* mutant is sensitive to NO *in vitro* which implies the importance of probably one or more Fur-regulated genes in the pathogen resistance to NO response (Richardson et al., 2006). Fur is also associated with NO response in Gram-positive bacteria, as the Fur regulon is induced following an *in vitro* NO treatment in *B. subtilis* (Moore et al., 2004). The exact role of Fur in NO response resistance is yet not fully understood.

## SoxR and OxyR

SoxR and OxyR are two regulators principally involved in the bacterial resistance against oxidative stress; however, they can also respond to NO response (Hausladen et al., 1996; Ding and Demple, 2000). In *E. coli*, NO can directly bind to the SoxR [2Fe-2S] cluster, which activates the expression of the regulator SoxS and consequently the SoxSR stress regulon. Activation of SoxSR regulon participates in *E. coli* resistance to the toxicity induced by macrophage NO response (Nunoshiba et al., 1995; Demple et al., 2002). In contrast, SoxS is not required for *S. typhimurium* survival inside macrophages and for virulence. It is highly possible that *Salmonella*, which is a specialized intracellular pathogen, has developed other SoxRS-independent mechanisms of intracellular resistance (Fang et al., 1997). In opposition to SoxR, OxyR does not directly respond to NO but to the RNS produced during the NO response (Hausladen et al., 1996). Despite evidence of SoxR and OxyR association with NO response, their impact in bacterial sensing of NO response is probably minor compared to the other regulators.

## NO detoxification

NO crosses the bacterial membranes. Inside the bacteria, NO detoxification allows to decrease the concentration of NO in the cytoplasm by using enzymes that reduce or oxidize the NO to a less toxic component. Thiols such as glutathione and mycothiol provide a first line of defense. Pathways of detoxification are very diverse in prokaryotes, but there are two main families of enzymes able to metabolize NO: the heme-containing globin family and the NO reductases (Nor).

NO dioxygenases are enzymes from the hemoglobin superfamily capable of detoxifying NO through a series of oxidation-reduction reactions. This family of enzymes has two functions: the first is to prevent NO toxicity, and the second is to regulate NO-related signaling pathways (Gardner et al., 1998). Three categories can be distinguished among the globin superfamily: the flavohemoglobins, the single-domain globins and the truncated globins. The best-characterized member of this superfamily is the flavohemoglobin Hmp. Hmp is composed of an N-ter globin domain associated with a C-ter reductase domain. The C-ter domain catalyzes the oxidation of NAD(P)H, which produces a reduced heme that can subsequently convert NO to nitrate (Gardner et al., 1998).

$$\mathrm{Hmp[Fe(II)] + O_2 + 0.5\,NADH + NO \rightarrow Hmp[Fe(III)] + NO_3^- + 0.5\,NAD^+ + 0.5\,H^+}$$

Anaerobically, this enzyme can, although with less efficiency, catalyze NO conversion to $N_2O$ via its NO reductase activity (Kim et al., 1999; Poole and Hughes, 2000).

$$\mathrm{Hmp[Fe(II)] + 2\,H^+ + 0.5\,NADH + NO \rightarrow Hmp[Fe(III)] + N_2O + 0.5\,NAD^+}$$

Bereitgestellt von | De Gruyter / TCS
Angemeldet
Heruntergeladen am | 25.02.20 16:06

Hmp is essential for resistance to NO response and virulence of pathogenic *E. coli* and *Salmonella* (Stevanin et al., 2007; Svensson et al., 2010). Deletion of *hmp* in *S. typhimurium* impairs bacterial survival and proliferation in activated macrophages and attenuates bacterial virulence (Bang et al., 2006; Gilberthorpe et al., 2007).

Another globin that participates in bacterial resistance to the host NO response *in vivo* is the single-domain globin Cbg. *Campylobacter jejuni* is the leading cause of bacterial diarrheal disease worldwide. After ingestion, *C. jejuni* colonizes the host lower intestinal tract where the bacterium is exposed to the host NO response (Tarantino et al., 2009; Burnham and Hendrixson, 2018). Upon exposition, *C. jejuni cgb* is overexpressed and the mutant Δ*cgb* shows an increased sensitivity toward NO response (Elvers et al., 2004).

An example of truncated globin is HbN of *M. tuberculosis*, which is essential for NO detoxification due to its $O_2$-dependent NO dioxygenase activity under a microaerobic condition. This might represent a way for the bacteria to resist the bactericidal effect of macrophages (Pathania et al., 2002; Pawaria et al., 2007).

The NO reductases (NORs) are membrane-bound enzymes involved in the denitrification pathway.

$$2\,NO + 2e^- + 2H^+ \rightarrow N_2O + H_2O$$

Bacterial capacity to detoxify NO through reduction is widely distributed in denitrifying bacteria but is also present in pathogens. For denitrifying bacteria, the reduction of nitrate to nitrogen ($N_2$) is part of the nitrogen cycle and prevents NO high toxicity; for pathogenic bacteria, NO detoxification might be a mean to survive under oxygen-limited environments and nitrogen stress (Heylen et al., 2007).

Three NORs have been described to date. cNOR (also named NORB, cNORB or short-chain scNOR) is a cytochrome *c*-dependent NOR that is only found in denitrifying bacteria (Zumft, 2005). The quinol-dependent NOR (qNOR) is a single subunit enzyme present in denitrifying and non-denitrifying bacteria. Although distinct from cNOR as it uses its quinol domain as an electron donor instead of cytochrome *c*, the major part of qNOR catalytic region shows homology to cNorB subunit. qNOR has also been named qNORB, NORZ or long-chain lcNOR (Hendriks et al., 2000). The third NO reductase qCuNOR, purified from *Bacillus azotoformans*, uses menaquinol as the electron acceptor and is copper-dependent (Suharti et al., 2001). The best characterized NOR is *E. coli* flavorubredoxin NorV (associated with the NorW reductase), which catalyzes NO to $N_2O$ under anaerobic condition (Gardner et al., 2002). NorV protects enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) anaerobic growth *in vitro* in the presence of NO. During infection, NorV participates in the survival within macrophages by reducing the NO level. Moreover, the presence of NorV in EHEC is associated with pathogenicity showing the importance of NO detoxification for virulence (Shimizu et al., 2015). *Salmonella typhimurium* also expresses NorVW to detoxify NO under anaerobic conditions and, in association with the periplasmic cytochrome *c* nitrite reductase NrfA, is responsible for most of *Salmonella* anaerobic resistance to NO response (Mills et al., 2008). Interestingly, *nrfA* is the only nitrite reductase expressed by *C. jejuni* that has been shown to protect the bacteria against NO response. The periplasmic location of NrfA could allow detoxification before penetration of NO inside the bacteria (Pittman et al., 2007).

## Mechanisms of repair

The antimicrobial property of the host NO response passes by its ability to induce damages to bacterial DNA and to modify biomolecules such as proteins. To resist the NO response, bacteria activate repair systems.

## Protein repair

NO response induces damages to proteins, especially those containing an iron-sulfur cluster, which can affect the protein function and thus deregulate key biological processes. If not repaired, these damages may have lethal consequences for the bacteria.

A transcriptomic study done on *E. coli* has shown that, upon exposure to NO, *ytfE* (also known as RIC for repair of iron center) is highly expressed and that deletion of *ytfE* affects bacterial growth when exposed to NO (Justino et al., 2005). YtfE serves as a NO scavenger and is involved in the biogenesis and repair of [Fe-S] clusters. Upon exposure to NO response, there is an increase in damages against [Fe-S] cluster-containing proteins and a decrease in their subsequent repair in the absence of YtfE (Justino et al., 2006; Vine et al., 2010). It has been recently suggested that YtfE works in association with the NO reductase Hcp to protect *E. coli* from NO responses. Hcp could allow the bacteria to detoxify NO after YtfE has released NO from the damaged protein into the cytoplasm (Balasiny et al., 2018). YtfE orthologs exist in pathogenic bacteria. DnrN in *Neisseria gonorrhoeae* and ScdA in *S. aureus* are both di-iron proteins activated following NO

Bereitgestellt von | De Gruyter / TCS
Angemeldet
Heruntergeladen am | 25.02.20 16:06

response and involved in the repair of iron-sulfur centers (Overton et al., 2008). To date, no direct correlation has been shown between repair of iron-sulfur proteins and virulence *in vivo*.

Other members of the repair of the iron-sulfur cluster family have been identified: NorA in *Ralstonia eutropha* and DnrN in *Pseudomonas stutzeri*. However, the exact physiological function of both proteins is still yet to be determined (Justino et al., 2005).

A means for bacteria to counteract the damages induced to proteins by the NO response is by increasing the pool of *de novo* proteins. In response to amino acid starvation, the DsKa/ppGpp system activates expression of enzymes for amino acid biosynthesis and transport (Paul et al., 2005). The study by Henard et al. showed that DskA neutralizes the toxic effect of NO response toward the proteins and is essential for *Salmonella* virulence (Henard and Vazquez-Torres, 2012).

Some molecules can revert the damages induced to protein by the NO response. Methionine residue is the preferential target for oxidation. The methionine sulfoxide reductase MsrA catalyzes within the damaged protein the reduction of methionine sulfoxide back to methionine. MsrA has been shown to protect *E. coli* against oxidative stress and RNS produced during the NO response (St John et al., 2001). In *M. tuberculosis*, deletion of *msrA* and *msrB* increases the bacterial sensitivity to NO response (Lee et al., 2009). The role of MsrA in the repair of protein damages induced by the NO response could explain the importance of this factor in intracellular survival inside macrophages and virulence in mice of various pathogens including *Mycobacterium*, *Streptococcus pneumoniae*, *S. typhimurium* and *S. aureus* (Douglas et al., 2004; Denkel et al., 2011; Saleh et al., 2013; Singh et al., 2015).

*Salmonella typhimurium* uses the low-molecular-weight thiol (LMW) glutathione (GSH) to resist RNS toxicity *in vitro* and for its virulence in a mouse model of infection. Bacterial LMW thiols such as GSH serve as a protein reductant, helping to maintain redox homeostasis and protecting against a variety of stresses (Masip et al., 2006). GSH is also involved in the virulence of Gram-positive bacteria. *Streptococcus pyogenes*, also referred to as group A *Streptococcus*, is a Gram-positive bacterium that exclusively infects humans and causes a wide variety of diseases ranging from pharyngitis to serious infections such as necrotizing fasciitis. During NO response, GSH is oxidized but can be recycled back to GSH by the *gor*-encoded glutathione reductase. Deletion of *gor* affects *Streptococcus* virulence *in vivo* but only in a mouse model where inflammation is associated with the disease, thus indicating the link between GSH, NO response and virulence (Brenot et al., 2004).

By screening sensitivity toward NO response of transposon mutants of *M. tuberculosis*, Darwin et al. have shown that bacterial proteasome is required for resistance to NO. The bacterial proteasome system is similar to the eukaryotic system and serves primarily the degradation of proteins (Jastrab and Darwin, 2015). Mutants with a defective proteasome are more sensitive to the NO response of macrophages than strains with a functional proteasome. Moreover, a defective proteasome impairs the pathogen virulence in mice models of infection. Absence of iNOS partially restores the mutant pathogenicity, highlighting the importance of proteasome in resistance to NO *in vivo* and for virulence (Darwin et al., 2003). More recently, Samanovic et al. provided more insight into the link between proteasome and resistance to NO response. They showed that mutation of Rv1205 restores NO resistance of a strain with a non-functional proteasome and partially restored the bacterial virulence. Rv1205 catalyzes the production of cytokines, which in turn produce breakdown products that could be toxic if associated with NO. In the WT strain, cytokine by-products are eliminated by the proteasome (Samanovic et al., 2015).

## Nucleic acid repair

As described earlier, NO response induces DNA damages essentially through its reactive nitrogen intermediates dinitrogen trioxide and peroxynitrite. These compounds are responsible for the introduction of aberrant bases into the DNA molecule such as xanthine (dX), hypoxanthine (dHX) and uracil (dU), 8-oxoguanine and 8-nitroguanine, which can induce mutations and breaks in DNA strands.

Maintaining a genetic integrity is essential to any living organism. In bacteria, accumulation of DNA damage can potentially reduce fitness and viability. To cope with these damages, three pathways of DNA damage repair exist in bacteria: the nucleotide excision repair (NER) pathway, the base excision repair (BER) pathway and the RecBCD/AddAB-dependent recombination repair pathway. These three mechanisms are involved in the repair of DNA damages and base-pairing errors that are not restricted only to those due to NO response.

## The base excision repair (BER) pathway

The BER pathway has been shown to play a critical role in the defense against the deleterious effects of NO. BER

Bereitgestellt von | De Gruyter / TCS
Angemeldet
Heruntergeladen am | 25.02.20 16:06

removes the altered nucleotide in a two-step mechanism. First, the "abnormal" DNA bases (dU, dX and dHX) are recognized by glycosylases. DNA glycosylases are specific to one or a small subset of lesions. For example, uracil DNA glycosylase (Ung) recognizes dU; DNA 3-methyladenine glycosylase (AlkA) targets the residues dX and dHX; and oxidized guanines [such as 7,8-dihydro-8-oxodeoxyguanine (8-oxoG)] are treated with formamidopyrimidine glycosylase (Fpg). Fpg is also capable of detecting hypoxanthine and xanthine although to a lesser extent (Dong et al., 2006). Glycosylases cleave the glycosidic bond between the base and deoxyribose (deglycosylation) to promote the base release and create an AP site (apurinic/apyrimidinic).

Cells deficient for AP endonuclease activity (e.g. *xth nfo* double mutant) are very sensitive to ionizing radiation, oxidative stress and NO. Previous studies showed that in *E. coli* (Spek et al., 2001) and *S. typhimurium* (Suvarnapunya et al., 2003), absence of AP endonuclease activity generates an accumulation and persistence of AP sites, which causes single- or double-stranded breaks that can be potentially toxic for the bacteria (Richardson et al., 2009). Accordingly, inactivation of the uracil DNA glycosylase Ung and formamidopyrimidine DNA glycosylase Fpg in *E. coli* partially reverses the NO sensitivity of *xth nfo* mutant, suggesting that removal of the source that generates AP sites is beneficial for the AP endonuclease-deficient cells (Spek et al., 2001).

In conclusion, BER pathway is essential to prevent mutagenic effects associated with host-generated NO/RNS and for intracellular survival of several bacteria including *Salmonella*. However, while preserving the integrity of the genome is a key step for the establishment of *Salmonella* infection, BER is dispensable to cause an acute lethal infection in mice. These data suggest that other pathways of DNA repair exist and that they might play a role in the protection of bacteria against NO during infection (Richardson et al., 2009).

## The nucleic excision repair (NER) pathway

The prokaryote NER system is similar to the eukaryote system and involves UvrABC (Kisker et al., 2013). The first step is the recognition and binding of damaged DNA by UvrA and the recruitment of UvrB to form a heterodimer complex. UvrA transfers the DNA to UvrB in an ATP-dependent reaction, which triggers the separation of the two DNA strands and the release of UvrA. UvrC is then recruited at the site of DNA damages and, via its nuclease activity, cleaves the DNA phosphodiester bonds eight nucleotides upstream and four or five nucleotides downstream of the damage sites. Following the incision, UvrD and the DNA polymerase I join the complex, resulting in the release of UvrC. The DNA helicase II UvrD allows to remove the incised nucleotide fragment. DNA polymerase I fills in the resulting gap and the repair is completed after the DNA ligase seals the two strands.

A link between NER and DNA damages induced by NO response has only been demonstrated in *M. tuberculosis* for which NER is necessary for resistance to the NO response (Darwin and Nathan, 2005; Guthlein et al., 2009). Moreover, deletion of *uvrD* alters *M. tuberculosis* intracellular growth inside macrophages and virulence in a mouse model of infection that might be due to the bacterial incapacity to manage the toxic effect of NO response on DNA (Houghton et al., 2012).

## The RecBCD/AddAB pathway

In addition to DNA base modifications, NO response can generate DNA double-strand breaks (DSBs) that can be lethal to the bacteria. RecBCD in Gram-negative *E. coli*, or AddAB in the Gram-positive *B. subtilis*, are protein complexes involved in the homologous recombination repair pathway. It has been demonstrated that lack of DSB repair system in *M. tuberculosis* impaired bacterial ability to survive the NO response of macrophages (Brzostek et al., 2014). RecBCD has also been shown to play a role in *S. enterica* survival to NO stress (Schapiro et al., 2003).

Another factor, Mfd (mutation frequency decline), has been shown to be involved in *B. cereus* resistance against NO response. Mfd is a large protein that has been first described in *E. coli* for its function in the suppression of mutations that specifically occurs in the template strand during transcription (Selby, 2017). Mfd is a TCRF (transcription repair coupling factor) and can rescue or terminate an elongation through its affinity to RNA-polymerase (Selby et al., 1991). Mfd recognizes and binds stalled RNAP, through its helicase activity. Mfd detaches RNAP and RNA from the template DNA and recruits the UvrAB complex to initiate DNA repair (Adebali et al., 2017; Selby, 2017). Guillemet et al. showed that Mfd is required for *B. cereus* resistance to NO response. NO induces DNA fragmentation, and Mfd is required to prevent or repair these lesions (Guillemet et al., 2016). Surprisingly, repair mechanism associated with Mfd is NER-independent but instead follows a RecBC-similar pathway (Darrigo et al., 2016) (Figure 11). As Mfd is widely conserved in the bacterial kingdom, these data highlight a mechanism that may be used by a large spectrum of bacteria to overcome the host immune response and especially the mutagenic properties of NO.

Bereitgestellt von | De Gruyter / TCS
Angemeldet
Heruntergeladen am | 25.02.20 16:06

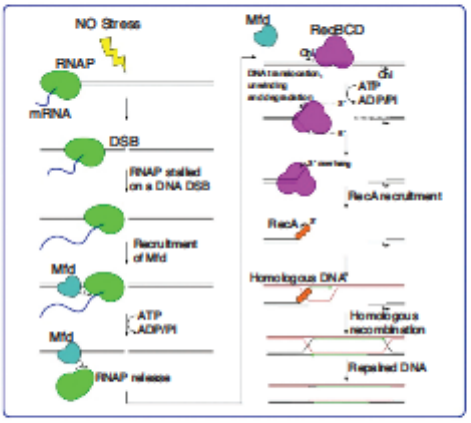



**Figure 11:** Mechanism of bacterial resistance of NO-induced DNA damages via Mfd.
In addition to DNA base modification, NO response can generate DNA double-strand breaks (DSBs) that can be lethal to the bacteria. Following the DSBs induced by NO, Mfd is recruited and promotes RNAP release from DNA. The RecBCD complex is then recruited to repair the DSB. RecBCD unwinds the DNA helix and degrades single strands. When RecBDC encounters a Chi site on the DNA, the degradation of the 5′ terminus is enhanced leaving a 3′ overhang and leads to the formation of an ssDNA. RecA binds to ssDNA and promotes repair by recombination with a homologous molecule of DNA (adapted from Darrigo et al., 2016).

## NO: the microbiota point of view

One hundred trillion microbes cohabit within the human body, with most of these microorganisms located in the gastrointestinal tract (GIT). We estimate that more than $10^{14}$ microorganisms are present within the colon. Host and microbiota have coevolved and established a symbiotic relationship. The microbiota are essential for the development of the intestinal immune system, the supply of key nutrients and the modulation of energy metabolism (Thursby and Juge, 2017). On the other hand, hosts have developed an immune tolerance toward microbiota. How the host tolerates the microbiota and more globally innocuous antigen derivates from food is still not fully understood, but it most likely involves interplay of both innate and adaptive immunity (Weiner et al., 2011; Swiatczak and Cohen, 2015).

### NO production by commensal bacteria

To date, there are no studies describing the production and role of a potential NOS from bacteria of the microbiota. There are more than 2000 species identified in the human gut, and they essentially belong to Proteobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes and Actinobacteria. Thus, it is tempting to assume that Gram-positive bacteria of microbiota, as for pathogenic bacteria, can express bacterial NOS that may help the bacteria to adapt to the specific challenging environment that is the GIT.

Nevertheless, NO production has been associated with the human gut microbiota *in vitro*. Sobko et al. demonstrated that NO can be enzymatically produced from fecal bacteria grown anaerobically (Sobko et al., 2005). This NO is not produced via the L-arginine pathway but by reduction of nitrate. Within the microbiota, *Lactobacillus* and *Bifidobacteria* are the most efficient species to produce NO compared to other strains such as *E. coli*, *Bacteroides thetaiotaomicron* and *C. difficile*, which seem to instead consume the NO produced (Sobko et al., 2006; Vermeiren et al., 2009; Tiso and Schechter, 2015).

### Exogenous NO of the NO response

In physiological conditions, NO is produced by the host and maintains the homeostasis of the gut microbiota (Matziouridou et al., 2018). However, despite their symbiotic life within the host, commensal bacteria are exposed, as collateral damage, to the NO response produced during infection. Very few data described if and how bacteria from the microbiota cope with the toxic effect of the host NO response.

The main consequence of NO excess toward the microbiota is in the composition of the commensal bacterial population. Commensal bacteria are not equal toward NO and those who can use the NO (and NO by-products produced during the NO response) as nutrients have survival/fitness advantages during inflammation (Tiso and Schechter, 2015). The healthy gut microbiota are mainly dominated by the Bacteroidetes and Firmicutes phyla (Bull and Plummer, 2014) but during inflammation, chronic inflammation or due to infection, the microbiota population is reshaped and Proteobacteria including the *Enterobacteriaceae* become the predominant phylum. The capacity of *Enterobacteriaceae* to outgrow is due to modification of the metabolic environment within the gut. Indeed, NO response triggers an increase in $O_2$ and nitrate $NO_3^-$, which are necessary for nitrate anaerobic respiration. Presence of nitrate reductase is essential for the utilization of nitrate as the terminal electron acceptor. Inactivation of this enzyme activity impaired the growth of *E. coli* in the presence of nitrate in a co-culture experiment with WT strain but also *in vivo* in a mouse model

Bereitgestellt von | De Gruyter / TCS
Angemeldet
Heruntergeladen am | 25.02.20 16:06

of inflamed intestine (Winter et al., 2013). Thereafter, by analyzing more than 2000 genomes of the gut-associated microbiota, it has been shown that *Enterobacteriaceae* present the highest prevalence of nitrate reductase activity and are therefore the most potent to use nitrate for their growth (Winter and Baumler, 2014).

An alteration in the composition of the microbiota, a phenomenon called dysbiosis, could break this balance and be the trigger of pathological development in the host. As such, dysbiosis has been correlated with IBD (inflammatory bowel disease) pathogenesis. The microbiota of a patient with IBD differs from the one of a healthy person with the most consistent changes being a reduction in biodiversity and a lower proportion of Firmicutes. This concept is reinforced by the fact that animal models of IBD in a germ-free environment do not develop inflammation. Patients with Crohn's disease (CD) show a decrease in the *Clostridium leptum* group, with one species, *Faecalibacterium prausnitzii*, described as anti-inflammatory. They also exhibit an increase in the diversity of proteobacteria, mainly *E. coli* (Sokol et al., 2008; Miquel et al., 2013; Nishino et al., 2018). Interestingly, specific bacteria have been associated with IBD, such as adhesive-invasive *E. coli* (AIEC) that colonize the ileal mucosa of CD patients to a larger extent than healthy mucosa (Darfeuille-Michaud et al., 2004; Martinez-Medina et al., 2009; Negroni et al., 2012). Thus, the modification of the microbial community favors the establishment of pathogenic bacteria, which can participate in the severity of inflammation (Figure 12).

However, great care should be taken in associating NO as a factor for the deleterious effect in IBD. Indeed, numerous recent studies have pinpointed the protective effect of NO against colitis especially during the early stage of the disease (Hosoi et al., 2001; Cross and Wilson, 2003; Kolios et al., 2004; Jianjun et al., 2013; Jadert et al., 2014). Nevertheless, one consequence of this exaggerated immune response is the secretion and accumulation of several cytotoxic molecules, resulting in tissue damages and alteration of the gut barrier function. To date, only one study had used NOS inhibitors to regulate the intestinal NO concentration in patients with collagenous colitis (Reinders et al., 2004). However, efficiency of the treatment was not convincing, probably because of the versatile role of NO in intestinal inflammation.




**Figure 12:** Intestinal bowel diseases (IBD) have multiple etiologies. Several factors have been associated with IBD: environmental factors (e.g. geography, cigarette smoking, sanitation, breast feeding, dietary and hygiene), infectious microbes (especially those responsible for gastrointestinal infections), genetic susceptibility (mutation in the *CARD15* gene is associated with IBD), microbiota dysbiosis and a dysregulated immune system that can result in mucosal inflammation. To date, there is still an uncertainty in determining which factor is the cause or consequence to the development of IBD in humans.

## Resistance to NO response

We can assume that if present inside their genome, factors that help pathogens to resist the NO response could potentially protect bacteria of the microbiota. As such, all the factors described in *E. coli* and *S. aureus* could be used by their homologous commensal strains to resist the NO response.

We described earlier MsrA and B role in *M. tuberculosis* resistance to NO response. The methionine sulfate reductases MsrA and MsrB of *Enterococcus faecalis* are involved in protection against damages toward proteins induced by oxidative stress and so potentially those induced by the NO response. Mutant strain survival inside activated macrophages is affected compared to the WT. No difference can be observed when using macrophages that are not pre-activated with interferon and LPS, which pinpoint the function of MsrA and MsrB in the protection of *E. faecalis* toward the host immune response (Zhao et al., 2010). *Enterococcus faecalis* is a normal resident of the human GIT; however, the bacterium is now also associated with nosocomial infection (Mason et al., 2011; Gilmore et al., 2013). Homologs of MsrA and MsrB exist in most of the bacteria, but location of the two genes and their copy number might vary (Ezraty et al., 2005). There is no evidence of methionine sulfate reductase role in the protection against the host NO response for other members of the microbiota.

Another factor that protects commensal bacteria from NO response is the regulator HcpR. HcpR belongs to the FNR/CRP family of regulator and regulates genes such as

Bereitgestellt von | De Gruyter / TCS
Angemeldet
Heruntergeladen am | 25.02.20 16:06

*hcp* that encodes a nitric oxide reductase. In *E. coli*, Hcp protects the bacteria against the NO response (Wang et al., 2016). HcpR and Hcp are also present in bacteria from the genus *Desulfovibrio* including *D. gigas* and *D. desulfuricans*, two anaerobic bacteria commonly found in human GIT (Jia et al., 2012) and participate in the bacterial resistance against NO response (Cadby et al., 2011; da Silva et al., 2015). *Desulfovibrio desulfuricans* possess two copies of *hcpR*, *hcpR1* and *hcpR2*. A recent transcriptomic analysis by Cadby et al. demonstrated that NO induces *hcpR1* and *hcp* but not *hcpR2* expression. Interestingly, *hcp* seems to be regulated by HcpR2 and not HcpR1, meaning that *hcp* is probably activated upon another signal (Cadby et al., 2016). HcpR1 also regulates the *nap* gene cluster that encodes a periplasmic nitrate reductase. Thus, in response to NO response, *D. desulfuricans* increases its ability to use nitrate to support its growth, which is one of the explanations for Proteobacteria bloom during inflammation (Cadby et al., 2017). Transcriptomic study of genes regulated upon exposure of *D. desulfuricans* to NO provided precious information on how commensal bacteria respond to NO response. Among the most activated genes, flavodoxin-like proteins are known to protect against NO response via their NO reductase activity. Interestingly, an YtfE-like protein is also upregulated, but there are yet no data on its functional similarities with *E. coli* YtfE.

Finally, NO generated by the host can also paradoxically worsen bacterial infection. *Escherichia coli* and *Salmonella* resistance capacities to NO provide them a competition advantage over the resident microbiota to colonize the gut (Winter et al., 2013).

Further analysis is required to understand the effect of NO response toward the microbiota and that will require to face the challenges associated with the study of human microbiome.

## Conclusions

*„Alle Dinge sind Gift, und nichts ist ohne Gift; allein die Dosis macht, daß ein Ding kein Gift sei"*. This sentence enunciated by Paraclese in 1537, which means that everything is poisonous depending on the dose used, could perfectly describe the antagonism of NO functions in several organisms.

NO is present in various organisms from human, to plants, fungus and bacteria. Consequently, NO is a molecule that has meaning to all organisms, which is an important fact especially during microorganism-host interaction.

NO is one of the most important signaling molecules in human physiology. Because of its particular physicochemical properties, it constitutes a perfect second messenger. NO effect is not confined to the place where it has been produced but has autocrine and paracrine effects. This phenomenon of gradient concentration is a determining aspect of NO functions. In humans, NO has specific reactivity with biological targets that define its physiological function, leading to regulation of neurotransmission and vasodilatation. Because of its importance in many physiological processes, therapeutics using NO have been developed.

By sharp contrast, dysfunction in NO production is correlated with CVDs and neurological disorders. Evidences of high toxic levels of NO have been shown to be linked with stroke and cardiovascular arrest, the two main causes of death worldwide. These observations highlight the importance of understanding NO in human physiology. NO produced by the iNOS has an essential function in host defense against infectious organisms and anti-tumoral activity. However, prolonged production and accumulation of NO may have dramatic pathological consequences. Excessive production of NO is linked to chronic inflammation such as IBD. Etiology of IBD is multiple and it is still unclear which event is the trigger. Nevertheless, NO is associated with persistent inflammation, which might have an impact in leaky gut and dysbiosis, two characteristics of IBDs.

In humans, NO is mainly produced by the NOS. However, NO can also be generated from nitrite and dietary nitrate present in some vegetables such as spinach, rocket or beets. Facultative anaerobic bacteria from the microbiota of the tongue surface rapidly reduce nitrate to nitrite. Without the action of microbiota, all nitrate would be eliminated in urine as humans lack nitrate reductase enzymes. In the acidic condition of the stomach, the nitrites are converted into nitrous acid, which is further transformed to NO and other nitrogen oxides. This essential role of microbiota in this recycling pathway displays a beautiful example of symbiosis around NO.

All microorganisms are not equal when facing NO. For some bacteria, NO is part of their metabolism. Indeed, NO is produced by certain denitrifying bacteria because it is a required intermediate of the nitrogen cycle. The nitrogen cycle is the biogeochemical cycle by which nitrogen is converted into nitrogen derivatives at different oxidation states. These derivatives constantly circulate between terrestrial and marine atmospheric ecosystems. The nitrogen biological cycle is essential for life and also has industrial applications such as wastewater treatment. However, for other bacteria, NO is toxic and harmful. To survive, those

Bereitgestellt von | De Gruyter / TCS
Angemeldet
Heruntergeladen am | 25.02.20 16:06

bacteria have developed processes to resist this toxic effect and persist inside their host. Specific genes allowed the bacteria to sense the NO and induce signaling pathways that further activate detoxification pathways.

Infectious diseases cause one-third of deaths worldwide and 43% in developing countries. In industrialized countries, there has been a period of sharp decline in the rate of infectious diseases due to the discovery of antibiotics, vaccination and improved hygiene measures. However, we are now facing re-emergence of some infectious diseases. Some mechanisms of resistance to NO stress are well preserved among bacteria and they could be potentially used as antimicrobial or anti-inflammatory strategies. Thereafter, better understanding the impact of NO toward host and bacteria could help in the development of a new strategy for controlling host/pathogen/microbiota interaction.

**Acknowledgments:** We wish to thank Olivier Dussurget and Isabelle Martin Verstraete for their precious advices in the redaction of this review. This work is supported by the public grants IDI 2015 and AAP Prematuration IDEX 2016, projects funded by the IDEX Paris Saclay, ANR-11-IDEX-0003-02, Funder Id: http://dx.doi.org/10.13039/501100001665.

## References

Adak, S., Aulak, K.S., and Stuehr, D.J. (2002a). Direct evidence for nitric oxide production by a nitric-oxide synthase-like protein from *Bacillus subtilis*. J. Biol. Chem. *277*, 16167–16171.

Adak, S., Bilwes, A.M., Panda, K., Hosfield, D., Aulak, K.S., McDonald, J.F., Tainer, J.A., Getzoff, E.D., Crane, B.R., and Stuehr, D.J. (2002b). Cloning, expression, and characterization of a nitric oxide synthase protein from *Deinococcus radiodurans*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *99*, 107–112.

Adeball, O., Sancar, A., and Selby, C.P. (2017). Mfd translocase is necessary and sufficient for transcription-coupled repair in *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. *292*, 18386–18391.

Agapie, T., Suseno, S., Woodward, J.J., Stoll, S., Britt, R.D., and Marletta, M.A. (2009). NO formation by a catalytically self-sufficient bacterial nitric oxide synthase from *Sorangium cellulosum*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *106*, 16221–16226.

Balasiny, B., Rolfe, M.D., Vine, C., Bradley, C., Green, J., and Cole, J. (2018). Release of nitric oxide by the *Escherichia coli* YtfE (RIC) protein and its reduction by the hybrid cluster protein in an integrated pathway to minimize cytoplasmic nitrosative stress. Microbiology *164*, 563–575.

Bang, I.S., Liu, L., Vazquez-Torres, A., Crouch, M.L., Stamler, J.S., and Fang, F.C. (2006). Maintenance of nitric oxide and redox homeostasis by the *Salmonella* flavohemoglobin hmp. J. Biol. Chem. *281*, 28039–28047.

Barraud, N., Kelso, M.J., Rice, S.A., and Kjelleberg, S. (2015). Nitric oxide: a key mediator of biofilm dispersal with applications in infectious diseases. Curr. Pharm. Des. *21*, 31–42.

Beinert, H. and Kennedy, M.C. (1993). Aconitase, a two-faced protein: enzyme and iron regulatory factor. FASEB. J. *7*, 1442–1449.

Benjamin, N., O'Driscoll, F., Dougall, H., Duncan, C., Smith, L., Golden, M., and McKenzie, H. (1994). Stomach NO synthesis. Nature *368*, 502.

Blomberg, M.R.A. and Adelroth, P. (2017). The mechanism for oxygen reduction in cytochrome c dependent nitric oxide reductase (cNOR) as obtained from a combination of theoretical and experimental results. Biochim. Biophys. Acta Bioenerg. *1858*, 884–894.

Bodenmiller, D.M. and Spiro, S. (2006). The *yjeB* (*nsrR*) gene of *Escherichia coli* encodes a nitric oxide-sensitive transcriptional regulator. J. Bacteriol. *188*, 874–881.

Brenot, A., King, K.Y., Janowiak, B., Griffith, O., and Caparon, M.G. (2004). Contribution of glutathione peroxidase to the virulence of *Streptococcus pyogenes*. Infect. Immun. *72*, 408–413.

Brzostek, A., Szulc, I., Klink, M., Brzezinska, M., Sulowska, Z., and Dziadek, J. (2014). Either non-homologous ends joining or homologous recombination is required to repair double-strand breaks in the genome of macrophage-internalized *Mycobacterium tuberculosis*. PLoS One *9*, e92799.

Bull, M.J. and Plummer, N.T. (2014). Part 1: The human gut microbiome in health and disease. Integr. Med. (Encinitas) *13*, 17–22.

Burnham, P.M. and Hendrixson, D.R. (2018). *Campylobacter jejuni*: collective components promoting a successful enteric lifestyle. Nat. Rev. Microbiol. *16*, 551–565.

Bush, M., Ghosh, T., Tucker, N., Zhang, X., and Dixon, R. (2011). Transcriptional regulation by the dedicated nitric oxide sensor, NorR: a route towards NO detoxification. Biochem. Soc. Trans. *39*, 289–293.

Butler, A.R. and Megson, I.L. (2002). Non-heme iron nitrosyls in biology. Chem. Rev. *102*, 1155–1166.

Cadby, I.T., Busby, S.J., and Cole, J.A. (2011). An HcpR homologue from *Desulfovibrio desulfuricans* and its possible role in nitrate reduction and nitrosative stress. Biochem. Soc. Trans. *39*, 224–229.

Cadby, I.T., Ibrahim, S.A., Faulkner, M., Lee, D.J., Browning, D., Busby, S.J., Lovering, A.L., Stapleton, M.R., Green, J., and Cole, J.A. (2016). Regulation, sensory domains and roles of two *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC27774 Crp family transcription factors, HcpR1 and HcpR2, in response to nitrosative stress. Mol. Microbiol. *102*, 1120–1137.

Cadby, I.T., Faulkner, M., Cheneby, J., Long, J., van Helden, J., Dolla, A., and Cole, J.A. (2017). Coordinated response of the *Desulfovibrio desulfuricans* 27774 transcriptome to nitrate, nitrite and nitric oxide. Sci. Rep. *7*, 16228.

Canthaboo, C., Xing, D., Wei, X.Q., and Corbel, M.J. (2002). Investigation of role of nitric oxide in protection from *Bordetella pertussis* respiratory challenge. Infect. Immun. *70*, 679–684.

Chakravortty, D., Hansen-Wester, I., and Hensel, M. (2002). *Salmonella* pathogenicity island 2 mediates protection of intracellular *Salmonella* from reactive nitrogen intermediates. J. Exp. Med. *195*, 1155–1166.

Choi, W.S., Chang, M.S., Han, J.W., Hong, S.Y., and Lee, H.W. (1997). Identification of nitric oxide synthase in *Staphylococcus aureus*. Biochem. Biophys. Res. Commun. *237*, 554–558.

Bereitgestellt von | De Gruyter / TCS
Angemeldet
Heruntergeladen am | 25.02.20 16:06

Choudhari, S.K., Chaudhary, M., Bagde, S., Gadbail, A.R., and Joshi, V. (2013). Nitric oxide and cancer: a review. World J. Surg. Oncol. *11*, 118.

Cole, C., Thomas, S., Filak, H., Henson, P.M., and Lenz, L.L. (2012). Nitric oxide increases susceptibility of Toll-like receptor-activated macrophages to spreading *Listeria monocytogenes*. Immunity *36*, 807–820.

Crack, J.C., Stapleton, M.R., Green, J., Thomson, A.J., and Le Brun, N.E. (2013). Mechanism of [4Fe-4S](Cys)4 cluster nitrosylation is conserved among NO-responsive regulators. J. Biol. Chem. *288*, 11492–11502.

Cross, R.K. and Wilson, K.T. (2003). Nitric oxide in inflammatory bowel disease. Inflamm. Bowel Dis. *9*, 179–189.

Cruz-Ramos, H., Crack, J., Wu, G., Hughes, M.N., Scott, C., Thomson, A.J., Green, J., and Poole, R.K. (2002). NO sensing by FNR: regulation of the *Escherichia coli* NO-detoxifying flavohaemoglobin, Hmp. EMBO. J. *21*, 3235–3244.

D'Autreaux, B., Touati, D., Bersch, B., Latour, J.M., and Michaud-Soret, I. (2002). Direct inhibition by nitric oxide of the transcriptional ferric uptake regulation protein via nitrosylation of the iron. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *99*, 16619–16624.

da Silva, S.M., Amaral, C., Neves, S.S., Santos, C., Pimentel, C., and Rodrigues-Pousada, C. (2015). An HcpR paralog of *Desulfovibrio gigas* provides protection against nitrosative stress. FEBS. Open Bio. *5*, 594–604.

Darfeuille-Michaud, A., Boudeau, J., Bulois, P., Neut, C., Glasser, A.L., Barnich, N., Bringer, M.A., Swidsinski, A., Beaugerie, L., and Colombel, J.F. (2004). High prevalence of adherent-invasive *Escherichia coli* associated with ileal mucosa in Crohn's disease. Gastroenterology *127*, 412–421.

Darrigo, C., Guillemet, E., Dervyn, R., and Ramarao, N. (2016). The bacterial Mfd protein prevents DNA damage induced by the host nitrogen immune response in a NER-independent but RecBC-dependent pathway. PLoS One *11*, e0163321.

Darwin, K.H. and Nathan, C.F. (2005). Role for nucleotide excision repair in virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. Infect. Immun. *73*, 4581–4587.

Darwin, K.H., Ehrt, S., Gutierrez-Ramos, J.C., Weich, N., and Nathan, C.F. (2003). The proteasome of *Mycobacterium tuberculosis* is required for resistance to nitric oxide. Science *302*, 1963–1966.

Demple, B., Ding, H., and Jorgensen, M. (2002). *Escherichia coli* SoxR protein: sensor/transducer of oxidative stress and nitric oxide. Methods Enzymol. *348*, 355–364.

Denkel, L.A., Horst, S.A., Rouf, S.F., Kitowski, V., Bohm, O.M., Rhen, M., Jager, T., and Bange, F.C. (2011). Methionine sulfoxide reductases are essential for virulence of *Salmonella typhimurium*. PLoS One *6*, e26974.

Ding, H. and Demple, B. (2000). Direct nitric oxide signal transduction via nitrosylation of iron-sulfur centers in the SoxR transcription activator. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *97*, 5146–5150.

Dong, M., Vongchampa, V., Gingipalli, L., Cloutier, J.F., Kow, Y.W., O'Connor, T., and Dedon, P.C. (2006). Development of enzymatic probes of oxidative and nitrosative DNA damage caused by reactive nitrogen species. Mutat. Res. *594*, 120–134.

Donovan, A., Brownlie, A., Zhou, Y., Shepard, J., Pratt, S.J., Moynihan, J., Paw, B.H., Drejer, A., Barut, B., Zapata, A., et al. (2000). Positional cloning of zebrafish ferroportin1 identifies a conserved vertebrate iron exporter. Nature *403*, 776–781.

Douglas, T., Daniel, D.S., Parida, B.K., Jagannath, C., and Dhandayuthapani, S. (2004). Methionine sulfoxide reductase A (MsrA) deficiency affects the survival of *Mycobacterium smegmatis* within macrophages. J. Bacteriol. *186*, 3590–3598.

Duan, W., Li, J., Inks, E.S., Chou, C.J., Jia, Y., Chu, X., Li, X., Xu, W., and Zhang, Y. (2015). Design, synthesis, and antitumor evaluation of novel histone deacetylase inhibitors equipped with a phenylsulfonylfuroxan module as a nitric oxide donor. J. Med. Chem. *58*, 4325–4338.

Elvers, K.T., Wu, G., Gilberthorpe, N.J., Poole, R.K., and Park, S.F. (2004). Role of an inducible single-domain hemoglobin in mediating resistance to nitric oxide and nitrosative stress in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. J. Bacteriol. *186*, 5332–5341.

Ezraty, B., Aussel, L., and Barras, F. (2005). Methionine sulfoxide reductases in prokaryotes. Biochim. Biophys. Acta. *1703*, 221–229.

Fabrega, A. and Vila, J. (2013). *Salmonella enterica* serovar Typhimurium skills to succeed in the host: virulence and regulation. Clin. Microbiol. Rev. *26*, 308–341.

Fang, F.C. and Vazquez-Torres, A. (2019). Reactive nitrogen species in host-bacterial interactions. Curr. Opin. Immunol. *60*, 96–102.

Fang, F.C., Vazquez-Torres, A., and Xu, Y. (1997). The transcriptional regulator SoxS is required for resistance of *Salmonella typhimurium* to paraquat but not for virulence in mice. Infect. Immun. *65*, 5371–5375.

Finer, N.N. and Barrington, K.J. (2006). Nitric oxide for respiratory failure in infants born at or near term. Cochrane Database Syst. Rev. CD000399.

Fitzpatrick, J. and Kim, E. (2015). Synthetic modeling chemistry of iron-sulfur clusters in nitric oxide signaling. Acc. Chem. Res. *48*, 2453–2461.

Frawley, E.R., Karlinsey, J.E., Singhal, A., Libby, S.J., Doulias, P.T., Ischiropoulos, H., and Fang, F.C. (2018). Nitric oxide disrupts zinc homeostasis in *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. MBio. *9*, e01040-18.

Gardner, P.R., Gardner, A.M., Martin, L.A., and Salzman, A.L. (1998). Nitric oxide dioxygenase: an enzymic function for flavohemoglobin. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *95*, 10378–10383.

Gardner, A.M., Helmick, R.A., and Gardner, P.R. (2002). Flavorubredoxin, an inducible catalyst for nitric oxide reduction and detoxification in *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. *277*, 8172–8177.

Gilberthorpe, N.J., Lee, M.E., Stevanin, T.M., Read, R.C., and Poole, R.K. (2007). NsrR: a key regulator circumventing *Salmonella enterica* serovar Typhimurium oxidative and nitrosative stress *in vitro* and in IFN-gamma-stimulated J774.2 macrophages. Microbiology *153*, 1756–1771.

Gilmore, M.S., Lebreton, F., and van Schaik, W. (2013). Genomic transition of *enterococci* from gut commensals to leading causes of multidrug-resistant hospital infection in the antibiotic era. Curr. Opin. Microbiol. *16*, 10–16.

Green, J., Crack, J.C., Thomson, A.J., and LeBrun, N.E. (2009). Bacterial sensors of oxygen. Curr. Opin. Microbiol. *12*, 145–151.

Guillemet, E., Lereec, A., Tran, S.L., Royer, C., Barbosa, I., Sansonetti, P., Lereclus, D., and Ramarao, N. (2016). The bacterial DNA repair protein Mfd confers resistance to the host nitrogen immune response. Sci. Rep. *6*, 29349.

Gusarov, I., Starodubtseva, M., Wang, Z.Q., McQuade, L., Lippard, S.J., Stuehr, D.J., and Nudler, E. (2008). Bacterial nitric-oxide synthases operate without a dedicated redox partner. J. Biol. Chem. *283*, 13140–13147.

Guthlein, C., Wanner, R.M., Sander, P., Davis, E.O., Bosshard, M., Jiricny, J., Bottger, E.C., and Springer, B. (2009).

Bereitgestellt von | De Gruyter / TCS
Angemeldet
Heruntergeladen am | 25.02.20 16:06

Characterization of the mycobacterial NER system reveals novel functions of the uvrD1 helicase. J. Bacteriol. *191*, 555–562.
Gutierrez, M.G., Master, S.S., Singh, S.B., Taylor, G.A., Colombo, M.I., and Deretic, V. (2004). Autophagy is a defense mechanism inhibiting BCG and *Mycobacterium tuberculosis* survival in infected macrophages. Cell *119*, 753–766.
Haine, V., Dozot, M., Dornand, J., Letesson, J.J., and De Bolle, X. (2006). NnrA is required for full virulence and regulates several *Brucella melitensis* denitrification genes. J. Bacteriol. *188*, 1615–1619.
Hausladen, A., Privalle, C.T., Keng, T., DeAngelo, J., and Stamler, J.S. (1996). Nitrosative stress: activation of the transcription factor OxyR. Cell. *86*, 719–729.
Henard, C.A. and Vazquez-Torres, A. (2012). DksA-dependent resistance of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium against the antimicrobial activity of inducible nitric oxide synthase. Infect. Immun. *80*, 1373–1380.
Hendriks, J., Oubrie, A., Castresana, J., Urbani, A., Gemeinhardt, S., and Saraste, M. (2000). Nitric oxide reductases in bacteria. Biochim. Biophys. Acta. *1459*, 266–273.
Herbst, S., Schaible, U.E., and Schneider, B.E. (2011). Interferon gamma activated macrophages kill *mycobacteria* by nitric oxide induced apoptosis. PLoS One *6*, e19105.
Heylen, K., Vanparys, B., Gevers, D., Wittebolle, L., Boon, N., and De Vos, P. (2007). Nitric oxide reductase (*norB*) gene sequence analysis reveals discrepancies with nitrite reductase (*nir*) gene phylogeny in cultivated denitrifiers. Environ. Microbiol. *9*, 1072–1077.
Hosoi, T., Goto, H., Arisawa, T., Niwa, Y., Okada, N., Ohmiya, N., and Hayakawa, T. (2001). Role of nitric oxide synthase inhibitor in experimental colitis induced by 2,4,6-trinitrobenzene sulphonic acid in rats. Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. *28*, 9–12.
Hotta, Y., Kataoka, T., Mori, T., and Kimura, K. (2019). Review of a potential novel approach for erectile dysfunction: light-controllable nitric oxide donors and nanoformulations. Sex Med. Rev. pii: S2050-0521(19)30057-5. doi: 10.1016/j.sxmr.2019.05.006. [Epub ahead of print].
Houghton, J., Townsend, C., Williams, A.R., Rodgers, A., Rand, L., Walker, K.B., Bottger, E.C., Springer, B., and Davis, E.O. (2012). Important role for *Mycobacterium tuberculosis* UvrD1 in pathogenesis and persistence apart from its function in nucleotide excision repair. J. Bacteriol. *194*, 2916–2923.
Huang, P.L. (2009). eNOS, metabolic syndrome and cardiovascular disease. Trends Endocrinol. Metab. *20*, 295–302.
Huang, K., Wang, D., Frederiksen, R.F., Rensing, C., Olsen, J.E., and Fresno, A.H. (2017). Investigation of the role of genes encoding zinc exporters zntA, zitB, and fieF during *Salmonella Typhimurium* infection. Front Microbiol. *8*, 2656.
Hussain, S.P., Trivers, G.E., Hofseth, L.J., He, P., Shaikh, I., Mechanic, L.E., Doja, S., Jiang, W., Subleski, J., Shorts, L., et al. (2004). Nitric oxide, a mediator of inflammation, suppresses tumorigenesis. Cancer Res. *64*, 6849–6853.
Ichimura, K., Shimizu, T., Matsumoto, A., Hirai, S., Yokoyama, E., Takeuchi, H., Yahiro, K., and Noda, M. (2017). Nitric oxide-enhanced Shiga toxin production was regulated by Fur and RecA in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157. Microbiologyopen *6*, e00461.
Islam, B.U., Habib, S., Ali, S.A., Moinuddin, and Ali, A. (2017). Role of peroxynitrite-induced activation of poly(ADP-Ribose) polymerase (PARP) in circulatory shock and related pathological conditions. Cardiovasc. Toxicol. *17*, 373–383.
Ito, C., Saito, Y., Nozawa, T., Fujii, S., Sawa, T., Inoue, H., Matsunaga, T., Khan, S., Akashi, S., Hashimoto, R., et al. (2013). Endogenous nitrated nucleotide is a key mediator of autophagy and innate defense against bacteria. Mol. Cell. *52*, 794–804.
Jadert, C., Phillipson, M., Holm, L., Lundberg, J.O., and Borniquel, S. (2014). Preventive and therapeutic effects of nitrite supplementation in experimental inflammatory bowel disease. Redox Biol. *2*, 73–81.
Jadeski, L.C., Chakraborty, C., and Lala, P.K. (2003). Nitric oxide-mediated promotion of mammary tumour cell migration requires sequential activation of nitric oxide synthase, guanylate cyclase and mitogen-activated protein kinase. Int. J. Cancer. *106*, 496–504.
Jamaati, H., Mortaz, E., Pajouhi, Z., Folkerts, G., Movassaghi, M., Moloudizargari, M., Adcock, I.M., and Garssen, J. (2017). Nitric oxide in the pathogenesis and treatment of tuberculosis. Front Microbiol. *8*, 2008.
Jastrab, J.B. and Darwin, K.H. (2015). Bacterial proteasomes. Annu. Rev. Microbiol. *69*, 109–127.
Jia, W., Whitehead, R.N., Griffiths, L., Dawson, C., Bai, H., Waring, R.H., Ramsden, D.B., Hunter, J.O., Cauchi, M., Bessant, C., et al. (2012). Diversity and distribution of sulphate-reducing bacteria in human faeces from healthy subjects and patients with inflammatory bowel disease. FEMS. Immunol. Med. Microbiol. *65*, 55–68.
Jianjun, Y., Zhang, R., Lu, G., Shen, Y., Peng, L., Zhu, C., Cui, M., Wang, W., Arnaboldi, P., Tang, M., et al. (2013). T cell-derived inducible nitric oxide synthase switches off Th17 cell differentiation. J. Exp. Med. *210*, 1447–1462.
Justino, M.C., Vicente, J.B., Teixeira, M., and Saraiva, L.M. (2005). New genes implicated in the protection of anaerobically grown *Escherichia coli* against nitric oxide. J. Biol. Chem. *280*, 2636–2643.
Justino, M.C., Almeida, C.C., Goncalves, V.L., Teixeira, M., and Saraiva, L.M. (2006). *Escherichia coli* YtfE is a di-iron protein with an important function in assembly of iron-sulphur clusters. FEMS. Microbiol. Lett. *257*, 278–284.
Kapil, V., Haydar, S.M., Pearl, V., Lundberg, J.O., Weitzberg, E., and Ahluwalia, A. (2013). Physiological role for nitrate-reducing oral bacteria in blood pressure control. Free. Radic. Biol. Med. *55*, 93–100.
Kim, S.O., Orii, Y., Lloyd, D., Hughes, M.N., and Poole, R.K. (1999). Anoxic function for the *Escherichia coli* flavohaemoglobin (Hmp): reversible binding of nitric oxide and reduction to nitrous oxide. FEBS. Lett. *445*, 389–394.
Kinkel, T.L., Ramos-Montanez, S., Pando, J.M., Tadeo, D.V., Strom, E.N., Libby, S.J., and Fang, F.C. (2016). An essential role for bacterial nitric oxide synthase in *Staphylococcus aureus* electron transfer and colonization. Nat. Microbiol. *2*, 16224.
Kint, N., Janoir, C., Monot, M., Hoys, S., Soutourina, O., Dupuy, B., and Martin-Verstraete, I. (2017). The alternative sigma factor sigma(B) plays a crucial role in adaptive strategies of *Clostridium difficile* during gut infection. Environ. Microbiol. *19*, 1933–1958.
Kisker, C., Kuper, J., and Van Houten, B. (2013). Prokaryotic nucleotide excision repair. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. *5*, a012591.
Kisley, L.R., Barrett, B.S., Bauer, A.K., Dwyer-Nield, L.D., Barthel, B., Meyer, A.M., Thompson, D.C., and Malkinson, A.M. (2002). Genetic ablation of inducible nitric oxide synthase decreases mouse lung tumorigenesis. Cancer Res. *62*, 6850–6856.

Bereitgestellt von | De Gruyter / TCS
Angemeldet
Heruntergeladen am | 25.02.20 16:06

Kollios, G., Valatas, V., and Ward, S.G. (2004). Nitric oxide in inflammatory bowel disease: a universal messenger in an unsolved puzzle. Immunology *113*, 427–437.

Korner, H., Sofia, H.J., and Zumft, W.G. (2003). Phylogeny of the bacterial superfamily of Crp-Fnr transcription regulators: exploiting the metabolic spectrum by controlling alternative gene programs. FEMS. Microbiol. Rev. *27*, 559–592.

Le, N.T. and Richardson, D.R. (2002). Ferroportin1: a new iron export molecule? Int. J. Biochem. Cell Biol. *34*, 103–108.

Lee, W.L., Gold, B., Darby, C., Brot, N., Jiang, X., de Carvalho, L.P., Wellner, D., St John, G., Jacobs, W.R., Jr., and Nathan, C. (2009). *Mycobacterium tuberculosis* expresses methionine sulphoxide reductases A and B that protect from killing by nitrite and hypochlorite. Mol. Microbiol. *71*, 583–593.

Martinez-Medina, M., Aldeguer, X., Lopez-Siles, M., Gonzalez-Huix, F., Lopez-Oliu, C., Dahbi, G., Blanco, J.E., Blanco, J., Garcia-Gil, L.J., and Darfeuille-Michaud, A. (2009). Molecular diversity of *Escherichia coli* in the human gut: new ecological evidence supporting the role of adherent-invasive *E. coli* (AIEC) in Crohn's disease. Inflamm. Bowel Dis. *15*, 872–882.

Masip, L., Veeravalli, K., and Georgiou, G. (2006). The many faces of glutathione in bacteria. Antioxid. Redox Signal. *8*, 753–762.

Mason, K.L., Stepien, T.A., Blum, J.E., Holt, J.F., Labbe, N.H., Rush, J.S., Raffa, K.F., and Handelsman, J. (2011). From commensal to pathogen: translocation of *Enterococcus faecalis* from the midgut to the hemocoel of Manduca sexta. MBio. *2*, e00065–e00011.

Matziouridou, C., Rocha, S.D.C., Haabeth, O.A., Rudi, K., Carlsen, H., and Kielland, A. (2018). INOS- and NOX1-dependent ROS production maintains bacterial homeostasis in the ileum of mice. Mucosal. Immunol. *11*, 774–784.

McFarland, A.P., Burke, T.P., Carletti, A.A., Glover, R.C., Tabakh, H., Welch, M.D., and Woodward, J.J. (2018). RECON-dependent inflammation in hepatocytes enhances *Listeria monocytogenes* cell-to-cell spread. MBio. *9*, e00526-18.

Mercanoglu, G., Safran, N., Ahishali, B.B., Uzun, H., Yalcin, A., and Mercanoglu, F. (2015). Nitric oxide mediated effects of nebivolol in myocardial infarction: the source of nitric oxide. Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci. *19*, 4872–4889.

Mills, P.C., Rowley, G., Spiro, S., Hinton, J.C., and Richardson, D.J. (2008). A combination of cytochrome c nitrite reductase (NrfA) and flavorubredoxin (NorV) protects *Salmonella enterica* serovar Typhimurium against killing by NO in anoxic environments. Microbiology *154*, 1218–1228.

Miquel, S., Martin, R., Rossi, O., Bermudez-Humaran, L.G., Chatel, J.M., Sokol, H., Thomas, M., Wells, J.M., and Langella, P. (2013). *Faecalibacterium prausnitzii* and human intestinal health. Curr. Opin. Microbiol. *16*, 255–261.

Mirnejad, R., Jazi, F.M., Mostafaei, S., and Sedighi, M. (2017). Molecular investigation of virulence factors of *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* strains isolated from clinical and non-clinical samples. Microb. Pathog. *109*, 8–14.

Mitchell, J.G. and Kogure, K. (2006). Bacterial motility: links to the environment and a driving force for microbial physics. FEMS. Microbiol. Ecol. *55*, 3–16.

Miyoshi, T., Li, Y., Shih, D.M., Wang, X., Laubach, V.E., Matsumoto, A.H., Helm, G.A., Lusis, A.J., and Shi, W. (2006). Deficiency of inducible NO synthase reduces advanced but not early atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. Life Sci. *79*, 525–531.

Montfort, W.R., Wales, J.A., and Weichsel, A. (2017). Structure and activation of soluble guanylyl cyclase, the nitric oxide sensor. Antioxid. Redox Signal. *26*, 107–121.

Montgomery, H.J., Dupont, A.L., Leivo, H.E., and Guillemette, J.G. (2010). Cloning, expression, and purification of a nitric oxide synthase-like protein from *Bacillus cereus*. Biochem. Res. Int. *2010*, 489892.

Moore, C.M., Nakano, M.M., Wang, T., Ye, R.W., and Helmann, J.D. (2004). Response of *Bacillus subtilis* to nitric oxide and the nitrosating agent sodium nitroprusside. J. Bacteriol. *186*, 4655–4664.

Morbidelli, L., Donnini, S., and Ziche, M. (2003). Role of nitric oxide in the modulation of angiogenesis. Curr. Pharm. Des. *9*, 521–530.

Mukhopadhyay, P., Zheng, M., Bedzyk, L.A., LaRossa, R.A., and Storz, G. (2004). Prominent roles of the NorR and Fur regulators in the *Escherichia coli* transcriptional response to reactive nitrogen species. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *101*, 745–750.

Murrell, W. (1879). Nitro-glycerine as a remedy for angina pectoris. MRCP. *113*, 80–81.

Nairz, M., Schleicher, U., Schroll, A., Sonnweber, T., Theurl, I., Ludwiczek, S., Talasz, H., Brandacher, G., Moser, P.L., Muckenthaler, M.U., et al. (2013). Nitric oxide-mediated regulation of ferroportin-1 controls macrophage iron homeostasis and immune function in *Salmonella* infection. J. Exp. Med. *210*, 855–873.

Nairz, M., Dichtl, S., Schroll, A., Haschka, D., Tymoszuk, P., Theurl, I., and Weiss, G. (2018). Iron and innate antimicrobial immunity-Depriving the pathogen, defending the host. J. Trace Elem. Med. Biol. *48*, 118–133.

Nakagawa, I., Amano, A., Mizushima, N., Yamamoto, A., Yamaguchi, H., Kamimoto, T., Nara, A., Funao, J., Nakata, M., Tsuda, K., et al. (2004). Autophagy defends cells against invading group A *Streptococcus*. Science *306*, 1037–1040.

Nakano, M.M., Geng, H., Nakano, S., and Kobayashi, K. (2006). The nitric oxide-responsive regulator NsrR controls ResDE-dependent gene expression. J. Bacteriol. *188*, 5878–5887.

Negroni, A., Costanzo, M., Vitali, R., Superti, F., Bertuccini, L., Tinari, A., Minelli, F., Di Nardo, G., Nuti, F., Pierdomenico, M., et al. (2012). Characterization of adherent-invasive *Escherichia coli* isolated from pediatric patients with inflammatory bowel disease. Inflamm. Bowel Dis. *18*, 913–924.

Nishino, K., Nishida, A., Inoue, R., Kawada, Y., Ohno, M., Sakai, S., Inatomi, O., Bamba, S., Sugimoto, M., Kawahara, M., et al. (2018). Analysis of endoscopic brush samples identified mucosa-associated dysbiosis in inflammatory bowel disease. J. Gastroenterol. *53*, 95–106.

Nunoshiba, T., DeRojas-Walker, T., Tannenbaum, S.R., and Demple, B. (1995). Roles of nitric oxide in inducible resistance of Escherichia coli to activated murine macrophages. Infect. Immun. *63*, 794–798.

Overton, T.W., Justino, M.C., Li, Y., Baptista, J.M., Melo, A.M., Cole, J.A., and Saraiva, L.M. (2008). Widespread distribution in pathogenic bacteria of di-iron proteins that repair oxidative and nitrosative damage to iron-sulfur centers. J. Bacteriol. *190*, 2004–2013.

Pacher, P., Beckman, J.S., and Liaudet, L. (2007). Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. Physiol. Rev. *87*, 315–424.

Pathania, R., Navani, N.K., Gardner, A.M., Gardner, P.R., and Dikshit, K.L. (2002). Nitric oxide scavenging and detoxification by the *Mycobacterium tuberculosis* haemoglobin, HbN in *Escherichia coli*. Mol. Microbiol. *45*, 1303–1314.

Bereitgestellt von | De Gruyter / TCS
Angemeldet
Heruntergeladen am | 25.02.20 16:06

Paul, B.J., Berkmen, M.B., and Gourse, R.L. (2005). DksA potentiates direct activation of amino acid promoters by ppGpp. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *102*, 7823–7828.

Pawaria, S., Rajamohan, G., Gambhir, V., Lama, A., Varshney, G.C., and Dikshit, K.L. (2007). Intracellular growth and survival of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium carrying truncated hemoglobins of *Mycobacterium tuberculosis*. Microb. Pathog. *42*, 119–128.

Penarando, J., Lopez-Sanchez, L.M., Mena, R., Gull-Luna, S., Conde, F., Hernandez, V., Toledano, M., Gudino, V., Raponi, M., Billard, C., et al. (2018). A role for endothelial nitric oxide synthase in intestinal stem cell proliferation and mesenchymal colorectal cancer. BMC. Biol. *16*, 3.

Pittman, M.S., Elvers, K.T., Lee, L., Jones, M.A., Poole, R.K., Park, S.F., and Kelly, D.J. (2007). Growth of *Campylobacter jejuni* on nitrate and nitrite: electron transport to NapA and NrfA via NrfH and distinct roles for NrfA and the globin Cgb in protection against nitrosative stress. Mol. Microbiol. *63*, 575–590.

Poole, R.K. and Hughes, M.N. (2000). New functions for the ancient globin family: bacterial responses to nitric oxide and nitrosative stress. Mol. Microbiol. *36*, 775–783.

Reinders, C.I., Hellstrom, P.M., Bjork, J., Weitzberg, E., and Lundberg, J.O. (2004). Effect of intravenous L-NMMA on nitric oxide production in collagenous colitis. Scand. J. Gastroenterol. *39*, 32–36.

Richardson, A.R., Dunman, P.M., and Fang, F.C. (2006). The nitrosative stress response of *Staphylococcus aureus* is required for resistance to innate immunity. Mol. Microbiol. *61*, 927–939.

Richardson, A.R., Soliven, K.C., Castor, M.E., Barnes, P.D., Libby, S.J., and Fang, F.C. (2009). The base excision repair system of *Salmonella enterica* serovar typhimurium counteracts DNA damage by host nitric oxide. PLoS Pathog. *5*, e1000451.

Rivero, A. (2006). Nitric oxide: an antiparasitic molecule of invertebrates. Trends Parasitol. *22*, 219–225.

Rodionov, D.A., Dubchak, I.L., Arkin, A.P., Alm, E.J., and Gelfand, M.S. (2005). Dissimilatory metabolism of nitrogen oxides in bacteria: comparative reconstruction of transcriptional networks. PLoS Comput. Biol. *1*, e55.

Saleh, M., Bartual, S.G., Abdullah, M.R., Jensch, I., Asmat, T.M., Petruschka, L., Pribyl, T., Gellert, M., Lillig, C.H., Antelmann, H., et al. (2013). Molecular architecture of *Streptococcus pneumoniae* surface thioredoxin-fold lipoproteins crucial for extracellular oxidative stress resistance and maintenance of virulence. EMBO. Mol. Med. *5*, 1852–1870.

Samanovic, M.I., Tu, S., Novak, O., Iyer, L.M., McAllister, F.E., Aravind, L., Gygi, S.P., Hubbard, S.R., Strnad, M., and Darwin, K.H. (2015). Proteasomal control of cytokinin synthesis protects *Mycobacterium tuberculosis* against nitric oxide. Mol. Cell *57*, 984–994.

Sapp, A.M., Mogen, A.B., Almand, E.A., Rivera, F.E., Shaw, L.N., Richardson, A.R., and Rice, K.C. (2014). Contribution of the nos-pdt operon to virulence phenotypes in methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus*. PLoS One *9*, e108868.

Savidge, T.C., Urvil, P., Oezguen, N., Ali, K., Choudhury, A., Acharya, V., Pinchuk, I., Torres, A.G., English, R.D., Wiktorowicz, J.E., et al. (2011). Host S-nitrosylation inhibits clostridial small molecule-activated glucosylating toxins. Nat. Med. *17*, 1136–1141.

Schapiro, J.M., Libby, S.J., and Fang, F.C. (2003). Inhibition of bacterial DNA replication by zinc mobilization during nitrosative stress. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *100*, 8496–8501.

Scorza, G., Pietraforte, D., and Minetti, M. (1997). Role of ascorbate and protein thiols in the release of nitric oxide from S-nitroso-albumin and S-nitroso-glutathione in human plasma. Free Radic. Biol. Med. *22*, 633–642.

Selby, C.P. (2017). Mfd protein and transcription-repair coupling in *Escherichia coli*. Photochem. Photobiol. *93*, 280–295.

Selby, C.P., Witkin, E.M., and Sancar, A. (1991). *Escherichia coli mfd* mutant deficient in "mutation frequency decline" lacks strand-specific repair: in vitro complementation with purified coupling factor. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *88*, 11574–11578.

Sennequier, N. and Goff, S.V.-L. (1998). Biosynthèse du monoxyde d'azote (NO): mécanisme, régulation et contrôle [Biosynthesis of NO: mechanism, regulation and control]. Médecine/science *14*, 1185–1195.

Shatalin, K., Gusarov, I., Avetissova, E., Shatalina, Y., McQuade, L.E., Lippard, S.J., and Nudler, E. (2008). *Bacillus anthracis*-derived nitric oxide is essential for pathogen virulence and survival in macrophages. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *105*, 1009–1013.

Shimizu, T., Hirai, S., Yokoyama, E., Ichimura, K., and Noda, M. (2015). An evolutionary analysis of nitric oxide reductase gene norV in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157. Infect. Genet. Evol. *33*, 176–181.

Singer, M., Deutschman, C.S., Seymour, C.W., Shankar-Hari, M., Annane, D., Bauer, M., Bellomo, R., Bernard, G.R., Chiche, J.D., Coopersmith, C.M., et al. (2016). The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (Sepsis-3). J. Am. Med. Assoc. *315*, 801–810.

Singh, V.K., Walsh, M., Johansson, T.R., Baum, K.R., Ring, R.P., Singh, S., Shukla, S.K., and Moskovitz, J. (2015). Significance of four methionine sulfoxide reductases in *Staphylococcus aureus*. PLoS One *10*, e0117594.

Sobko, T., Reinders, C.I., Jansson, E., Norin, E., Midtvedt, T., and Lundberg, J.O. (2005). Gastrointestinal bacteria generate nitric oxide from nitrate and nitrite. Nitric Oxide. *13*, 272–278.

Sobko, T., Huang, L., Midtvedt, T., Norin, E., Gustafsson, L.E., Norman, M., Jansson, E.A., and Lundberg, J.O. (2006). Generation of NO by probiotic bacteria in the gastrointestinal tract. Free Radic. Biol. Med. *41*, 985–991.

Sokol, H., Pigneur, B., Watterlot, L., Lakhdari, O., Bermudez-Humaran, L.G., Gratadoux, J.J., Blugeon, S., Bridonneau, C., Furet, J.P., Corthier, G., et al. (2008). *Faecalibacterium prausnitzii* is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *105*, 16731–16736.

Spek, E.J., Wright, T.L., Stitt, M.S., Taghizadeh, N.R., Tannenbaum, S.R., Marinus, M.G., and Engelward, B.P. (2001). Recombinational repair is critical for survival of *Escherichia coli* exposed to nitric oxide. J. Bacteriol. *183*, 131–138.

Spiro, S. (2007). Regulators of bacterial responses to nitric oxide. FEMS. Microbiol. Rev. *31*, 193–211.

St John, G., Brot, N., Ruan, J., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Weissbach, H., and Nathan, C. (2001). Peptide methionine sulfoxide reductase from *Escherichia coli* and *Mycobacterium tuberculosis* protects bacteria against oxidative damage from reactive nitrogen intermediates. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *98*, 9901–9906.

Stamler, J.S., Lamas, S., and Fang, F.C. (2001). Nitrosylation. The prototypic redox-based signaling mechanism. Cell *106*, 675–683.

Stern, A.M., Liu, B., Bakken, L.R., Shapleigh, J.P., and Zhu, J. (2013). A novel protein protects bacterial iron-dependent metabolism from nitric oxide. J. Bacteriol. *195*, 4702–4708.

Bereitgestellt von | De Gruyter / TCS
Angemeldet
Heruntergeladen am | 25.02.20 16:06

Stevanin, T.M., Read, R.C., and Poole, R.K. (2007). The *hmp* gene encoding the NO-inducible flavohaemoglobin in *Escherichia coli* confers a protective advantage in resisting killing within macrophages, but not *in vitro*: links with swarming motility. Gene *398*, 62–68.

Stryer, L. (1995). Biochemistry, 4th edition. (New York, NY, USA: W. H Freeman and Company), p. 732.

Sudhamsu, J. and Crane, B.R. (2009). Bacterial nitric oxide synthases: what are they good for? Trends Microbiol. *17*, 212–218.

Suharti, Strampraad, M.J., Schroder, I., and de Vries, S. (2001). A novel copper A containing menaquinol NO reductase from *Bacillus azotoformans*. Biochemistry *40*, 2632–2639.

Suvarnapunya, A.E., Lagasse, H.A., and Stein, M.A. (2003). The role of DNA base excision repair in the pathogenesis of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. Mol. Microbiol. *48*, 549–559.

Svensson, L., Poljakovic, M., Save, S., Gilberthorpe, N., Schon, T., Strid, S., Corker, H., Poole, R.K., and Persson, K. (2010). Role of flavohemoglobin in combating nitrosative stress in uropathogenic *Escherichia coli* – implications for urinary tract infection. Microb. Pathog. *49*, 59–66.

Swiatczak, B. and Cohen, I.R. (2015). Gut feelings of safety: tolerance to the microbiota mediated by innate immune receptors. Microbiol. Immunol. *59*, 573–585.

Tarantino, M., Dionisi, A.M., Pistola, C., Petrucci, P., Luzzi, I., and Pasquali, P. (2009). Involvement of nitric oxide in the control of a mouse model of *Campylobacter jejuni* infection. FEMS. Immunol. Med. Microbiol. *56*, 98–101.

Tharmalingam, S., Alhasawi, A., Appanna, V.P., Lemire, J., and Appanna, V.D. (2017). Reactive nitrogen species (RNS)-resistant microbes: adaptation and medical implications. Biol. Chem. *398*, 1193–1208.

Thursby, E. and Juge, N. (2017). Introduction to the human gut microbiota. Biochem. J. *474*, 1823–1836.

Tiso, M. and Schechter, A.N. (2015). Nitrate reduction to nitrite, nitric oxide and ammonia by gut bacteria under physiological conditions. PLoS One *10*, e0119712.

Tricoire, L. and Vitalis, T. (2012). Neuronal nitric oxide synthase expressing neurons: a journey from birth to neuronal circuits. Front Neural. Circuits *6*, 82.

Tucker, N.P., Le Brun, N.E., Dixon, R., and Hutchings, M.I. (2010). There's NO stopping NsrR, a global regulator of the bacterial NO stress response. Trends Microbiol. *18*, 149–156.

Umezawa, K., Akaike, T., Fujii, S., Suga, M., Setoguchi, K., Ozawa, A., and Maeda, H. (1997). Induction of nitric oxide synthesis and xanthine oxidase and their roles in the antimicrobial mechanism against *Salmonella typhimurium* infection in mice. Infect. Immun. *65*, 2932–2940.

Valish, M. and Singh, V.K. (2013). Antioxidant functions of nitric oxide synthase in a methicillin sensitive *Staphylococcus aureus*. Int. J. Microbiol. *2013*, 312146.

van Sorge, N.M., Beasley, F.C., Gusarov, I., Gonzalez, D.J., von Kockritz-Blickwede, M., Anik, S., Borkowski, A.W., Dorrestein, P.C., Nudler, E., and Nizet, V. (2013). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacterial nitric-oxide synthase affects antibiotic sensitivity and skin abscess development. J. Biol. Chem. *288*, 6417–6426.

Vareille, M., de Sablet, T., Hindre, T., Martin, C., and Gobert, A.P. (2007). Nitric oxide inhibits Shiga-toxin synthesis by enterohemorrhagic *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *104*, 10199–10204.

Vasudevan, S.G., Armarego, W.L., Shaw, D.C., Lilley, P.E., Dixon, N.E., and Poole, R.K. (1991). Isolation and nucleotide sequence of the *hmp* gene that encodes a haemoglobin-like protein in *Escherichia coli* K-12. Mol. Gen. Genet. *226*, 49–58.

Vazquez-Torres, A. and Baumler, A.J. (2016). Nitrate, nitrite and nitric oxide reductases: from the last universal common ancestor to modern bacterial pathogens. Curr. Opin. Microbiol. *29*, 1–8.

Vergne, I., Singh, S., Roberts, E., Kyei, G., Master, S., Harris, J., de Haro, S., Naylor, J., Davis, A., Delgado, M., and Deretic, V. (2006). Autophagy in immune defense against *Mycobacterium tuberculosis*. Autophagy *2*, 175–178.

Vermeiren, J., Van de Wiele, T., Verstraete, W., Boeckx, P., and Boon, N. (2009). Nitric oxide production by the human intestinal microbiota by dissimilatory nitrate reduction to ammonium. J. Biomed. Biotechnol. *2009*, 284718.

Vincent, S.R. (2010). Nitric oxide neurons and neurotransmission. Prog. Neurobiol. *90*, 246–255.

Vine, C.E., Justino, M.C., Saraiva, L.M., and Cole, J. (2010). Detection by whole genome microarrays of a spontaneous 126-gene deletion during construction of a *ytfE* mutant: confirmation that a *ytfE* mutation results in loss of repair of iron-sulfur centres in proteins damaged by oxidative or nitrosative stress. J. Microbiol. Methods. *81*, 77–79.

Volbeda, A., Dodd, E.L., Darnault, C., Crack, J.C., Renoux, O., Hutchings, M.I., Le Brun, N.E., and Fontecilla-Camps, J.C. (2017). Crystal structures of the NO sensor NsrR reveal how its iron-sulfur cluster modulates DNA binding. Nat. Commun. *8*, 15052.

Walter, U., Eigenthaler, M., Geiger, J., and Reinhard, M. (1993). Role of cyclic nucleotide-dependent protein kinases and their common substrate VASP in the regulation of human platelets. Adv. Exp. Med. Biol. *344*, 237–249.

Wang, J., Vine, C.E., Balasiny, B.K., Rizk, J., Bradley, C.L., Tinajero-Trejo, M., Poole, R.K., Bergaust, L.L., Bakken, L.R., and Cole, J.A. (2016). The roles of the hybrid cluster protein, Hcp and its reductase, Hcr, in high affinity nitric oxide reduction that protects anaerobic cultures of *Escherichia coli* against nitrosative stress. Mol. Microbiol. *100*, 877–892.

Weiner, H.L., da Cunha, A.P., Quintana, F., and Wu, H. (2011). Oral tolerance. Immunol. Rev. *241*, 241–259.

Wink, D.A., Kasprzak, K.S., Maragos, C.M., Elespuru, R.K., Misra, M., Dunams, T.M., Cebula, T.A., Koch, W.H., Andrews, A.W., Allen, J.S., et al. (1991). DNA deaminating ability and genotoxicity of nitric oxide and its progenitors. Science *254*, 1001–1003.

Winter, S.E. and Baumler, A.J. (2014). Dysbiosis in the inflamed intestine: chance favors the prepared microbe. Gut Microbes. *5*, 71–73.

Winter, S.E., Winter, M.G., Xavier, M.N., Thiennimitr, P., Poon, V., Keestra, A.M., Laughlin, R.C., Gomez, G., Wu, J., Lawhon, S.D., et al. (2013). Host-derived nitrate boosts growth of *E. coli* in the inflamed gut. Science *339*, 708–711.

Wu, G., Cruz-Ramos, H., Hill, S., Green, J., Sawers, G., and Poole, R.K. (2000). Regulation of cytochrome bd expression in the obligate aerobe *Azotobacter vinelandii* by CydR (Fnr). Sensitivity to oxygen, reactive oxygen species, and nitric oxide. J. Biol. Chem. *275*, 4679–4686.

Yang, C.S., Yuk, J.M., and Jo, E.K. (2009). The role of nitric oxide in mycobacterial infections. Immune Netw. *9*, 46–52.

Zhang, Y.H., Jin, C.Z., Jang, J.H., and Wang, Y. (2014). Molecular mechanisms of neuronal nitric oxide synthase in cardiac function and pathophysiology. J. Physiol. *592*, 3189–3200.

Bereitgestellt von | De Gruyter / TCS
Angemeldet
Heruntergeladen am | 25.02.20 16:06

Zhao, C., Hartke, A., La Sorda, M., Posteraro, B., Laplace, J.M., Auffray, Y., and Sanguinetti, M. (2010). Role of methionine sulfoxide reductases A and B of *Enterococcus faecalis* in oxidative stress and virulence. Infect Immun. *78*, 3889–3897.

Zhao, C., Zhou, Z., Zhang, T., Liu, F., Zhang, C.Y., Zen, K., and Gu, H. (2017). *Salmonella* small RNA fragment Sal-1 facilitates bacterial survival in infected cells via suppressing iNOS induction in a microRNA manner. Sci. Rep. *7*, 16979.

Zingarelli, B., O'Connor, M., Wong, H., Salzman, A.L., and Szabo, C. (1996). Peroxynitrite-mediated DNA strand breakage activates poly-adenosine diphosphate ribosyl synthetase and causes cellular energy depletion in macrophages stimulated with bacterial lipopolysaccharide. J. Immunol. *156*, 350–358.

Zumft, W.G. (2005). Nitric oxide reductases of prokaryotes with emphasis on the respiratory, heme-copper oxidase type. J. Inorg. Biochem. *99*, 194–215.

Bereitgestellt von | De Gruyter / TCS
Angemeldet
Heruntergeladen am | 25.02.20 16:06

## Annexe 2: RNA sample description

| Sample name | CFU/mL | Sample description | Griess assay [NO] (µM) | RIN Bioanalyseur | volume (µl) | concentration QuBit(ng/µl) | Total reads |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| R12-To | 1,05E+06 | Initial condition: T = 0 of replicate n ° 12 | 1,3 | 8,9 | 10 | 152 | 19 032 476 |
| R12-15A | 2,75E+06 | Control condition (without stress) after 15min at 37° | 1,3 | 9,3 | 10 | 141 | 22 683 579 |
| R12-15B | 3,40E+06 | 15 min incubation with 10µM of NO | 10,5 | 10 | 10 | 220 | 18 884 247 |
| R12-15C | 1,40E+06 | 15 min incubation with 50µM of NO | 64,5 | 9,2 | 10 | 147 | 19 975 417 |
| R12-1A | 4,95E+06 | Control condition (without stress) after 60min at 37° | 1,8 | 10 | 10 | 116 | 20 970 283 |
| R12-1B | 5,40E+06 | 60 min incubation with 10µM of NO | 6,1 | 9,8 | 10 | 138 | 20 242 855 |
| R12-1C | 3,55E+06 | 60 min incubation with 50µM of NO | 38,9 | 9,8 | 10 | 121 | 18 736 994 |
| R14-To | 1,08E+06 | Initial condition: T = 0 of replicate n ° 14 | 1,8 | 9,6 | 10 | 118 | 20 124 783 |
| R14-15A | 8,65E+05 | Control condition (without stress) after 15min at 37° | 2,1 | 9,4 | 10 | 114 | 20 791 322 |
| R14-15B | 1,16E+06 | 15 min incubation with 10µM of NO | 9,1 | 9,8 | 10 | 108 | 21 988 766 |
| R14-15C | 9,05E+05 | 15 min incubation with 50µM of NO | 60,8 | 9,9 | 10 | 107 | 27 184 430 |
| R14-1A | 1,79E+06 | Control condition (without stress) after 60min at 37° | 2,9 | 9,7 | 10 | 109 | 21 530 597 |
| R14-1B | 1,52E+06 | 60 min incubation with 10µM of NO | 3,0 | 9,9 | 10 | 103 | 20 954 601 |
| R14-1C | 1,85E+06 | 60 min incubation with 50µM of NO | 44,5 | 10 | 10 | 95,2 | 22 312 588 |
| R16-To | 9,00E+05 | Initial condition: T = 0 of replicate n ° 16 | 0,2 | 10 | 10 | 110 | 21 238 399 |
| R16-15A | 1,50E+06 | Control condition (without stress) after 15min at 37° | 0,3 | 9,9 | 10 | 144 | 19 801 942 |
| R16-15B | 3,05E+06 | 15 min incubation with 10µM of NO | 8,5 | 9,9 | 10 | 111 | 20 500 137 |
| R16-15C | 1,98E+06 | 15 min incubation with 50µM of NO | 57,2 | 9,8 | 10 | 130 | 20 124 601 |
| R16-1A | 5,25E+06 | Control condition (without stress) after 60min at 37° | 0,1 | 9,3 | 10 | 139 | 19 657 553 |
| R16-1B | 5,25E+06 | 60 min incubation with 10µM of NO | 4,7 | 9,9 | 10 | 110 | 19 306 037 |
| R16-1C | 3,90E+06 | 60 min incubation with 50µM of NO | 33,7 | 9,4 | 10 | 146 | 19 275 840 |

**Annexe 3: List of genes influenced after 15 min of 10µM NO stress.**

"All effect code" reflect the activation (U) or inhibition (D) of gene transcription in every condition: 15min, 10µM and 50µM then 1 hour 10µM, 50µM compared to without NO.

| locus_tag | Start | End | gene | Effect (at 15min, 10µM vs 0µM) | qvalue | all effects code | product | protein_id |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| BTB_RS10830 | 2102904 | 2103611 | *ric* | 8,7301 | 0 | UU-U | iron-sulfur cluster repair di-iron protein | WP_000679632,1 |
| BTB_RS07355 | 1434746 | 1435954 | | 5,7842 | 0 | UU-U | NO-inducible flavohemoprotein | WP_000947339,1 |
| BTB_RS17205 | 3399147 | 3400433 | | 5,3262 | 0 | UU-- | hydroxylamine reductase | WP_002094103,1 |
| BTB_RS09885 | 1925663 | 1927387 | *cydC* | 4,2864 | 0 | UU-U | thiol reductant ABC exporter subunit CydC | WP_000073638,1 |
| BTB_RS10820 | 2099957 | 2100274 | *nirD* | 4,23 | 0,0088 | UU-- | nitrite reductase small subunit NirD | WP_000616683,1 |
| BTB_RS10810 | 2097767 | 2098477 | | 4,2279 | 0 | UU-- | sirohydrochlorin chelatase | WP_000676477,1 |
| BTB_RS09880 | 1923945 | 1925666 | *cydD* | 3,9212 | 0 | UU-U | thiol reductant ABC exporter subunit CydD | WP_000824029,1 |
| BTB_RS09875 | 1922929 | 1923945 | *cydB* | 3,6701 | 0 | UU-U | cytochrome d ubiquinol oxidase subunit II | WP_000950083,1 |
| BTB_RS04380 | 851653 | 851931 | | 3,5831 | 0,0075 | UU-- | hypothetical protein | WP_000900043,1 |
| BTB_RS10815 | 2098474 | 2099898 | *cobA* | 3,4912 | 0,0008 | UU-- | uroporphyrin-III C-methyltransferase | WP_001014975,1 |
| BTB_RS10805 | 2097301 | 2097774 | | 3,1919 | 0,0032 | UU-- | precorrin-2 dehydrogenase | WP_000282601,1 |
| BTB_RS18075 | 3592867 | 3594723 | *nrdD* | 3,1698 | 0,0003 | UU-- | anaerobic ribonucleoside triphosphate reductase | WP_000940080,1 |
| BTB_RS10825 | 2100290 | 2102695 | | 3,1545 | 0,0015 | UU-- | NADPH-nitrite reductase large subunit | WP_000746957,1 |
| BTB_RS09870 | 1921539 | 1922942 | | 3,0694 | 0 | UU-U | cytochrome ubiquinol oxidase subunit I | WP_000448869,1 |
| BTB_RS25855 | 5049165 | 5050859 | | 3,0186 | 0,0008 | UU-- | methyl-accepting chemotaxis protein | WP_000878450,1 |
| BTB_RS05820 | 1148439 | 1149104 | | 2,9268 | 0,0044 | U--- | S-layer homology domain-containing protein | WP_011109902,1 |
| BTB_RS26535 | 5187990 | 5189315 | | 2,8801 | 0,0095 | UU-U | 6-phospho-beta-glucosidase | WP_000145762,1 |
| BTB_RS04385 | 851921 | 853006 | | 2,8741 | 0,0002 | UU-- | DUF871 domain-containing protein | WP_000440050,1 |
| BTB_RS22185 | 4366170 | 4368773 | | 2,6752 | 0,0339 | UU-- | bifunctional acetaldehyde-CoA/alcohol dehydrogenase | WP_000260464,1 |
| BTB_RS04375 | 850367 | 851677 | | 2,6714 | 0,01 | UU-- | PTS sugar transporter subunit IIC | WP_001013042,1 |
| BTB_RS03680 | 731060 | 731458 | | 2,613 | 0,0136 | UU-- | DUF3221 domain-containing protein | WP_000494384,1 |
| BTB_RS18840 | 3740505 | 3742424 | | 2,6037 | 0,0098 | U--- | LTA synthase family protein | WP_000791042,1 |
| BTB_RS02515 | 498240 | 498971 | *pflA* | 2,5627 | 0,0089 | UU-- | pyruvate formate lyase-activating protein | WP_000238463,1 |
| BTB_RS23470 | 4624070 | 4624528 | | 2,5521 | 0,0259 | UU-- | universal stress protein | WP_001066673,1 |
| BTB_RS10425 | 2029474 | 2030121 | | 2,5263 | 0,008 | UU-- | CBS domain-containing protein | WP_001220528,1 |
| BTB_RS05410 | 1062076 | 1063758 | | 2,4369 | 0,0026 | UU-U | aerobic glycerol-3-phosphate dehydrogenase | WP_000672829,1 |
| BTB_RS26540 | 5189319 | 5189642 | | 2,3819 | 0,0295 | UU-- | PTS lactose/cellobiose transporter subunit IIA | WP_000989057,1 |
| BTB_RS02095 | 401194 | 401643 | *argR* | 2,3409 | 0,0162 | UU-- | arginine regulator | WP_000711826,1 |
| BTB_RS04370 | 849978 | 850283 | | 2,322 | 0,0163 | UU-- | PTS sugar transporter subunit IIB | WP_000275645,1 |
| BTB_RS21135 | 4181630 | 4182949 | | 2,3043 | 0,0158 | UU-- | 2-oxo acid dehydrogenase subunit E2 | WP_000257645,1 |
| BTB_RS14280 | 2824130 | 2825497 | | 2,2156 | 0,0056 | UU-- | chitin-binding protein | WP_001065156,1 |
| BTB_RS34095 | 5078483 | 5078575 | | 2,2088 | 0,0101 | U--U | hypothetical protein | WP_078994172,1 |
| BTB_RS05340 | 1049356 | 1050333 | | 2,2064 | 0,0077 | UU-- | ring-cleaving dioxygenase | WP_001072559,1 |
| BTB_RS04355 | 846440 | 847528 | | 2,193 | 0,0003 | UU-- | DUF871 domain-containing protein | WP_001253350,1 |
| BTB_RS04365 | 849656 | 849976 | | 2,1803 | 0,0236 | UU-- | PTS lactose/cellobiose transporter subunit IIA | WP_000774624,1 |
| BTB_RS09865 | 1919891 | 1920946 | | 2,0865 | 0,0197 | UU-- | LLM class flavin-dependent oxidoreductase | WP_000417549,1 |
| BTB_RS02510 | 495921 | 498170 | *pflB* | 2,0756 | 0,0072 | UU-- | formate C-acetyltransferase | WP_000195468,1 |
| BTB_RS26175 | 5116350 | 5117645 | | 2,073 | 0,0029 | UU-- | enolase | WP_000103951,1 |
| BTB_RS10485 | 2040295 | 2041263 | | 2,0441 | 0,0344 | UU-D | SPFH/Band 7/PHB domain protein | WP_000226257,1 |
| BTB_RS26195 | 5121314 | 5122318 | *gap* | 2,0255 | 0,0007 | UU-- | aldehyde dehydrogenase | WP_000161234,1 |
| BTB_RS21555 | 4248583 | 4249278 | | 2,0147 | 0,0154 | UU-- | transcriptional regulator | WP_000434124,1 |
| BTB_RS21150 | 4184991 | 4186412 | *lpdA* | 2,0122 | 0,0386 | UU-- | dihydrolipoyl dehydrogenase | WP_001051295,1 |
| BTB_RS11230 | 2188967 | 2189554 | | 1,9938 | 0,0039 | UU-- | SCO family protein | WP_000833332,1 |
| BTB_RS03420 | 691216 | 692268 | | 1,993 | 0,0087 | UU-- | (R,R)-butanediol dehydrogenase | WP_000645827,1 |
| BTB_RS21140 | 4182965 | 4183948 | | 1,9755 | 0,0282 | UU-- | 3-methyl-2-oxobutanoate dehydrogenase subunit beta | WP_000290071,1 |
| BTB_RS18820 | 3734300 | 3735289 | | 1,9648 | 0,0095 | UU-- | 1-phosphatidylinositol phosphodiesterase | WP_000066296,1 |
| BTB_RS11320 | 2204796 | 2205833 | | 1,94 | 0,0211 | UU-- | alcohol dehydrogenase AdhP | WP_000649129,1 |
| BTB_RS18070 | 3592418 | 3592870 | *nrdG* | 1,9298 | 0,0156 | UU-- | anaerobic ribonucleoside-triphosphate reductase activating protein | WP_000867078,1 |
| BTB_RS05225 | 1024524 | 1024964 | | 1,9227 | 0,0087 | UU-- | bacterioferritin | WP_000017752,1 |
| BTB_RS08240 | 1609064 | 1609897 | | 1,9096 | 0,0491 | UU-D | flagellar motor protein MotP | WP_000504188,1 |
| BTB_RS21155 | 4186417 | 4187520 | | 1,9005 | 0,0485 | UU-D | butyrate kinase | WP_000115781,1 |
| BTB_RS14995 | 2947186 | 2947833 | | 1,893 | 0,0487 | UU-- | DJ-1/PfpI family protein | WP_000407026,1 |
| BTB_RS23670 | 4660527 | 4661171 | | 1,8841 | 0,0078 | UU--- | CBS domain-containing protein | WP_000634583,1 |
| BTB_RS26180 | 5117676 | 5119205 | | 1,882 | 0,0076 | UU-- | 2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase | WP_001231158,1 |
| BTB_RS33630 | 3643789 | 3643938 | | 1,881 | 0,0289 | UU-- | hypothetical protein | WP_002152557,1 |
| BTB_RS02770 | 535206 | 535856 | | 1,8806 | 0,0002 | UU-- | DsbA family protein | WP_000841308,1 |
| BTB_RS11170 | 2176905 | 2178362 | | 1,8684 | 0,0381 | UU-U | serine hydrolase | WP_000034317,1 |
| BTB_RS21145 | 4183962 | 4184963 | | 1,8678 | 0,0461 | UU-- | 3-methyl-2-oxobutanoate dehydrogenase subunit alpha | WP_000852551,1 |
| BTB_RS26135 | 5107957 | 5108724 | | 1,8587 | 0,0366 | UU-- | N-acetyltransferase | WP_000632238,1 |
| BTB_RS23675 | 4661168 | 4662334 | | 1,8572 | 0,0328 | UU-- | acetoin utilization protein AcuC | WP_000092829,1 |
| BTB_RS03095 | 618068 | 619687 | | 1,8533 | 0,0309 | UU-- | L-lactate permease | WP_000109099,1 |
| BTB_RS18345 | 3643065 | 3643772 | | 1,8525 | 0 | UU-U | cytochrome c biogenesis protein CcdA | WP_001152676,1 |
| BTB_RS07195 | 1403404 | 1404375 | | 1,8433 | 0,0359 | UU-- | 2-hydroxyacid dehydrogenase | WP_001062841,1 |
| BTB_RS26185 | 5119202 | 5119957 | | 1,8429 | 0,0127 | UU-- | triose-phosphate isomerase | WP_001231038,1 |
| BTB_RS25665 | 5012914 | 5013864 | | 1,8354 | 0,0328 | UU-- | L-lactate dehydrogenase | WP_000820660,1 |
| BTB_RS03825 | 760551 | 760862 | *qoxD* | 1,7956 | 0,0009 | UU-- | cytochrome aa3 quinol oxidase subunit IV | WP_000068425,1 |
| BTB_RS04360 | 847605 | 849545 | | 1,7384 | 0,0009 | UU-- | transcription antiterminator | WP_000169804,1 |
| BTB_RS26130 | 5106784 | 5107461 | | 1,7376 | 0,0137 | UU-- | response regulator transcription factor | WP_000815803,1 |
| BTB_RS09940 | 1937282 | 1937881 | | 1,7357 | 0,0426 | UU-- | nitroreductase family protein | WP_001029924,1 |

| | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| BTB_RS05335 | 1048356 | 1049300 | | 1,7261 | 0,046 | UU-- | ring-cleaving dioxygenase | WP_000272975,1 |
| BTB_RS32215 | 4686 | 5030 | | 1,6936 | 0,0352 | UU-D | DUF3139 domain-containing protein | WP_000968001,1 |
| BTB_RS01255 | 222548 | 222667 | | 1,688 | 0,0234 | UU-- | DUF3948 family protein | WP_003269239,1 |
| BTB_RS02310 | 453260 | 455926 | | 1,6684 | 0,0483 | UU-- | cation-translocating P-type ATPase | WP_000073697,1 |
| BTB_RS08185 | 1601714 | 1602253 | | 1,6606 | 0,0085 | UU-- | sigma-70 family RNA polymerase sigma factor | WP_000575582,1 |
| BTB_RS32210 | 3827 | 4639 | | 1,6409 | 0,0276 | UU-- | hypothetical protein | WP_000734781,1 |
| BTB_RS26190 | 5119990 | 5121174 | *pgk* | 1,6245 | 0,0374 | UU-- | phosphoglycerate kinase | WP_001036331,1 |
| BTB_RS03830 | 760863 | 761465 | *qoxC* | 1,6152 | 0,0032 | UU-- | cytochrome aa3 quinol oxidase subunit III | WP_000729314,1 |
| BTB_RS23465 | 4623131 | 4623922 | *fabG* | 1,6106 | 0,0167 | UU-- | SDR family oxidoreductase | WP_002024902,1 |
| BTB_RS06615 | 1303659 | 1305071 | *glcD* | 1,5991 | 0,0157 | UU-- | glycolate oxidase subunit GlcD | WP_000890756,1 |
| BTB_RS11120 | 2169335 | 2169775 | | 1,5879 | 0,0066 | UU-D | GNAT family N-acetyltransferase | WP_001223866,1 |
| BTB_RS26650 | 5212876 | 5214537 | | 1,5765 | 0,0289 | UU-- | L-lactate permease | WP_001099343,1 |
| BTB_RS18380 | 3649868 | 3650770 | | 1,567 | 0,0216 | UU-- | LysR family transcriptional regulator | WP_000423235,1 |
| BTB_RS03015 | 597923 | 599056 | *ald* | 1,5549 | 0,0383 | UU-- | alanine dehydrogenase | WP_001219741,1 |
| BTB_RS03020 | 599160 | 600575 | | 1,5415 | 0,0334 | UU-- | amino acid permease | WP_001284897,1 |
| BTB_RS05625 | 1106047 | 1107468 | | 1,5182 | 0,0302 | UU-- | protoporphyrinogen oxidase | WP_001228113,1 |
| BTB_RS04285 | 833443 | 835107 | *cdr* | 1,507 | 0,0483 | UU-- | CoA-disulfide reductase | WP_000087589,1 |
| BTB_RS25975 | 5074011 | 5078432 | | 1,5049 | 0,0118 | UU-- | wall-associated protein precursor | WP_000038391,1 |
| BTB_RS04160 | 812092 | 812946 | | 1,4972 | 0,0246 | UU-D | patatin family protein | WP_000892676,1 |
| BTB_RS11600 | 2261170 | 2261369 | | 1,4949 | 0,0376 | UU-- | hypothetical protein | |
| BTB_RS03835 | 761479 | 763422 | *qoxB* | 1,4753 | 0,0031 | UU-- | cytochrome aa3 quinol oxidase subunit I | WP_003269518,1 |
| BTB_RS04525 | 876775 | 878139 | | 1,4208 | 0,0428 | UU-- | permease | WP_000711293,1 |
| BTB_RS08190 | 1602246 | 1602866 | | 1,4092 | 0,0143 | UU-- | flagellar motor switch protein FliG | WP_078994751,1 |
| BTB_RS11965 | 2340828 | 2342219 | | 1,36 | 0,0165 | UU-- | protoporphyrinogen oxidase | WP_000860354,1 |
| BTB_RS17195 | 3397922 | 3398263 | | 1,347 | 0,0428 | UU-- | DUF1048 domain-containing protein | WP_000891986,1 |
| BTB_RS01250 | 222397 | 222513 | | 1,334 | 0,0481 | UU-- | DUF3948 family protein | WP_000654250,1 |
| BTB_RS25875 | 5055059 | 5055757 | | 1,3248 | 0,0225 | UU-- | pirin family protein | WP_000488929,1 |
| BTB_RS22635 | 4460551 | 4461480 | | 1,3209 | 0,0352 | UU-- | hydroxymethylbilane synthase | WP_001226397,1 |
| BTB_RS04590 | 886427 | 887629 | | 1,249 | 0,0472 | UU-D | tetracycline resistance MFS efflux pump | WP_000742960,1 |
| BTB_RS01960 | 372643 | 374169 | | 1,2352 | 0,0204 | UU-- | alkyl hydroperoxide reductase subunit F | WP_000599497,1 |
| BTB_RS26435 | 5164106 | 5164429 | | 1,2069 | 0,0054 | UU-- | cytochrome c-551 | WP_000727975,1 |
| BTB_RS18000 | 3576893 | 3577930 | | 1,1993 | 0,0409 | UU-- | LytR family transcriptional regulator | WP_000427598,1 |
| BTB_RS22645 | 4462347 | 4463681 | | 1,1972 | 0,0286 | UU-- | glutamyl-tRNA reductase | WP_000547870,1 |
| BTB_RS23665 | 4659877 | 4660509 | | 1,184 | 0,0487 | UU-- | acetoin utilization protein acetyltransferase AcuA | WP_000581393,1 |
| BTB_RS08310 | 1623295 | 1623663 | | 1,1296 | 0,0263 | UU-- | flagellar biosynthesis protein FliS | WP_001149516,1 |
| BTB_RS22630 | 4459796 | 4460548 | | 1,0259 | 0,0138 | UU-u | uroporphyrinogen-III synthase | WP_000992351,1 |
| BTB_RS08315 | 1623647 | 1623925 | | 0,9972 | 0,033 | uU-- | flagellar biosynthesis protein FlgG | WP_074554103,1 |
| BTB_RS16655 | 3288832 | 3289851 | | 0,952 | 0,0348 | u--- | tyrosine-protein phosphatase | WP_000437806,1 |
| BTB_RS08385 | 1634818 | 1635726 | | 0,908 | 0,039 | uU-- | chemotaxis signal transduction protein CheV | WP_000075943,1 |
| BTB_RS24905 | 4880922 | 4882112 | | 0,873 | 0,019 | uu-- | aminotransferase | WP_000808531,1 |
| BTB_RS10125 | 1975377 | 1976819 | | -0,8483 | 0,0469 | dD-- | PLP-dependent aminotransferase family protein | WP_000439423.1 |
| BTB_RS11195 | 2183152 | 2183871 | | -1,0024 | 0,0122 | DD-D | 1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase | WP_000616582.1 |
| BTB_RS00635 | 121371 | 121793 | | -1,0484 | 0,0315 | DD-- | 30S ribosomal protein S12 | WP_001142341.1 |
| BTB_RS06810 | 1342164 | 1342610 | | -1,1618 | 0,0105 | DD-- | MarR family transcriptional regulator | WP_000203336.1 |
| BTB_RS06835 | 1346920 | 1347582 | | -1,1885 | 0,0162 | DD-U | 7-cyano-7-deazaguanine synthase QueC | WP_000711595.1 |
| BTB_RS24210 | 4759529 | 4759852 | | -1,2019 | 0,0338 | DD-d | iron-sulfur cluster biosynthesis family protein | WP_000289570.1 |
| BTB_RS13815 | 2733031 | 2733411 | | -1,2984 | 0,0141 | DD-- | nucleotide excision repair endonuclease | WP_001048947.1 |
| BTB_RS00820 | 143574 | 144317 | | -1,3273 | 0,0371 | DD-- | tRNA pseudouridine(38-40) synthase TruA | WP_015055073.1 |
| BTB_RS00615 | 112821 | 113420 | | -1,3536 | 0,0308 | DD-- | class I SAM-dependent methyltransferase | WP_000763269.1 |
| BTB_RS20705 | 4103724 | 4104797 | | -1,3738 | 0,038 | DD-- | ABC transporter permease | WP_074618732.1 |
| BTB_RS07040 | 1377055 | 1377846 | | -1,4064 | 0,0096 | DD-D | bacitracin resistance undecaprenyl-diphosphatase | WP_000796253.1 |
| BTB_RS06410 | 1262883 | 1263293 | | -1,4221 | 0,0126 | DD-d | DUF3908 domain-containing protein | WP_000996808.1 |
| BTB_RS27390 | 5374183 | 5375220 | | -1,4888 | 0,0014 | DD-D | transcriptional regulator | WP_000996313.1 |
| BTB_RS17935 | 3559280 | 3560614 | | -1,5549 | 0,0092 | DD-D | amino acid permease | WP_078400513.1 |
| BTB_RS26580 | 5195686 | 5196903 | | -1,8217 | 0,029 | DD-D | dicarboxylate/amino acid:cation symporter | WP_000649376.1 |
| BTB_RS03775 | 748968 | 750269 | | -1,9306 | 0,0002 | DD-D | branched-chain amino acid transport system II carrier protein | WP_000771703.1 |
| BTB_RS05575 | 1089279 | 1095841 | | -2,011 | 0,0493 | DD-U | adhesin | |
| BTB_RS10715 | 2075927 | 2076136 | | -2,0689 | 0,0253 | DD-- | DUF3925 domain-containing protein | WP_000844984.1 |
| BTB_RS17755 | 3519702 | 3520322 | | -2,075 | 0,0076 | DD-- | transcriptional regulator | WP_000070938.1 |
| BTB_RS33410 | 2999506 | 2999712 | | -2,7749 | 0,0406 | DD-- | hypothetical protein | |

**Annexe 4 : Protocole chapitre 2**

Confidentiel

**Annexe 5 : Protocole chapitre 2**

Confidentiel

**Annexe 6 : Descriptif de la stratégie de mutagénèse du gène *ric* chez *B. cereus***

Afin d'étudier le rôle de notre gène cible *ric* chez *B. cereus*, nous avons tenté de créer un mutant de Bc407 qui ne l'exprime pas. Deux stratégies ont été utilisées.

La première consistait à remplacer le gène cible par une cassette de résistance à la tétracycline grâce à l'insertion du plasmide thermosensible pMAD puis son excision, suivant le protocole de Arnaud *et al*[191].

Le plasmide utilisé pour la mutagénèse est composé du plasmide pMAD avec un insert de 2Kb constitué de la cassette de résistance à la tétracycline (1kb) flanquée de part et d'autre de la région en amont (0,5kb) et en aval du gène *ric* (0,5kb) (Figure Annexe). Cet insert a été synthétisé et introduit dans le plasmide par l'entreprise GeneCust. Deux souches successives d'*E. coli* ont été transformées par choc thermique avec le plasmide néosynthétisé. La souche TG1 a servi à l'amplification du plasmide et la souche ET12567 à la déméthylation pour augmenter l'efficacité de la transformation chez *B. cereus*. Après son extraction et purification, le plasmide est utilisé pour transformer des souches Bc 407 électrocompétentes. Des transformants ont été obtenus après 2 jours à 30 ° C sur des boites de LB agar contenant 10µg de tétracycline / ml, 3 µg d'érythromycine / ml et 50 µg de X- Gal / ml. Un pool de clones bleus individuels a été utilisé pour inoculer une culture de milieu LB sans antibiotique incubée à 40 ° C jusqu'à la phase stationnaire. Deux cycles de croissance supplémentaires ont été effectués en diluant la culture ayant atteint la phase stationnaire dans du milieu frais jusqu'à atteindre à nouveau la phase stationnaire. Enfin, des dilutions de la culture d'une nuit ont été étalée sur des boites LB agar contenant X-Gal et 10µg de tétracycline / ml et aucune colonie blanche n'a pu être isolée. Ce sont les colonies qui auraient intégrées puis excisées le plasmide. Chaque étape a été reproduite au moins une fois et par au moins deux manipulateurs différents sans succès.

Un autre protocole a été entrepris par la suite. Cette deuxième stratégie vise à intégrer un vecteur entier en amont des gènes d'intérêt pour stopper leur transcription en suivant les étapes suivantes.

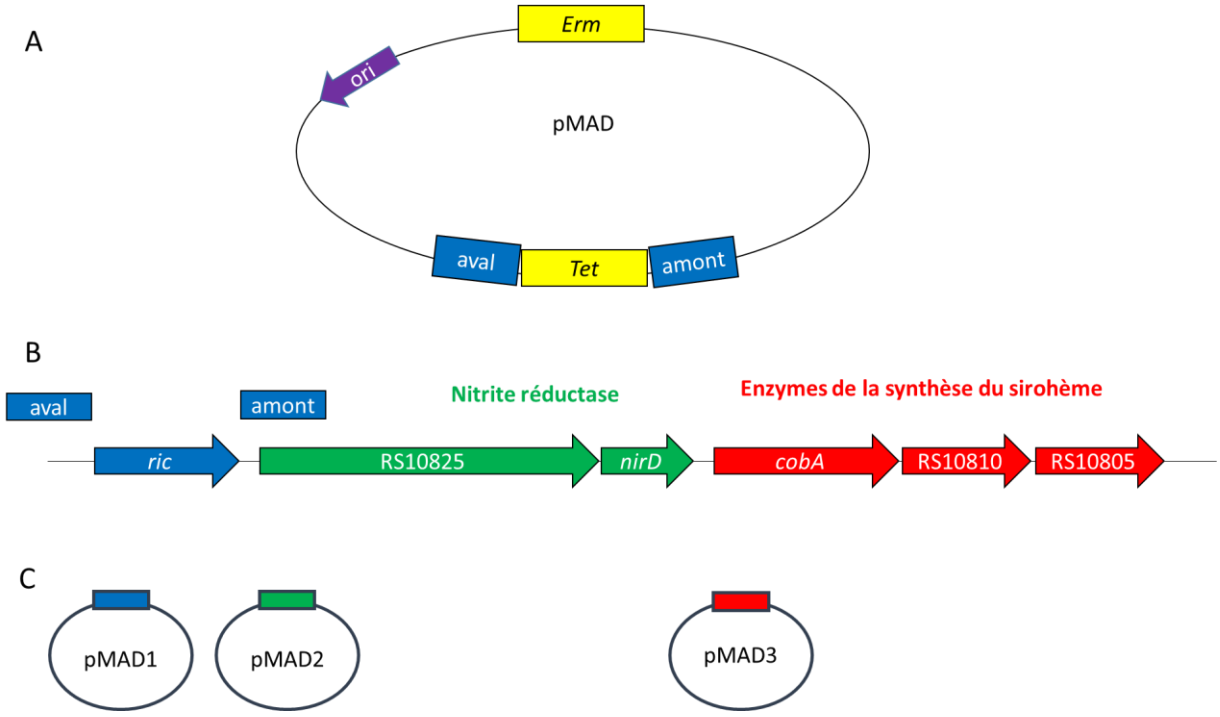



**Figure annexe : Schéma descriptif des deux stratégies de mutagénèse employées.**
(A) Schéma du plasmide utilisé pour la création d'un mutant Bc407 Δ*ric*. Plasmide pMAD contenant un insert avec les parties amont et aval du gène *ric* en bleues et les cassettes des résistances à la tétracycline et à l'érythromycine en jaune (B) Représentation schématique des 6 gènes de la région d'intérêt commençant par *ric* (C) Plasmides utilisés lors de la deuxième stratégie de clonage, l'insertion simple. Les inserts correspondent aux 500 premières paires de bases des gènes *ric* (bleu), RS10825 en vert et *cobA* en rouge.

1) Design des oligonucléotides pour amplifier par PCR les 500 premières paires de bases de chaque gène
2) Synthèse des fragments par PCR
3) Digestion du plasmide pMAD et des fragments PCR (EcoR1 et BamH1, protocole cutsmart NEB)
4) Purification des inserts et du plasmide (kit NEB monarch)
5) Ligature des inserts dans le pMAD (T4 ligase (NEB) : 50ng de plasmide ration 3:1)
6) Transformation de *E .coli* 10beta par choc thermique (protocole NEB)
7) Vérification par PCR de l'insertion
8) Extraction pMAD (par miniprep, kit NEB monarch)
9) Transformation *E. coli* ET par choc thermique (méthylation du plasmide) (protocole de thermocompétence au $CaCl_2$)

10) Extraction du plasmide et vérification par séquençage
11) Transformation *B. cere*us par éléctroporation
12) Sélection clones qui ont inséré le plasmide et vérification par PCR puis par séquençage

Les 11 premières étapes ont été réalisées avec succès. Cependant aucun clone n'a pu être isolé. Par manque de temps, les dernières étapes n'ont pas pu être reproduites.

Pour expliquer ces échecs, nous avons plusieurs hypothèses. Tout d'abord, le plasmide synthétisé dans la première stratégie est très gros (12kb) et donc difficile à manipuler. Une stratégie sans cassette de résistance à la tétracycline a été envisagée et permettrait de créer un mutant propre avec uniquement une délétion du gène cible.

D'autre part, il est possible que le gène *ric* soit essentiel à la survie de *B. cereus*. Dans ce cas une stratégie avec un vecteur d'expression inductible (à l'IPTG par exemple) peut être envisagée.

Une autre option est d'utiliser une méthode de transformation de Bc407 par conjugaison. Cette méthode est actuellement en cour d'essai, pour cela de nouveaux plasmides permettant l'interruption des gènes précités ont été synthétisés par la société GeneCust. Il s'agit du pAT113 contenant les 500 premières paires de bases de chaque gène, selon la méthode décrit par Trieu-Cuot *et al*, 1987.

# Bibliographie


1 Darrigo C., Guillemet E, Dervyn R, Ramarao N, The bacterial DNA repair protein Mfd confers resistance to the host nitrogen immune response. *Scientific reports* 6, 29349, (2016).

2 Sennequier N, Goff SVL, Biosynthèse du monoxyde d'azote (NO) : mécanisme, régulation et contrôle. *médecine/science* 14, 1185-1195, (1998).

3 Benjamin N, O'Driscoll F, Dougall H, Duncan C, Smith L, Golden M, McKenzie H, Stomach NO synthesis. *Nature* 368, 502, (1994).

4 Chaplin H, Jr. Review: the burgeoning history of the complement system 1888-2005. *Immunohematology* 21, 85-93, (2005).

5 Murphy K, Travers P, Walport M, Janeway C. *Janeway's immunobiology*. 7th edn, (Garland Science, 2008).

6 Pacher P, Beckman J. S, Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiological reviews* 87, 315-424, (2007).

7 Porrini C, Ramarao N, Tran S. L. Dr. NO and Mr. Toxic - the versatile role of nitric oxide. *Biological Chemistry*, (2020).

8 Gold V. *International Union of Pure and Applied Chemistry-Gold Book*. (1997).

9 Arnold W. P, Mittal C. K, Katsuki S, Murad F. Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3':5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74, 3203-3207, (1977).

10 Forrester M. T, Foster M. W. Protection from nitrosative stress: a central role for microbial flavohemoglobin. *Free radical biology, medicine* 52, 1620-1633, (2012).

11 Sarti P. *et al*. Nitric oxide and cytochrome c oxidase: mechanisms of inhibition and NO degradation. *Biochemical and biophysical research communications* 274, 183-187, (2000).

12 Carter C. W, Jr, Freer S. T, Xuong N. H, Alden R. A, Kraut J. Structure of the iron-sulfur cluster in the Chromatius iron protein at 2.25 Angstrom resolution. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 36, 381-385, (1972).

13 Lu Y. Assembly and Transfer of Iron-Sulfur Clusters in the Plastid. *Frontiers in Plant Science* 9, 336, (2018).

14 Fitzpatrick J, Kim E. Synthetic modeling chemistry of iron-sulfur clusters in nitric oxide signaling. *Accounts of chemical research* 48, 2453-2461, (2015).

15 Butler A. R, Megson I. L. Non-heme iron nitrosyls in biology. *Chemical reviews* 102, 1155-1166, (2002).

16 Johnson D. C, Dean D. R, Smith A. D, Johnson M. K. Structure, function, and formation of biological iron-sulfur clusters. *Annual review of biochemistry* 74, 247-281, (2005).

17 McLean S, Bowman L. A, Sanguinetti G, Read R. C, Poole R. K. Peroxynitrite toxicity in *Escherichia coli* K12 elicits expression of oxidative stress responses and protein nitration and nitrosylation. *The Journal of biological chemistry* 285, 20724-20731, (2010).

18 Silva M. P, Cedraz-Mercez P. L, Varanda W. A. Effects of nitric oxide on magnocellular neurons of the supraoptic nucleus involve multiple mechanisms. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas* 47, 90-100,(2014).

19 Stamler J. S, Lamas S, Fang F. C. Nitrosylation. the prototypic redox-based signaling mechanism. *Cell* 106, 675-683, (2001).

20 Wink D. A. *et al*. DNA deaminating ability and genotoxicity of nitric oxide and its progenitors. *Science* 254, 1001-1003, (1991).

21 Hrabarova E, Juranek I, Soltes L. Pro-oxidative effect of peroxynitrite regarding biological systems: a special focus on high-molar-mass hyaluronan degradation. *General Physiology and Biophysics* 30, 223-238, (2011).

22 Vincent S. R. Nitric oxide neurons and neurotransmission. *Progress in neurobiology* 90 246-255, (2010).

23 Riddell D. R, Owen J. S. Nitric oxide and platelet aggregation. 57, 25-48, (1997).

24 Finer N. N, Barrington K. J. Nitric oxide for respiratory failure in infants born at or near term. *The Cochrane database of systematic reviews*, CD000399, (2006).

25 https://www.vidal.fr/.

26 Bond G. S. Effect of Various Agents on the Blood Flow through the Coronary Arteries and Veins. *The Journal of experimental medicine* 12, 575-585, (1910).

27 Knowles R. Denitrification. *Microbiology Rev* 46, 43-70, (1982).

28 Alam M. S. *et al.* Role of nitric oxide in host defense in murine salmonellosis as a function of its antibacterial and antiapoptotic activities. *Infection and immunity* 70, 3130-3142, (2002).

29 Canthaboo C, Xing D, Wei X. Q, Corbel M. J. Investigation of role of nitric oxide in protection from *Bordetella pertussis* respiratory challenge. *Infection and immunity* 70, 679-684, (2002).

30 Umezawa K. *et al.* Induction of nitric oxide synthesis and xanthine oxidase and their roles in the antimicrobial mechanism against *Salmonella typhimurium* infection in mice. *Infection and immunity* 65, 2932-2940, (1997).

31 Poole R. K, Hughes, M. N. New functions for the ancient globin family: bacterial responses to nitric oxide and nitrosative stress. *Molecular microbiology* 36 775-783, (2000).

32 Filenko, N. *et al.* The NsrR regulon of *Escherichia coli* K-12 includes genes encoding the hybrid cluster protein and the periplasmic, respiratory nitrite reductase. *Journal of bacteriology* 189, 4410-4417, (2007).

33 Rodionov D. A, Dubchak I. L, Arkin A. P, Alm E. J, Gelfand M. S. Dissimilatory metabolism of nitrogen oxides in bacteria: comparative reconstruction of transcriptional networks. *PLoS computational biology* 1, e55, (2005).

34 Unden G, Schirawski J. The oxygen-responsive transcriptional regulator FNR of *Escherichia coli*: the search for signals and reactions. *Molecular microbiology* 25, 205-210, (1997).

35 Constantinidou C. *et al.* A reassessment of the FNR regulon and transcriptomic analysis of the effects of nitrate, nitrite, NarXL, and NarQP as *Escherichia coli* K12 adapts from aerobic to anaerobic growth. *The Journal of biological chemistry* 281, 4802-4815, (2006).

36 Hecker M, Pane-Farre J, Volker U. SigB-dependent general stress response in *Bacillus subtilis* and related gram-positive bacteria. *Annual review of microbiology* 61, 215-236, (2007).

37 Mitchell J. G, Kogure K. Bacterial motility: links to the environment and a driving force for microbial physics. *FEMS microbiology ecology* 55, 3-16, (2006).

38 Gardner A. M, Gardner P. R. Flavohemoglobin detoxifies nitric oxide in aerobic, but not anaerobic, *Escherichia coli*. Evidence for a novel inducible anaerobic nitric oxide-scavenging activity. *The Journal of biological chemistry* 277, 8166-8171, (2002).

39 Poock S. R, Leach E. R, Moir J. W, Cole J. A, Richardson D. J. Respiratory detoxification of nitric oxide by the cytochrome c nitrite reductase of *Escherichia coli*. *The Journal of biological chemistry* 277, 23664-23669, (2002).

40 Heylen K. *et al.* Nitric oxide reductase (norB) gene sequence analysis reveals discrepancies with nitrite reductase (nir) gene phylogeny in cultivated denitrifiers. *Environmental microbiology* 9, 1072-1077, (2007).

41 Stevanin T. M, Poole, R. K, Demoncheaux E. A, Read R. C. Flavohemoglobin Hmp protects *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* from nitric oxide-related killing by human macrophages. *Infection and immunity* 70, 4399-4405, (2002).

42 Justino M. C, Almeida C. C, Goncalves V. L, Teixeira M, Saraiva L. M. *Escherichia coli* YtfE is a di-iron protein with an important function in assembly of iron-sulphur clusters. *FEMS microbiology letters* 257, 278-284, (2006).

43 Overton, T. W. *et al.* Widespread distribution in pathogenic bacteria of di-iron proteins that repair oxidative and nitrosative damage to iron-sulfur centers. *Journal of bacteriology* 190, 2004-2013, (2008).

44 Wang H, Gunsalus R. P. The nrfA and nirB nitrite reductase operons in *Escherichia coli* are expressed differently in response to nitrate than to nitrite. *Journal of bacteriology* 182, 5813-5822, (2000).

45 Dong M. *et al.* Development of enzymatic probes of oxidative and nitrosative DNA damage caused by reactive nitrogen species. *Mutation research* 594, 120-134, (2006).

46 Lindahl T. An N-glycosidase from *Escherichia coli* that releases free uracil from DNA containing deaminated cytosine residues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 71, 3649-3653, (1974).

47 Demple, B, Johnson A, Fung D. Exonuclease III and endonuclease IV remove 3' blocks from DNA synthesis primers in H2O2-damaged *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83, 7731-7735, (1986).

48 Spek E. J. *et al.* Recombinational repair is critical for survival of *Escherichia coli* exposed to nitric oxide. *Journal of bacteriology* 183, 131-138, (2001).

49 Selby C. P, Sancar A. Molecular mechanism of transcription-repair coupling. *Science* 260, 53-58, (1993).

50 Selby C. P. Mfd Protein and Transcription-Repair Coupling in *Escherichia coli*. *Photochemitry and Photobiology* 93, 280-295, (2017).

51 Selby C. P, Sancar, A. Structure and function of transcription-repair coupling factor. I. Structural domains and binding properties. *The Journal of biological chemistry* 270, 4882-4889, (1995).

52 Kamarthapu V. *et al.* ppGpp couples transcription to DNA repair in E. coli. *Science* 352, 993-996, (2016).

53 Han J, Sahin O, Barton Y. W, Zhang Q. Key role of Mfd in the development of fluoroquinolone resistance in *Campylobacter jejuni*. *PLoS pathogens* 4, e1000083, (2008).

54 Lee G. H. *et al.* The *Helicobacter pylori* Mfd protein is important for antibiotic resistance and DNA repair. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 65, 454-456, (2009).

55 Pani B, Nudler E. Mechanistic insights into transcription coupled DNA repair. *DNA Repair (Amst)* 56, 42-50, (2017).

56 Million-Weaver S. *et al.* An underlying mechanism for the increased mutagenesis of lagging-strand genes in *Bacillus subtilis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112, E1096-1105, (2015).

57 Ragheb M. N. *et al.* Inhibiting the Evolution of Antibiotic Resistance. *Molecular cell* 73, 157-165 e155, (2019).

58 Chakravortty D, Hansen-Wester, I, Hensel, M. *Salmonella* pathogenicity island 2 mediates protection of intracellular *Salmonella* from reactive nitrogen intermediates. *The Journal of experimental medicine* 195, 1155-1166, (2002).

59 Kinkel T. L, Roux C. M, Dunman P. M, Fang, F. C. The *Staphylococcus aureus* SrrAB two-component system promotes resistance to nitrosative stress and hypoxia. *mBio* 4, e00696-00613, (2013).

60 Guinebretiere M. H. *et al. Bacillus cytotoxicus* sp. nov. is a novel thermotolerant species of the *Bacillus cereus* Group occasionally associated with food poisoning. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 63, 31-40, (2013).

61 Stenfors L. P, Granum P. E. Psychrotolerant species from the *Bacillus cereus* group are not necessarily *Bacillus weihenstephanensis*. *FEMS microbiology letters* 197, 223-228, (2001).

62 Kutima P. M, Foegeding P. M. Involvement of the spore coat in germination of *Bacillus cereus* T spores. *Applied and Environmental Microbiology* 53, 47-52, (1987).

63 Agata N. *et al.* A novel dodecadepsipeptide, cereulide, isolated from *Bacillus cereus* causes vacuole formation in HEp-2 cells. *FEMS microbiology letters* 121, 31-34, (1994).

64 Shinagawa K, Ueno, Y, Hu D, Ueda S, Sugii S. Mouse lethal activity of a HEp-2 vacuolation factor, cereulide, produced by *Bacillus cereus* isolated from vomiting-type food poisoning. *The Journal of Veterinary Medical Science* 58, 1027-1029, (1996).

65 Agata N, Ohta M, Mori M, Isobe M. A novel dodecadepsipeptide, cereulide, is an emetic toxin of *Bacillus cereus*. *FEMS microbiology letters* 129, 17-20, (1995).

66 Virtanen S. M. *et al.* In vitro toxicity of cereulide on porcine pancreatic Langerhans islets. *Toxicon* 51, 1029-1037, (2008).

67 Yokoyama K. *et al*. Pathological effect of synthetic cereulide, an emetic toxin of *Bacillus cereus*, is reversible in mice. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 24, 115-120, (1999).

68 Paananen A. *et al*. Inhibition of human natural killer cell activity by cereulide, an emetic toxin from *Bacillus cereus*. *Clinical & Experimental Immunology* 129, 420-428, (2002).

69 Ryan P. A, Macmillan J. D, Zilinskas B. A. Molecular cloning and characterization of the genes encoding the L1 and L2 components of hemolysin BL from *Bacillus cereus*. *Journal of bacteriology* 179, 2551-2556, (1997).

70 Granum, P. E, O'Sullivan K, Lund T. The sequence of the non-haemolytic enterotoxin operon from *Bacillus cereus*. *FEMS microbiology letters* 177, 225-229, (1999).

71 Granum P. E, Lund T. *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS microbiology letters* 157, 223-228, (1997).

72 Beecher D. J, MacMillan J. D. A novel bicomponent hemolysin from *Bacillus cereus*. *Infection and immunity* 58, 2220-2227, (1990).

73 Fagerlund A, Ween O, Lund T, Hardy S. P, Granum P. E. Genetic and functional analysis of the *cytK* family of genes in *Bacillus cereus*. *Microbiology* 150, 2689-2697, (2004).

74 Tran S. L, Ramarao N. *Bacillus cereus* immune escape: a journey within macrophages. *FEMS microbiology letters* 347, 1-6, (2013).

75 Gilmore M. S, Cruz-Rodz A. L, Leimeister-Wachter M, Kreft J, Goebel W. A *Bacillus cereus* cytolytic determinant, cereolysin AB, which comprises the phospholipase C and sphingomyelinase genes: nucleotide sequence and genetic linkage. *Journal of bacteriology* 171, 744-753, (1989).

76 Zenewicz L. A, Wei Z, Goldfine H, Shen H. Phosphatidylinositol-specific phospholipase C of *Bacillus anthracis* down-modulates the immune response. *Journal of Immunology* 174, 8011-8016, (2005).

77 Miyoshi S, Shinoda, S. Microbial metalloproteases and pathogenesis. *Microbes Infect* 2, 91-98, (2000).

78 Ramarao N, Lereclus D. The InhA1 metalloprotease allows spores of the *B. cereus* group to escape macrophages. *Cellular Microbiology* 7, 1357-1364 (2005).

79 Agaisse H, Gominet M, Okstad O. A, Kolsto A. B, Lereclus D. PlcR is a pleiotropic regulator of extracellular virulence factor gene expression in *Bacillus thuringiensis*. *Molecular microbiology* 32, 1043-1053, (1999).

80 Rocha-Estrada J, Aceves-Diez A. E, Guarneros G, de la Torre M. The RNPP family of quorum-sensing proteins in Gram-positive bacteria. *Applied Microbiology Biotechnology* 87, 913-923, (2010).

81 Perchat S. *et al*. A cell-cell communication system regulates protease production during sporulation in bacteria of the *Bacillus cereus* group. *Molecular microbiology* 82, 619-633, (2011).

82 Galperin M. Y. *et al*. Genomic determinants of sporulation in *Bacilli* and *Clostridia*: towards the minimal set of sporulation-specific genes. *Environmental microbiology* 14, 2870-2890, (2012).

83 Fawcett P, Eichenberger P, Losick R, Youngman P. The transcriptional profile of early to middle sporulation in *Bacillus subtilis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 8063-8068, (2000).

84 Lucking, G, Dommel M. K, Scherer S, Fouet A, Ehling-Schulz M. Cereulide synthesis in emetic *Bacillus cereus* is controlled by the transition state regulator AbrB, but not by the virulence regulator PlcR. *Microbiology* 155, 922-931 (2009).

85 Hantke, K. Bacterial zinc transporters and regulators. *Biometals* 14, 239-249, (2001).

86 Ceuppens, S. *et al*. Regulation of toxin production by *Bacillus cereus* and its food safety implications. *Critical Reviews in Microbiology* 37, 188-213, (2011).

87 Helgason, E, Caugant, D. A, Olsen, I, Kolsto, A. B. Genetic structure of population of *Bacillus cereus* and *B. thuringiensis* isolates associated with periodontitis and other human infections. *Journal of Clinical Microbiology* 38, 1615-1622, (2000).

88 Lacey, L. A. *et al*. Insect pathogens as biological control agents: Back to the future. *Journal of Invertebrate Pathology* 132, 1-41, (2015).

89 Dixon, T. C, Meselson, M, Guillemin, J, Hanna, P. C. Anthrax. The New England Journal of Medicine 341, 815-826, (1999).

90 Hemady, R, Zaltas, M, Paton, B, Foster, C. S, Baker, A. S. *Bacillus*-induced endophthalmitis: new series of 10 cases and review of the literature. *British Journal of Ophthalmology* 74, 26-29, (1990).

91 Kawatani, E. *et al*. *Bacillus cereus* sepsis and subarachnoid hemorrhage following consolidation chemotherapy for acute myelogenous leukemia. *Rinsho Ketsueki* 50, 300-303, (2009).

92 Craig, C. P, Lee, W. S, Ho, M. Letter: *Bacillus cereus* endocarditis in an addict. *Annals of Internal Medicine* 80, 418-419, (1974).

93 Lebessi, E, Dellagrammaticas, H. D, Antonaki, G, Foustoukou, M, Iacovidou, N. *Bacillus cereus* meningitis in a term neonate. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine* 22, 458-461, (2009).

94 Kiyomizu, K. *et al*. Fulminant septicemia of *Bacillus cereus* resistant to carbapenem in a patient with biphenotypic acute leukemia. *Journal of Infection and Chemotherapy* 14, 361-367, (2008).

95 Arseculeratne, S. N, Arseculeratne, G. A re-appraisal of the conventional history of antibiosis and Penicillin. *Mycoses* 60, 343-347, (2017).

96 Institute, S. H. "Paul Ehrlich", (2016).

97 Dubos, R. J. Studies on a Bactericidal Agent Extracted from a Soil *Bacillus*: Ii. Protective Effect of the Bactericidal Agent against Experimental *Pneumococcus* Infections in Mice. *The Journal of experimental medicine* 70, 11-17, (1939).

98 Yocum, R. R, Rasmussen, J. R, Strominger, J. L. The mechanism of action of penicillin. Penicillin acylates the active site of *Bacillus stearothermophilus* D-alanine carboxypeptidase. *The Journal of biological chemistry* 255, 3977-3986, (1980).

99 Singer, M. *et al*. Antibiotic resistance—the interplay between antibiotic use in animals and human beings. *The Lancet Infectious Diseases* 3, 47-51, (2003).

100 Pages, J. M, Bacterial porin and antibiotic susceptibility. *Médecine/Sciences (Paris)* 20, 346-351, (2004).

101 Tikhonova, E. B, Zgurskaya, H. I. AcrA, AcrB, and TolC of *Escherichia coli* Form a Stable Intermembrane Multidrug Efflux Complex. *The Journal of biological chemistry* 279, 32116-32124, (2004).

102 Li, X. Z, Nikaido, H, Poole, K. Role of mexA-mexB-oprM in antibiotic efflux in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 39, 1948-1953, (1995).

103 Campbell, E. A. *et al*. Structural mechanism for rifampicin inhibition of bacterial rna polymerase. *Cell* 104, 901-912, (2001).

104 Bradford, P. A. Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clinical Microbiology Reviews* 14, 933-951, table of contents, (2001).

105 Hakemi Vala, M. *et al*. Detection of Ambler class A, B and D ss-lactamases among *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from burn patients. *Annals of Burns and Fire Disasters* 27, 8-13, (2014).

106 https://www.santepubliquefrance.fr/maladies-et-traumatismes/infections-associees-aux-soins-et-resistance-aux-antibiotiques/resistance-aux-antibiotiques/donnees/.

107 Cherkaoui, A. *et al*. ESBL and carbapenemases in *Enterobacteriaceae*. *Revue Médicale Suisse* 10, 2142-2148, (2014).

108 https://www.ansm.sante.fr.

109 Goossens, H, Ferech, M, Vander Stichele, R, Elseviers, M. Outpatient antibiotic use in Europe and association with resistance: a cross-national database study. *The Lancet* 365, 579-587, (2005).

110 Porwal, R, Gopalakrishnan, R, Rajesh, N. J, Ramasubramanian, V. Carbapenem resistant Gram-negative bacteremia in an Indian intensive care unit: A review of the clinical profile and treatment outcome of 50 patients. *Indian Journal of Critical Care Medicine* 18, 750-753, (2014).

111 Zhanel, G. G. *et al*. Comparative review of the carbapenems. *Drugs* 67, 1027-1052, (2007).

112 https://eurekasante.vidal.fr/medicaments/antibiotiques/antibiotiques-pas-automatique.html#sDIYTEgLlt2Scq4l.99.

113 Cars, O. Securing access to effective antibiotics for current and future generations. Whose responsibility? *Upsala Journal of Medical Sciences* 119, 209-214, (2014).

114 Theuretzbacher, U. *et al*. Analysis of the clinical antibacterial and antituberculosis pipeline. *Lancet Infectious Diseases* 19, e40-e50, (2019).

115 Lam, S. J. *et al*. Combating multidrug-resistant Gram-negative bacteria with structurally nanoengineered antimicrobial peptide polymers. *Nature Microbiology* 1, 16162, (2016).

116 Sulakvelidze, A, Alavidze, Z, Morris, J. G, Jr. Bacteriophage therapy. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 45, 649-659, (2001).

117 Comeau, A. M, Tetart, F, Trojet, S. N, Prere, M. F, Krisch, H. M. Phage-Antibiotic Synergy (PAS): beta-lactam and quinolone antibiotics stimulate virulent phage growth. *PloS one* 2, e799, doi:10.1371/journal.pone.0000799, (2007).

118 Peters, J. M. *et al*. Enabling genetic analysis of diverse bacteria with Mobile-CRISPRi. *Nature Microbiology* 4, 244-250, (2019).

119 Rice, L. B. Federal funding for the study of antimicrobial resistance in nosocomial pathogens: no ESKAPE. *Journal of Infectious Diseases* 197, 1079-1081, (2008).

120 Opatowskia *et al*. Résistance bactérienne aux antibiotiques, apport du PMSI. *Épidémiologie et de Santé Publique* 65, S12, (2017).

121 Seputiene, V, Povilonis, J, Suziedeliene, E. Novel variants of AbaR resistance islands with a common backbone in *Acinetobacter baumannii* isolates of European clone II. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 56, 1969-1973, (2012).

122 Magnet, S, Courvalin, P, Lambert, T. Resistance-nodulation-cell division-type efflux pump involved in aminoglycoside resistance in Acinetobacter baumannii strain BM4454. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 45, 3375-3380, (2001).

123 Sharma, R. *et al*. Identification of novel regulatory small RNAs in *Acinetobacter baumannii*. *PloS one* 9, e93833, (2014).

124 Masalha, M, Borovok, I, Schreiber, R, Aharonowitz, Y, Cohen, G. Analysis of transcription of the *Staphylococcus aureus* aerobic class Ib and anaerobic class III ribonucleotide reductase genes in response to oxygen. *Journal of bacteriology* 183, 7260-7272, (2001).

125 Lowy, F. D. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. *The Journal of clinical investigation* 111, 1265-1273, (2003).

126 Lodge, J. M, Minchin, S. D, Piddock, L. J, Busby, S. J. Cloning, sequencing and analysis of the structural gene and regulatory region of the *Pseudomonas aeruginosa* chromosomal ampC beta-lactamase. *The Biochemical journal* 272, 627-631, (1990).

127 Podschun, R, Ullmann, U. *Klebsiella spp*. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clinical Microbiology Rev* 11, 589-603, (1998).

128 Colandene, J. D, Garrett, R. H. Functional dissection and site-directed mutagenesis of the structural gene for NAD(P)H-nitrite reductase in *Neurospora crassa*. *The Journal of biological chemistry* 271, 24096-24104, (1996).

129 Dietl, A. M, Binder, U, Shadkchan, Y, Osherov, N, Haas, H. Siroheme Is Essential for Assimilation of Nitrate and Sulfate as Well as Detoxification of Nitric Oxide but Dispensable for Murine Virulence of *Aspergillus fumigatus*. *Frontiers in microbiology* 9, 2615, (2018).

130 Brunskill, E. W, de Jonge, B. L, Bayles, K. W. The *Staphylococcus aureus* scdA gene: a novel locus that affects cell division and morphogenesis. *Microbiology* 143 (Pt 9), 2877-2882, (1997).

131 Stenfors Arnesen, L. P, Fagerlund, A, Granum, P. E. From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS Microbiology Reiewv* 32, 579-606, (2008).

132 Ramarao, N, Sanchis, V. The pore-forming haemolysins of *Bacillus cereus*: a review. *Toxins (Basel)* 5, 1119-1139, (2013).

133 Veysseyre, F, Fourcade, C, Lavigne, J. P, Sotto, A. *Bacillus cereus* infection: 57 case patients and a literature review. *Médecine et maladies infectieuses* 45, 436-440, (2015).

134 Ramarao, N. *et al.* Two unrelated episodes of *Bacillus cereus* bacteremia in a neonatal intensive care unit. *American Journal of Infection Control* 42, 694-695, (2014).

135 Darrigo, C, Guillemet, E, Dervyn, R, Ramarao, N. The Bacterial Mfd Protein Prevents DNA Damage Induced by the Host Nitrogen Immune Response in a NER-Independent but RecBC-Dependent Pathway. *PloS one* 11, e0163321, (2016).

136 Justino, M. C, Vicente, J. B, Teixeira, M, Saraiva, L. M. New genes implicated in the protection of anaerobically grown *Escherichia coli* against nitric oxide. *The Journal of biological chemistry* 280, 2636-2643, (2005).

137 Bauer, C. E, Elsen, S, Bird, T. H. Mechanisms for redox control of gene expression. *Annual review of microbiology* 53, 495-523, (1999).

138 Nakano, M. M, Geng, H, Nakano, S, Kobayashi, K. The nitric oxide-responsive regulator NsrR controls ResDE-dependent gene expression. *Journal of bacteriology* 188, 5878-5887, (2006).

139 Hantke, K. Regulation of ferric iron transport in *Escherichia coli* K12: isolation of a constitutive mutant. *Molecular Genetics and Genomics* 182, 288-292, (1981).

140 Lereclus, D, Arantes, O, Chaufaux, J, Lecadet, M. Transformation and expression of a cloned delta-endotoxin gene in *Bacillus thuringiensis*. *FEMS microbiology letters* 51, 211-217, (1989).

141 Tourasse, N. J, Helgason, E, Okstad, O. A, Hegna, I. K, Kolsto, A. B. The *Bacillus cereus* group: novel aspects of population structure and genome dynamics. *Journal of applied microbiology* 101, 579-593, (2006).

142 Kaes, C, Katz, A, Hosseini, M. W. Bipyridine: the most widely used ligand. A review of molecules comprising at least two 2,2'-bipyridine units. *Chemical reviews* 100, 3553-3590, (2000).

143 Tran, S. L, Guillemet, E, Lereclus, D, Ramarao, N. Iron regulates *Bacillus thuringiensis* haemolysin hlyII gene expression during insect infection. *Journal of Invertebrate Pathology* 113, 205-208, (2013).

144 Fouquier d'Herouel, A. *et al.* A simple and efficient method to search for selected primary transcripts: non-coding and antisense RNAs in the human pathogen *Enterococcus faecalis*. *Nucleic acids research* 39, (2011).

145 Joshi, N, Fass, J. Sickle: A sliding-window, adaptive, quality-based trimming tool for FastQ files (Version 1.33), (2011).

146 Langmead, B, Salzberg, S. L. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature Methods* 9, 357-359, (2012).

147 Mortazavi, A, Williams, B. A, McCue, K, Schaeffer, L, Wold, B. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *NatureMethods* 5, 621-628, (2008).

148 Love, M. I, Huber, W, Anders, S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology* 15, 550, (2014).

149 Strimmer, K. A unified approach to false discovery rate estimation. *BMC Bioinformatics* 9, 303, (2008).

150 Robinson, J. T. *et al.* Integrative genomics viewer. *NatureBiotechnologie* 29, 24-26, (2011).

151 Solovyev, V, Salamov, A. Automatic Annotation of Microbial Genomes and Metagenomic Sequences. In Metagenomics and its Applications in Agriculture, Biomedicine and Environmental Studies. *Nova Science Publishers*, 61-78, (2011).

152 Grant, C. E, Bailey, T. L, Noble, W. S. FIMO: scanning for occurrences of a given motif. *Bioinformatics* 27, 1017-1018, (2011).

153 Reents, H, Munch, R, Dammeyer, T, Jahn, D, Hartig, E. The Fnr regulon of *Bacillus subtilis*. *Journal of bacteriology* 188, 1103-1112, (2006).

154 Partridge, J. D, Bodenmiller, D. M, Humphrys, M. S, Spiro, S. NsrR targets in the *Escherichia coli* genome: new insights into DNA sequence requirements for binding and a role for NsrR in the regulation of motility. *Molecular microbiology* 73, 680-694, (2009).

155 Chumsakul, O. *et al.* Genome-Wide Analysis of ResD, NsrR, and Fur Binding in *Bacillus subtilis* during Anaerobic Fermentative Growth by In Vivo Footprinting. *Journal of bacteriology* 199, (2017).

156 Harvie, D. R, Vilchez, S, Steggles, J. R, Ellar, D. J. *Bacillus cereus* Fur regulates iron metabolism and is required for full virulence. *Microbiology* 151, 569-577, (2005).

157 Green, J, Guest, J. R. Activation of FNR-dependent transcription by iron: an in vitro switch for FNR. *FEMS microbiology letters* 113, 219-222, (1993).

158 Spencer, J. B, Stolowich, N. J, Roessner, C. A, Scott, A. I. The *Escherichia coli* cysG gene encodes the multifunctional protein, siroheme synthase. *FEBS letters* 335, 57-60, (1993).

159 Deaconescu, A. M. *et al.* Structural basis for bacterial transcription-coupled DNA repair. *Cell* 124, 507-520, (2006).

160 Roberts, J, Park, J. S. Mfd, the bacterial transcription repair coupling factor: translocation, repair and termination. *Current opinion in microbiology* 7, 120-125, (2004).

161 Rama Rao, N, Rognan, D, Lereclus, D, Method of screening antibacterial compounds as inhibitor of Mfd. WO/2017/191184

162 Kahraman, A, Morris, R. J, Laskowski, R. A, Thornton, J. M. Shape variation in protein binding pockets and their ligands. *Journal of molecular biology* 368, 283-301, (2007).

163 Inglis, R. F, Gardner, A, Cornelis, P, Buckling, A. Spite and virulence in the bacterium *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 5703-5707, (2009).

164 Peleg, A. Y. *et al.* Reduced susceptibility to vancomycin influences pathogenicity in *Staphylococcus aureus* infection. *Journal of Infectious Diseases.* 199, 532-536, (2009).

165 Griess, P. Bemerkungen zu der Abhandlung der HH. Weselsky und Benedikt „Ueber einige Azoverbindungen". *Chemische Berichte.* 12, 426–428, (1879).

166 Ramamurthi, A, Lewis, R. S. Measurement and modeling of nitric oxide release rates for nitric oxide donors. *Chemical research in toxicology* 10, 408-413, (1997).

167 Valero, L, Alhareth K, Gil S, Lecarpentier E, Tsatsaris V, Mignet N, Fournier T, Andrieux K.. Nanomedicine as a potential approach to empower the new strategies for the treatment of preeclampsia. *Drug Discovery Today* 23, 1099-1107, (2018).

168 Murphy, M. J, Siegel, L. M. Siroheme and sirohydrochlorin. The basis for a new type of porphyrin-related prosthetic group common to both assimilatory and dissimilatory sulfite reductases. *The Journal of biological chemistry* 248, 6911-6919, (1973).

169 Guillot, J, Dannaoui, E. La résistance aux antifongiques : importance en médecine humaine et vétérinaire. *Bulletin de l'Académie Vétérinaire de France* 168, 314-319, (2015).

170 Jin, Y, Veiga, M, Kennes, C. Bioprocesses for the removal of nitrogen oxides from polluted air. *Journal of Chemical Technology , Biotechnology* 80, 483–494, (2005).

171 Hu, Z, Wessels, H, van Alen, T, Jetten, M. S. M, Kartal, B. Nitric oxide-dependent anaerobic ammonium oxidation. *Nature Commun*ication10, 1244, (2019).

172 Dierick, K, Van Coillie, E, Swiecicka, I, Meyfroidt, G, Devlieger, H, Meulemans, A, Hoedemaekers, G, Fourie, L, Heyndrickx, M, Mahillon, J, Fatal Family Outbreak of *Bacillus cereus*-Associated Food Poisoning. . *Journal of Clinical Microbiology*. 43, 4277–4279, (2005).

173 Frenzel, E, Kranzler, M, Stark, T.D, Hofmann, T, Ehling-Schulz, M. The endospore-forming pathogen *Bacillus cereus* exploits a small colony variant-based diversification strategy in response to Aminoglycoside exposure. *mBio* 6, e01172-15, (2015).

174 Haeghebaert, S, Le Querrec, F, Bouvet, P, Gallay, A, Espié, E, Vaillant, V. Les toxi-infections alimentaires collectives en France en 2001. *Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire*. 249, (2002).

175 Ikeda, M, Yagihara, Y, Tatsuno, K, Okazaki, M, Okugawa, S, Moriya, K. Clinical characteristics and antimicrobial susceptibility of *Bacillus cereus* blood stream infections. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials.* 14, (2015).

176 Naranjo, M, Denayer, S, Botteldoorn, N, Delbrassinne, L, Veys, J, Waegenaere, J, Sirtaine, N, Driesen, R.B, Sipido, K.R, Mahillon, J, Dierick, K. Sudden Death of a Young Adult Associated with *Bacillus cereus* Food Poisoning. *Journal of Clinical Microbiology*. 49, 4379–4381, (2011).

177 Torok, E, Moran, E, Cooke, F. *Oxford Handbook of Infectious Diseases and Microbiology*. OUP Oxford. p. Chapter 2. ISBN 9780191039621. Archived from the original on September 8, 2017. (2009).

178 Waksman, SA. Antagonistic relations of microorganisms. *Bacteriology Review.* 5(3): 231–291, (1941).

179 Zumft, WG. Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiology and Molecular Biology Reviews, 61, 533–616, (1997).*

180 Corker, H. and. Poole RK. Nitric oxide formation by *Escherichia coli*. Dependence on nitrite reductase, the NO sensing regulator FNR, and flavohemoglobin Hmp, *The Journal of Biological Chemistry*. 278, 31584–31592, (2003).

181 Gilberthorpe, NJ. and R. K. Poole, RK. Nitric oxide homeostasis in *Salmonella typhimurium*: roles of respiratory nitrate reductase and flavohemoglobin, *The Journal of Biological Chemistry*, 283, 11146–11154, (2008).

182 Gusarov, I, Starodubtseva, M, Wang, ZQ, *et al*. Bacterial nitric-oxide synthases operate without a dedicated redox partner, *The Journal of Biological Chemistry*, 283,13140–13147, (2008).

183 Chen Y, Rosazza JP. A bacterial nitric oxide synthase from a *Nocardia* species. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 15, 1251-1258, (1994).

184 Gusarov, I. and Nudler, E. NO-mediated cytoprotection: Instant adaptation to oxidative stress in bacteria *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A*. 27, 13855–13860, (2005).

185 Mogen AB, Carroll RK, James KL, Lima G, Silva D, Culver JA, Petucci C, Shaw LN, Rice KC. *Staphylococcus aureus* nitric oxide synthase (saNOS) modulates aerobic respiratory metabolism and cell physiology. *Molecular Microbiology*. 105, 139-157, (2017).

186 Ho, HN, van Oijen, AN, Ghodke, H. The transcription-repair coupling factor Mfd associates with RNA polymerase in the absence of exogenous damage. *Nature Communication*, 9: 1570, (2018).

187 Le, TT, Yang, Y, Chuang Tan, C, Margaret M. Suhanovsky, MM, Robert M. Fulbright,RM, Inman, JT, Li, M, Lee, J, Perelman, S, Roberts, JW, Deaconescu, AM, Wang, MD. Mfd Dynamically Regulates Transcription via a Release and Catch-up Mechanism. *Cell* 172, 344–357, (2018).

188 Kotlajich, MV, Hron, DR, Boudreau, BA, Sun, Z, Lyubchenko, YL, Landick, R. Bridged filaments of histone-like nucleoid structuring protein pause RNA polymerase and aid termination in bacteria. *Elife*. 16;4, (2015).

189 Pomerantz, RT, O'Donnell, M. Direct restart of a replication fork stalled by a head-on RNA polymerase. *Science*. 327, 590–592, (2010).

190 Dutta, D, Shatalin, K, Epshtein, V, Gottesman, ME, Nudler, E. Linking RNA polymerase backtracking to genome instability in *E. coli*. *Cell*.;146, 533–543, (2011).

191 Arnaud, M, Chastanet, A, Débarbouillé, M. New vector for efficient allelic replacement in naturally nontransformable, low-GC-content, gram-positive bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*.70, 6887-91, (2004)

192 InVS, 2014. Surveillance des toxi-infections alimentaires collectives Données de la déclaration obligatoire, Institut de Veille Sanitaire, (2014).

193 Fiche de description de danger biologique transmissible par les aliments : *Bacillus cereus*, ANSES, (2011)

194 Tran SL, Guillemet E, Ngo-Camus M, Clybouw C, Puhar A, Moris A, Gohar M, Lereclus D, Ramarao N. Haemolysin II is a *Bacillus cereus* virulence factor that induces apoptosis of macrophages. *Cellular Microbiology*. 13(1):92-108, (2011).

195 Andreeva-Kovalevskaya ZhI, Solonin AS, Sineva EV, Ternovsky. Pore-forming proteins and adaptation of living organisms to environmental conditions. *Biochemistry (Moscou).* 73, 1473-1492, (2008).

196 Tran SL, Guillemet E, Lereclus D, Ramarao N. Iron regulates *Bacillus thuringiensis* haemolysin *hlyII* gene expression during insect infection. J*ournal of Invertebrate Pathology* 113(3):205-8, (2013).

197 Fagerlund, A, Lindbäck, T, Granum, P.E. *Bacillus cereus* cytotoxins Hbl, Nhe and CytK are secreted via the Sec translocation pathway. *BMC Microbiology*. 10, 304, (2010).

198 Bouillaut, L, Ramarao, N, Buisson, C, Gilois, N, Gohar, M, Lereclus, D, Nielsen-LeRoux, C. FlhA Influences *Bacillus thuringiensis* PlcR-Regulated Gene Transcription, Protein Production, and Virulence. *Applied and Environmental Microbiology*. 71, 8903–8910, (2005).

199 Bischoff, D.S, Ordal, G.W. *Bacillus subtilis* chemotaxis: a deviation from the *Escherichia coli* paradigm. *Molecular Microbiology* 6, 23–28, (1992).

200 Dalhammar, G, Steiner, H. Akan. Characterization of inhibitor A, a protease from *Bacillus thuringiensis* which degrades attacins and cecropins, two classes of antibacterial proteins in insects. *European Journal of Biochemistry*. 139, 247–252, (1984).

201 Ramarao, N, Lereclus, D. The InhA1 metalloprotease allows spores of the B. cereus group to escape macrophages: InhA1 allows *B. thuringiensis* escape from macrophages. *Cellular Microbiology*. 7, 1357–1364, (2005).

202 Chung, M.-C, Popova, T.G, Millis, B.A, Mukherjee, D.V, Zhou, W, Liotta, L.A, Petricoin, E.F, Chandhoke, V, Bailey, C, Popov, S.G. Secreted Neutral Metalloproteases of *Bacillus anthracis* as Candidate Pathogenic Factors. *The Journal of Biological Chemistry*. 281, 31408–31418, (2006).

203 Miyoshi, S, Shinoda, S. Microbial metalloproteases and pathogenesis. *Microbes and Infection*. 2, 91–98, (2000).

204 Odunuga, O.O, Adekoya, O.A, Sylte, I. High-level expression of pseudolysin, the extracellular elastase of *Pseudomonas aeruginosa*, in *Escherichia coli* and its purification. *Protein Expression and Purification, 113:79-84, (2015).*

205 Nakamura, L.K. *Bacillus pseudomycoides* sp. nov. *International* journal o*f systematic bacteriology*. 1031–1035, (1998).

206 Stenfors, L.P, Granum, P.E. Psychrotolerant species from the *Bacillus cereus* group are not necessarily *Bacillus weihenstephanensis. FEMS Microbiology Letters*. 197, 223–228, (2001).

207 Schnepf, E, Crickmore, N. v, Van Rie, J, Lereclus, D, Baum, J, Feitelson, J, Zeigler, D.R, Dean, D.H. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 62, 775–806, (1998).

208 Jiménez, G, Urdiain, M, Cifuentes, A, López-López, A, Blanch, A.R, Tamames, J, Kämpfer, P, Kolstø, A.-B, Ramón, D, Martínez, J.F, Codoñer, F.M, Rosselló-Móra, R. Description of *Bacillus toyonensis* sp. nov, a novel species of the *Bacillus cereus* group, and pairwise genome comparisons of the species of the group by means of ANI calculations. *Systematic and Applied Microbiology*. 36, 383–391, (2013).

209 Oren, A, Garrity, G.M. List of new names and new combinations previously effectively, but not validly, published. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 64, 1–5, (2014).

210 Awad, M.K, Saadaoui, I, Rouis, S, Tounsi, S, Jaoua, S. Differentiation between *Bacillus thuringiensis* strains by gyrB PCR-Sau3Al fingerprinting. *Molecular Biotechnology* 35, 171–177, (2007).

211 Sheppard AE, Poehlein A, Rosenstiel P, Liesegang H, Schulenburg H. Complete Genome Sequence of *Bacillus thuringiensis* Strain 407 Cry-. *Genome Announcements*. 1, e00158-12, (2013).

212 Ceragioli M, Mols M, Moezelaar R, Ghelardi E, Senesi S, Abee T. Comparative transcriptomic and phenotypic analysis of the responses of *Bacillus cereus* to various disinfectant treatments. *Applied Environemental Microbiology* 76, 352-60, (2010).

213 Mols, M, van Kranenburg, R, Tempelaars, M.H, van Schaik, W, Moezelaar, R, and Abee, T. Comparative analysis of transcriptional and physiological responses of *Bacillus cereus* to organic and inorganic acid shocks. *International Journal* of *Food Microbiology* 137: 13–21, (2010b).

université PARIS-SACLAY

**ECOLE DOCTORALE N°581**
Agriculture, alimentation, biologie, environnement et santé (ABIES)

**Titre :** La réponse au NO au centre de la pathogenèse bactérienne et cible d'antibiotiques innovants

**Mots clés :** Monoxyde d'azote, réponse immunitaire, pathogène, antibiotique, *Bacillus cereus*.

**Résumé :** Le NO ou monoxyde d'azote est un radical libre très réactif omniprésent dans le monde du vivant. Il est capable de modifier les bases d'ADN, les lipides membranaires, l'activité des enzymes… Il a de nombreux rôles biologiques chez les animaux, les plantes, les champignons et les bactéries. Il est notamment produit par les cellules de l'immunité innée pour lutter contre les infections.
Pour infecter l'hôte, certaines bactéries pathogènes ont mis au point des mécanismes de résistance à ce stress. *Bacillus cereus,* est une bactérie pathogène qui est capable de résister au NO. Cependant ces mécanismes ne sont pas tout à fait élucidés. La protéine Mfd est connue comme pouvant réparer les lésions du NO sur l'ADN et augmenter la résistance au stress NO.
D'une part, une approche transcriptomique sur *Bacillus cereus* a permis de mettre en évidence, une région du génome particulièrement activée en présence de NO. Cette région contient des gènes qui codent pour une protéine de réparation des dommages causés par le NO, une enzyme de métabolisme de l'azote et des enzymes de biosynthèse du sirohème, un groupement ferreux.
D'autre part, un inhibiteur de la protéine Mfd a été testé pour son efficacité antibactérienne sur *Bacillus cereus* et sur quatre bactéries responsables d'infections en impasse thérapeutique à cause de l'apparition de résistances aux antibiotiques.

**Title :** The NO response at the heart of the bacterial pathogenesis and target of innovative antibiotics

**Keywords :** Nitric oxide, immune response, bacterial pathogens, antibiotics, *Bacillus cereus*

**Abstract :** NO or nitric oxide is a highly reactive free radical that is ubiquitous in the living world. It is capable of modifying DNA bases, membrane lipids, the activity of enzymes, etc. It has many biological roles in animals, plants, fungi and bacteria. It is produced in particular by cells of the innate immunity to fight against infections.
To infect host, certain pathogenic bacteria have developed mechanisms to resist this stress. Bacillus cereus, is a pathogen that is able to resist NO. However, these mechanisms have not been fully elucidated. The Mfd protein is known to repair damage to NO on DNA and to increase resistance to NO stress.
On one hand, a transcriptomic approach on Bacillus cereus allows to highlight a genomic region particularly activated in presence of NO. This region contains genes that code for a damage repair protein, a nitrogen metabolism enzyme and enzymes from the biosynthesis of siroheme, a ferrous group.
On the other hand, a Mfd inhibitor has been tested for its antibacterial efficiency on Bacillus cereus and on four bacteria responsible for infections in therapeutic impasse due to the appearance of antibiotic resistance.

**Université Paris-Saclay**
Espace Technologique / Immeuble Discovery
Route de l'Orme aux Merisiers RD 128 / 91190 Saint-Aubin, France