



HAL
open science

Production de monoxyde d'azote par les staphylocoques à coagulase négative : implication de l'oxyde nitrique synthase de staphylococcus xylosus

Geoffrey Ras

► **To cite this version:**

Geoffrey Ras. Production de monoxyde d'azote par les staphylocoques à coagulase négative : implication de l'oxyde nitrique synthase de staphylococcus xylosus. Alimentation et Nutrition. Université Clermont Auvergne [2017-2020], 2017. Français. NNT : 2017CLFAC029 . tel-01887057

HAL Id: tel-01887057

<https://theses.hal.science/tel-01887057>

Submitted on 3 Oct 2018

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.

UNIVERSITE CLERMONT AUVERGNE

N° D.U : 2823

ANNEE 2017

***ECOLE DOCTORALE SCIENCES DE LA VIE,
SANTÉ, AGRONOMIE, ENVIRONNEMENT***

N° d'ordre : 721

THESE

Présentée à l'Université CLERMONT AUVERGNE

Pour l'obtention du grade de :

DOCTEUR D'UNIVERSITE

Spécialité : Nutrition et Sciences des Aliments

Geoffrey Ras

Soutenance du 05 Juillet 2017

**Production de monoxyde d'azote par les staphylocoques à
coagulase négative : implication de l'oxyde nitrique synthase
de *Staphylococcus xylosus***

Jury de thèse :

Président M. F. Delbac, Professeur, Université Clermont Auvergne, Clermont-Ferrand

Rapporteurs M. Y. Le Loir, Directeur de Recherche, INRA, Rennes

M. E. Coton, Professeur, Université Bretagne Occidentale, Plouzané

Membres Mme R. Talon, Directeur de thèse, Directrice de Recherche, INRA, Auvergne-Rhône-Alpes

Mme S. Leroy, Ingénieure de Recherche, INRA, Auvergne-Rhône-Alpes

Mme V. Zuliani, Business Development Manager, CHR-HANSEN, Arpajon

REMERCIEMENTS

Ce travail de thèse entamé en avril 2014 a été réalisé dans l'UR454 Microbiologie dirigée par Régine Talon au sein de l'INRA Auvergne-Rhône-Alpes, et se termine aujourd'hui en avril 2017 dans la nouvelle UMR454 MEDIS dirigée par Pierre Peyret.

Que d'émotions au travers de ces trois années ! Je réalise à peine le chemin parcouru, des progrès que j'ai accompli et de tout ce qu'il me reste à faire. Loin de tout repos, c'est avec abnégation qu'il faut parcourir ce chemin de trois années. Parmi toutes les personnes que j'ai pu croiser durant ma thèse, je tiens à exprimer mes remerciements et ma gratitude :

Je ne peux dissocier mes remerciements envers mes directrices de thèse Régine Talon et Sabine Leroy. Je vous adresse à toutes les deux, un immense merci pour votre encadrement de tous les jours. Je suis vraiment heureux d'avoir bénéficié de vos conseils et surtout de votre disponibilité. Et merci également de m'avoir soutenu dans ce projet qui nous a donné du fil à retordre !

Je remercie tout particulièrement Messieurs Emmanuel Coton et Yves Le Loir d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ce projet et Monsieur Frédéric Delbac pour avoir accepté de participer au jury de thèse.

J'adresse également un immense merci à Véronique Zuliani de la société Chr-Hansen. Je te remercie de l'accueil que tu as su me réserver au sein de la famille Hansen et d'avoir toujours été disponible quand j'en ai eu besoin et de m'encourager dans les moments difficiles !

Merci également aux membres de mes comités de pilotages, Patrick Derck, Tim Martin Seibert et John Jensen de la société Chr-Hansen. Votre soutien et vos encouragements m'ont été d'une grande aide. Merci pour toutes les discussions scientifiques et les remarques pertinentes qui ont fait avancer mon projet de thèse.

Je remercie Xavier Bailly pour son aide précieuse en phylogénie et pour sa sympathie. Je remercie Philippe Gatellier pour toutes les discussions scientifiques à propos de la myoglobine et toute son équipe pour leur accueil et leur soutien technique.

J'exprime une sincère reconnaissance à Jean-Paul Chacornac. Je suis vraiment heureux d'avoir bénéficié de ton soutien technique sans faille ! J'ai beaucoup appris, je pense, de ce que signifie travailler en équipe grâce à toi. Jean-Paul, la NOS n'a plus aucun secret pour toi.

Une thèse génère beaucoup de vaisselle et de milieux à préparer, à laver, à autoclaver... Mille mercis à Carine Andant, ton travail est essentiel au bon fonctionnement du laboratoire.

Je remercie Alexandra Durand pour sa bonne humeur quotidienne et son intérêt pour ma vie personnelle ; Nelly Caccia, pour avoir retourné mon bureau si souvent, c'était drôle j'avoue,

et Ingrid Chafsey (pas de blague sur ton prénom c'est promis) pour avoir été complice de Nelly. Vous faites du super boulot.

Merci à Sylvie Milesi et Alexandre Richard pour toutes ces commandes que vous avez passé pour moi ! Merci à Stéphanie Dutilloy pour ton aide et pour les réactivations de mon badge !

Je remercie également Michel Hébraud de m'avoir fait découvrir le badminton. *A posteriori*, je peux t'avouer que je n'ai pas joué à 100% contre toi, j'avais peur de te battre à plate couture. Mais après la thèse... si tu veux, rendez-vous sur un terrain de badminton !

Je remercie Mickaël Desvaux pour nos discussions durant ces trois années, scientifiques et non scientifiques. Mais bon je préfère quand même Star Trek à Star Wars désolé !

Je remercie également toute l'équipe à l'étage pour votre bonne humeur et votre sympathie à mon égard.

Merci également à Brigitte Gaillard-Martinie pour son aide en microscopie. J'ai apprécié nos échanges et tes conseils.

J'ai une énorme pensée pour les thésards et ex-thésards du labo. Je remercie Aurore pour ses encouragements et ses conseils. Je remercie les autres matelots Valentin, Ilham, Marie-Carmen et mes partenaires de bureau Julia et Tiago. Je remercie également Irena, Giulia et Bertrand parce que nous avons passé des moments inoubliables ensemble. D'autres compagnons de route qui m'ont beaucoup apporté, Susana et Ricardo. J'espère vite vous revoir.

Je remercie du fond du cœur mes parents, mon frère et ma sœur, votre soutien m'est indispensable. Depuis le début de ma thèse, et même avant, vous avez toujours cru en moi et jamais je ne l'oublierai !

Ces quelques lignes te reviennent Audrey. Cette thèse n'aurait pas été pareille sans toi. Merci de m'avoir toujours écouté, soutenu, encouragé et aidé à aller jusqu'au bout. Tu as toutes les qualités pour réussir parce que tu es la meilleure !

Enfin, j'exprime toute ma gratitude à la société Chr-Hansen et à l'Association Nationale de la Recherche et de la Technologie (CIFRE n°2013/1490) pour m'avoir offert cette chance de réaliser mon projet de thèse.

Table des matières

Table des matières.....	1
Liste des Figures.....	5
Liste des Tableaux.....	7
INTRODUCTION.....	9
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	13
- CHAPITRE 1 - LES STAPHYLOCOQUES.....	15
A) GENERALITES	15
B) LES STAPHYLOCOQUES A COAGULASE NEGATIVE DANS LES ALIMENTS.....	20
1) Les produits carnés.....	20
2) Les produits laitiers	21
3) Les produits de la mer	22
4) Les produits dérivés du soja.....	22
- CHAPITRE 2 – PROPRIETES FONCTIONNELLES DES STAPHYLOCOQUES UTILISES COMME FERMENTS.....	23
A) LE METABOLISME DES SUBSTRATS CARBONES	23
1) Les glucides.....	23
1.1) Les systèmes de transport.....	24
1.2) Le catabolisme	27
2) Les nucléosides	28
B) LE METABOLISME DES PROTEINES ET ACIDES AMINES	29
1) Le catabolisme des acides aminés.....	30
2) Le catabolisme de l'arginine	30
2.1) La voie de l'arginine déiminase (ADI)	31
2.2) La voie arginase	32
C) LE METABOLISME DES LIPIDES ET ACIDES GRAS.....	33
1) La lipolyse.....	33
2) Le catabolisme des acides gras.....	33
2.1) La β -oxydation	35
2.2) La peroxydation	35
2.2.1) La superoxyde dismutase	35
2.2.2) Les catalases.....	36
D) L'ADAPTATION AU STRESS	37
1) Le stress nitrosant/oxydant.....	37
2) Le stress osmotique	38
- CHAPITRE 3 - DEVELOPPEMENT DE LA COULEUR ET ROLE DES STAPHYLOCOQUES. 41	
A) LA MYOGLOBINE ET SES DIFFERENTES FORMES.....	42

B) LE ROLE DU NITRATE ET DU NITRITE SUR LA COULEUR.....	43
1) Les nitrates et nitrites dans la viande	43
2) Le NO dans la viande	45
2.1) Réaction avec l'oxygène et ses dérivés	46
2.2) Réaction avec les acides aminés.....	46
2.3) Réaction avec l'acide ascorbique	47
2.4) Réaction avec les métaux de transitions.....	48
C) LE CATABOLISME DES COMPOSES NITROSES PAR <i>S. XYLOSUS</i> ET <i>S. CARNOSUS</i>	48
1) La nitrate réductase	48
1.1) L'opéron <i>nar</i>	48
1.2) L'activité nitrate réductase	50
2) La nitrite réductase	50
2.1) L'opéron <i>nir</i>	50
2.2) L'activité nitrite réductase.....	52
3) La régulation des opérons <i>nar</i> et <i>nir</i>	52
D) LES ALTERNATIVES AUX NITRATES/NITRITES POUR LA FORMATION DE LA COULEUR.....	53
1) Les extraits de plantes	54
2) Les colorants naturels.....	54
3) Les bactéries.....	55
- CHAPITRE 4 - SYNTHÈSE DU MONOXYDE D'AZOTE ET L'OXYDE NITRIQUE SYNTHASE (NOS)	57
A) LA RÉDUCTION DES NITRITES CHEZ LES PROCARYOTES.....	57
1) La réduction des nitrites par une nitrite réductase.....	57
1.1) Les bactéries dénitrifiantes.....	57
1.2) Les bactéries fixatrices d'azote	58
1.3) Les bactéries nitrifiantes.....	58
1.4) Les bactéries « anammox »	59
2) La réduction des nitrites par une nitrate réductase	59
B) LES OXYDE NITRIQUE SYNTHÈSES (NOS) CHEZ LES PROCARYOTES.....	60
1) La phylogénie.....	60
2) La structure des NOS	62
2.1) Les domaines des NOS	62
2.2) Le domaine oxygénase.....	63
2.3) Le cofacteur ptérine.....	65
3) Le mode d'action et l'activité NOS.....	67
3.1) Le mode d'action.....	67
3.2) L'activité NOS	69

3.2.1) La mesure de l'activité	69
3.2.2) L'inhibition	70
3.3) Le(s) partenaire(s) réductase(s).....	71
4) Les fonctions des NOS bactériennes.....	71
4.1) La cytoprotection	72
4.1.1) La réponse au stress oxydant.....	72
4.1.2) La réponse au stress aux rayons ultra-violets.....	73
4.2) La formation de métabolites secondaires	74
4.2.1) La nitration de la toxine thaxtomine	74
4.2.2) La nitration du tryptophane	74
4.3) Les biofilms.....	75
4.4) La respiration aérobie et anaérobie	75
RESULTATS	77
MISE EN EVIDENCE D'UNE ACTIVITE OXYDE NITRIQUE SYNTHASE CHEZ <i>STAPHYLOCOCCUS XYLOSUS</i>	79
Contexte de l'étude.....	81
Résultats de l'étude.....	81
Résultats complémentaires	84
CONTRIBUTION DE L'OXYDE NITRIQUE SYNTHASE DES STAPHYLOCOQUES A COAGULASE NEGATIVE POUR LE DEVELOPPEMENT DE LA COULEUR DES PRODUITS CARNES	107
Contexte de l'étude.....	109
Résultats de l'étude.....	109
ETUDE PRELIMINAIRE :	131
EXPRESSION DE LA NOS DE <i>STAPHYLOCOCCUS XYLOSUS</i> C2A CHEZ <i>ESCHERICHIA COLI</i>	131
Contexte de l'étude.....	133
Matériels et Méthodes	134
Résultats	138
Discussion.....	139
DISCUSSION	141
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	151
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	155
COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES.....	173

Liste des Figures

Figure 1. Arbre phylogénétique du genre <i>Staphylococcus</i> basé sur les séquences d'ADN du gène de l'ARNr 16S.....	16
Figure 2. Le catabolisme du glucose et du lactate en matrice carnée chez <i>Staphylococcus xylosus</i>	28
Figure 3. Le catabolisme des nucléosides par les staphylocoques.	29
Figure 4. Le catabolisme des acides aminés à chaîne latérale ramifiée dans la viande par <i>S. xylosus</i> . .	31
Figure 5. Le catabolisme de l'arginine chez les staphylocoques.....	31
Figure 6. Le catabolisme des acides gras.	34
Figure 7. Principaux gènes exprimés par <i>S. xylosus</i> en réponse à un stress nitrosant/oxydant et à un stress osmotique en matrice carnée.	39
Figure 8. Les différentes formes de la myoglobine.	43
Figure 9. Schéma réactionnel simplifié des nitrates et des nitrites dans la viande.	44
Figure 10. Réactions du NO avec les composés de la viande.	46
Figure 11. Cartographie de l'opéron <i>nar</i> et environnement génétique chez <i>S. carnosus</i> TM300 et <i>S. xylosus</i> C2a.....	49
Figure 12. Cartographie de l'opéron <i>nir</i> et environnement génétique chez <i>S. carnosus</i> TM300 et <i>S. xylosus</i> C2a.....	51
Figure 13. Arbre phylogénétique des NOS procaryotes.....	61
Figure 14. Les domaines des NOS.	63
Figure 15. Structure tridimensionnelle du domaine oxygénase des NOS.	64
Figure 16. Structure des cofacteurs ptérines.....	66
Figure 17 : Synthèse de NO dépendante de NOS.....	67
Figure 18. Modèle de synthèse du NO par la NOS.	68
Figure 19. Rôle du NO dans la réponse au stress oxydant chez <i>Bacillus subtilis</i>	72
Figure 20. Cinétique de conversion de la metmyoglobine par <i>S. xylosus</i> C2a.....	83
Figure 21. Détection du NO intracellulaire par des sondes fluorescentes.....	87
Figure 22. Estimation de la production intracellulaire de NO chez <i>S. xylosus</i> C2a et les mutants (Δnos et $\Delta nospRBnos$) après 26h de culture sur gélose TSA.	88
Figure 23. Estimation de la production intracellulaire de NO chez <i>S. xylosus</i> C2a et les mutants (Δnos et $\Delta nospRBnos$) après 48h de culture sur gélose TSA.	89
Figure 24. Impact des substrats et des cofacteurs de la NOS sur la production de NO chez <i>S. xylosus</i> C2a et son mutant Δnos	90
Figure 25. Cartographie du vecteur pBAD/His.....	135
Figure 26. Détection de la protéine NOS recombinante par A) électrophorèse SDS-PAGE et B) Western blot révélé avec un anticorps anti-histidine.....	138
Figure 27. Arbre phylogénétique des NOS du genre <i>Staphylococcus</i>	145
Figure 28. Modèle d'interaction des staphylocoques avec la metmyoglobine.....	150
Figure 29 : Potentiel de la souche <i>S. xylosus</i> C2a dans le catabolisme du nitrate et de l'arginine en lien avec la synthèse de NO.....	152

Liste des Tableaux

Tableau 1. Liste des espèces et sous-espèces du genre <i>Staphylococcus</i>	17
Tableau 2. Systèmes de transport des glucides chez <i>Staphylococcus xylosus</i> et <i>Staphylococcus carnosus</i>	24
Tableau 3. Chimie du NO et ses dérivés : quelques exemples	45
Tableau 4. Liste des souches et des plasmides utilisés.....	134
Tableau 5. Oligonucléotides utilisés.....	136

INTRODUCTION

Depuis des millénaires, les produits carnés saumurés ou fermentés sont au cœur de l'alimentation humaine. Dans ces produits, les bactéries lactiques et les staphylocoques à coagulase négative (SCN) sont majoritaires du fait des procédés de fabrication, notamment le salage et le séchage. Les SCN sont des bactéries ubiquitaires, commensales de la peau et des muqueuses des animaux ce qui explique leur prévalence dans les produits d'origine animale, lait, viande et dérivés. Les SCN constituent un vaste groupe d'une quarantaine d'espèces. Les plus fréquemment isolées dans les produits carnés sont *Staphylococcus equorum*, *Staphylococcus saprophyticus* et *Staphylococcus xylosus* mais d'autres espèces comme *Staphylococcus carnosus* et *Staphylococcus warneri* font aussi partie de l'écosystème. A l'heure actuelle, *S. carnosus* et *S. xylosus* sont les deux seules espèces utilisées comme ferments dans la fabrication des produits carnés. Elles contribuent au développement des propriétés sensorielles de ces produits.

Dans les produits carnés, du nitrate et/ou du nitrite sont couramment utilisés comme additifs. Aussi, leur utilisation est réglementée au niveau des quantités d'intrants et des quantités résiduelles en fin de procédé. Les quantités réglementaires dépendent du type de produits, traités ou non thermiquement. Ces additifs sont ajoutés pour leur rôle dans le développement des propriétés sensorielles et tout particulièrement celui de la couleur rouge des salaisons. Les staphylocoques réduisent le nitrate en nitrite sous l'action de leur nitrate réductase. Puis, par une succession de réactions chimiques complexes, le nitrite est réduit en monoxyde d'azote (NO) qui interagit avec un atome de fer situé au centre du groupement hème de la myoglobine contenu dans la viande. La molécule de nitrosomyoglobine ainsi formée est le pigment stable de couleur rouge caractéristique des produits de salaison.

Malgré le rôle bénéfique du nitrite sur les propriétés sensorielles des produits carnés, son addition fait l'objet de controverses. En effet, le nitrite peut réagir avec des amines secondaires pour former des composés nitrosés carcinogènes. De ce fait, les industriels cherchent des alternatives à son utilisation, tout en ayant la contrainte de fabriquer des produits qui présentent les mêmes caractéristiques de couleur. Parmi les différentes alternatives, nous nous sommes intéressés à la capacité de certaines bactéries à produire du NO indépendamment du nitrate/nitrite. Ainsi, quelques bactéries lactiques telles que *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus fermentum*, *Pediococcus acidilactici* et *Staphylococcus xylosus* ont été décrites comme capables de former de la nitrosomyoglobine à partir de la myoglobine. Cependant, le mécanisme de production du NO n'était pas explicité. Plusieurs voies permettent aux bactéries de synthétiser du NO. Nous nous sommes intéressés

à l'oxyde nitrique synthase (NOS) qui catabolise l'arginine en NO et en citrulline. Aucun gène codant cette enzyme n'a été identifié chez les bactéries lactiques alors que ce gène est présent chez tous les staphylocoques dont le génome a été séquencé. Mais à ce jour, seule l'activité NOS de *Staphylococcus aureus* a été caractérisée. La présence du gène *nos* chez *S. xylosus* couplée à sa capacité à former de la nitrosomyoglobine, nous ont conduits à explorer au cours de cette thèse son potentiel de synthèse de NO par la NOS. Nous avons d'abord considéré la souche *S. xylosus* C2a dont le génome est séquencé puis nous avons étendu notre étude à d'autres souches de *S. xylosus* et de SCN fréquemment isolées de produits carnés.

La première partie de ce manuscrit est une étude bibliographique qui présente l'état actuel des connaissances sur la diversité des espèces de SCN dans les aliments, les propriétés fonctionnelles des deux espèces utilisées comme ferments et plus spécifiquement leur rôle dans la formation de la couleur des produits carnés. Enfin, un chapitre est dédié à la synthèse de NO par l'oxyde nitrique synthase qui est au cœur de ce projet de thèse.

La deuxième partie regroupe les résultats qui se décomposent en trois sous-parties. La première porte sur la mise en évidence d'une activité NOS ainsi que le rôle de cette enzyme chez la souche *S. xylosus* C2a (article 1). La seconde présente la diversité des NOS chez des souches de SCN isolées de viandes, ainsi que leur capacité à convertir la metmyoglobine en pigments rouges, l'oxymyoglobine et la nitrosomyoglobine (article 2). Enfin, une étude préliminaire visant à caractériser l'activité NOS de *S. xylosus*, après son expression hétérologue chez *Escherichia coli* constitue la troisième sous-partie.

La dernière partie est composée d'une discussion générale suivie d'une conclusion et des perspectives sur ce travail.

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

- CHAPITRE 1 - LES STAPHYLOCOQUES

A) GENERALITES

Le nom *Staphylococcus* provient du grec « Staphylê » (grappe de raisin) et « kókkos » (grain). Ces coques en amas furent observés en 1878 par Robert Koch dans le pus de furoncles. En 1881, Alexander Ogston et de façon concomitante Louis Pasteur, ont isolé des staphylocoques du pus et ont démontré l'implication de ces bactéries dans la survenue d'inflammation et de suppuration en inoculant du pus à des animaux sains. C'est ensuite, en 1884, qu'Anton Friedrich Julius Rosenbach décrira pour la première fois des colonies de staphylocoques qu'il attribuera à l'espèce *Staphylococcus aureus* en raison de leur couleur jaune caractéristique. La première espèce de staphylocoque venait d'être nommée.

Jusqu'à la fin des années 1990, les staphylocoques ont été classés dans la famille des *Micrococcaceae* avec le genre *Micrococcus* sur la base de quelques caractéristiques phénotypiques communes. Cependant, les staphylocoques diffèrent de cette famille par un contenu en bases GC de leur génome de 27 à 41% (versus 63 à 73%), un métabolisme anaérobie facultatif et des différences notables dans la composition de leur paroi. Les staphylocoques sont maintenant classés dans la famille *Staphylococcaceae* avec les genres *Jeotgalicoccus*, *Macrococcus*, *Nosocomiicoccus* et *Salinicoccus*. Cette famille appartient au vaste phylum des Firmicutes, à la classe des *Bacilli* et à l'ordre des *Bacillales*. Ainsi, le genre *Staphylococcus* est proche des genres *Bacillus* et *Listeria* (www.bacterio.net).

Les staphylocoques sont des coques à Gram positif à bas GC %. Ces coques d'un diamètre moyen de 0,8 à 1µm se divisent selon trois plans désordonnés formant des amas irréguliers en forme de grappe. A l'observation au microscope, ils peuvent apparaître isolés, en diplocoques, en chaînette courte ou de manière plus caractéristique en amas. Ils sont non mobiles et asporulés. Selon la « List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature » (www.bacterio.net) corrigée sur la base de la littérature disponible (Baba *et al.* 2009), le genre *Staphylococcus* inclut actuellement 50 espèces dont 11 sont divisées en sous espèces (de 2 à 4) ce qui fait un total de 64 entités répertoriées (Tableau 1). Des hybridations ADN-ADN inter espèces ont permis d'établir des liens de parenté entre des espèces de staphylocoque et de les répartir dans des groupes d'espèces (Kloos *et al.* 1991). Une phylogénie établie à partir des séquences d'ADN des gènes codant l'ARNr 16S montre que toutes les espèces sauf 2 peuvent

être regroupées au sein de 9 groupes d'espèces identiques à ceux initialement déterminés par les hybridations ADN-ADN (Figure 1).

Toutes les espèces sont catalase positives et aéro-anaérobies facultatives à l'exception de deux, *S. saccharolyticus* et *S. aureus* subsp. *anaerobius* qui sont catalase négatives et anaérobies. A l'exception des espèces du groupe *S. sciuri*, elles sont toutes oxydase négatives. Les staphylocoques sont des bactéries très halotolérantes et peuvent croître en présence de 10% de sel (NaCl). Leur croissance est possible dans une large gamme de température allant de 18 à 40°C. Ils peuvent utiliser les carbohydrates et/ou acides aminés comme source de carbone et d'énergie. Pour la plupart des espèces, la fermentation du glucose conduit à la production d'acide lactique, tandis qu'en aérobiose, le glucose est converti en acide acétique et en CO₂ par le cycle de Krebs. Les staphylocoques sont sensibles à la lyse par la lysostaphine qui agit spécifiquement au niveau des ponts peptidiques riches en glycine de leur peptidoglycane, et résistants à l'action du lysozyme (Götz *et al.* 2006, Schleifer and Bell 2015).

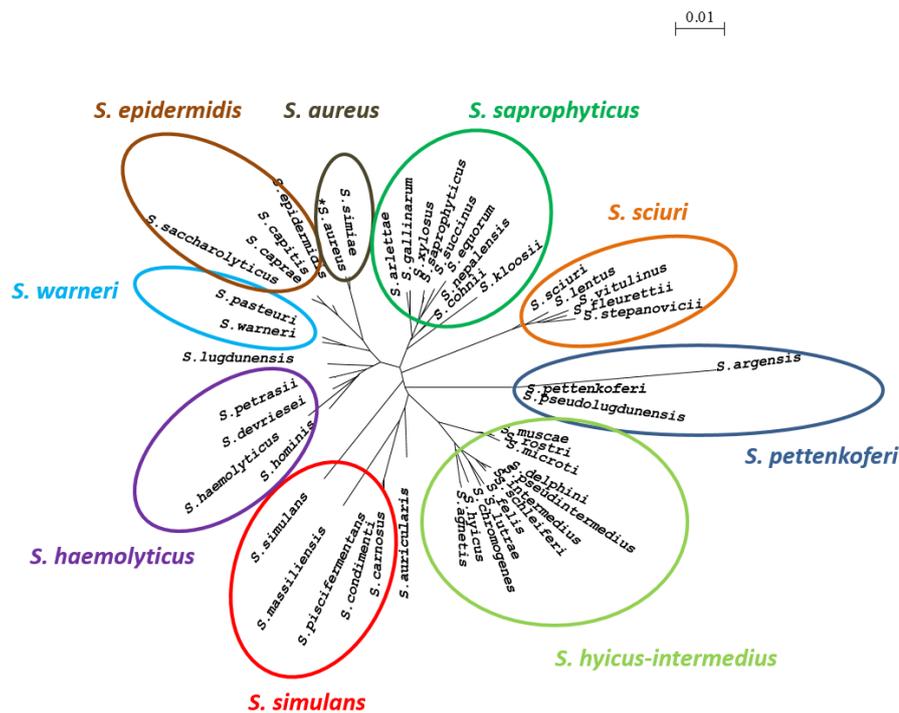


Figure 1. Arbre phylogénétique du genre *Staphylococcus* basé sur les séquences d'ADN du gène de l'ARNr 16S.

Les séquences disponibles (NCBI Database, *Staphylococcus*, rRNA, mars 2017) ont été alignées avec le logiciel Seaview (4.6) et la construction de l'arbre a été réalisée avec SplitsTree et la méthode du « Neighbour Joining » (NJ).

*Les espèces *S. argenteus* et *S. schweitzeri* ne figurent pas sur cet arbre, les séquences rDNA 16S étant 100% identiques à celles de *S. aureus*.

Tableau 1. Liste des espèces et sous-espèces du genre *Staphylococcus*

Espèces et sous-espèces	Coagulase	Novobiocine
<i>S. agnetis</i>	-	S
<i>S. argensis</i>	-	S
<i>S. argenteus</i>	+	S
<i>S. arlettae</i>	-	R
<i>S. aureus</i>	+	S
<i>S. aureus</i> subsp. <i>anaerobius</i>		
<i>S. aureus</i> subsp. <i>aureus</i>		
<i>S. auricularis</i>	-	S
<i>S. capitis</i>	-	S
<i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i>		
<i>S. capitis</i> subsp. <i>urealyticus</i>		
<i>S. caprae</i>	-	S
<i>S. carnosus</i>	-	S
<i>S. carnosus</i> subsp. <i>carnosus</i>		
<i>S. carnosus</i> subsp. <i>utilis</i>		
<i>S. chromogenes</i>	-	S
<i>S. cohnii</i>	-	R
<i>S. cohnii</i> subsp. <i>cohnii</i>		
<i>S. cohnii</i> subsp. <i>urealyticus</i>		
<i>S. condimenti</i>	-	S
<i>S. delphini</i>	+	S
<i>S. devriesei</i>	-	S
<i>S. epidermidis</i>	-	S
<i>S. equorum</i>	-	R
<i>S. equorum</i> subsp. <i>equorum</i>		
<i>S. equorum</i> subsp. <i>linens</i>		
<i>S. felis</i>	-	S
<i>S. fleurettii</i>	-	R
<i>S. gallinarum</i>	-	R
<i>S. haemolyticus</i>	-	S
<i>S. hominis</i>	-	
<i>S. hominis</i> subsp. <i>hominis</i>		S
<i>S. hominis</i> subsp. <i>novobiosepticus</i>		R
<i>S. hyicus</i>	+	S
<i>S. intermedius</i>	+	S
<i>S. kloosii</i>	-	R
<i>S. lentus</i>	-	R
<i>S. lugdunensis</i>	-	S
<i>S. lutrae</i>	+	S
<i>S. massiliensis</i>	-	S
<i>S. microti</i>	-	S
<i>S. muscae</i>	-	S
<i>S. nepalensis</i>	-	R
<i>S. pasteurii</i>	-	S

Tableau 1 (suite). Liste des espèces et sous-espèces du genre *Staphylococcus*

Espèces et sous-espèces	Coagulase	Novobiocine
<i>S. petrasii</i>	-	S
<i>S. petrasii</i> subsp. <i>croceilyticus</i>		
<i>S. petrasii</i> subsp. <i>jettensis</i>		
<i>S. petrasii</i> subsp. <i>petrasii</i>		
<i>S. petrasii</i> subsp. <i>pragensis</i>		
<i>S. pettenkoferi</i>	-	S
<i>S. piscifermentans</i>	-	S
<i>S. pseudintermedius</i>	+	S
<i>S. pseudolugdunensis</i>	-	R
<i>S. rostri</i>	-	S
<i>S. saccharolyticus</i>	-	S
<i>S. saprophyticus</i>	-	R
<i>S. saprophyticus</i> subsp. <i>bovis</i>		
<i>S. saprophyticus</i> subsp. <i>saprophyticus</i>		
<i>S. schleiferi</i>		S
<i>S. schleiferi</i> subsp. <i>coagulans</i>	+	
<i>S. schleiferi</i> subsp. <i>schleiferi</i>	-	
<i>S. schweitzeri</i>	+	S
<i>S. sciuri</i>	-	R
<i>S. sciuri</i> subsp. <i>carnaticus</i>		
<i>S. sciuri</i> subsp. <i>rodentium</i>		
<i>S. sciuri</i> subsp. <i>sciuri</i>		
<i>S. simiae</i>	-	S
<i>S. simulans</i>	-	S
<i>S. stepanovicii</i>	-	R
<i>S. succinus</i>	-	S
<i>S. succinus</i> subsp. <i>casei</i>		
<i>S. succinus</i> subsp. <i>succinus</i>		
<i>S. vitulinus</i>	-	R
<i>S. warneri</i>	-	S
<i>S. xylosus</i>	-	R

Les espèces de staphylocoque sont classées en deux grands groupes sur la base de la production d'une coagulase extracellulaire qui en activant la thrombine du plasma transforme le fibrinogène (soluble) en fibrine (insoluble). On distingue ainsi les staphylocoques à coagulase positive (SCP) et les staphylocoques à coagulase négative (SCN) (Tableau 1).

Les SCP se répartissent dans deux groupes d'espèces : *S. aureus* et *S. hyicus-intermedius* (Figure 1, Tableau 1). *S. aureus* est l'espèce la plus pathogène au sein du genre *Staphylococcus*. Elle est responsable d'infections variées, suppuratives ou liées à la production de toxines, le plus souvent d'origine nosocomiale. Elle est également responsable de toxi-infections alimentaires collectives (TIAC) qui surviennent après l'ingestion d'entérotoxines préformées dans l'aliment, suite à des conditions favorables à une multiplication importante de souches de *S. aureus* enterotoxinogènes et favorables à la toxinogénèse (Le Loir *et al.* 2003, Le Loir and Gautier 2009).

Les SCN se retrouvent dans neuf groupes d'espèces (Figure 1) et correspondent à 41 espèces et 22 sous espèces (Tableau 1). Au sein des SCN, quelques espèces ont une résistance intrinsèque à la novobiocine (p. ex. *S. saprophyticus*) (Tableau 1) (Götz *et al.* 2006). Ainsi les SCN forment un groupe hétérogène avec une grande diversité d'espèces. Les SCN sont des bactéries ubiquitaires, à la fois commensales de la peau et des muqueuses de l'Homme et l'animal mais également retrouvées dans l'environnement. Deux espèces sont fréquemment isolées en milieu hospitalier et sont très impliquées dans les infections d'origine nosocomiale, *S. epidermidis* et *S. haemolyticus*. Deux autres espèces sont impliquées dans des infections communautaires, *S. saprophyticus* qui provoque des cystites chez les jeunes femmes et *S. lugdunensis* responsable d'endocardites infectieuses (Becker *et al.* 2014). Les autres espèces ne sont associées à des infections opportunistes que de manière anecdotique. Les SCN sont fréquemment associés aux communautés microbiennes endogènes des aliments (Irlinger 2008, Coton *et al.* 2010, Leroy *et al.* 2010). Chez certaines espèces, il a été montré la présence de facteurs de risques potentiels chez quelques souches hébergeant des gènes codant des entérotoxines et capables de les produire *in vitro*. Cependant, à ce jour, aucun cas de TIAC incriminant des SCN n'a été rapporté (Leroy *et al.* 2016).

B) LES STAPHYLOCOQUES A COAGULASE NEGATIVE DANS LES ALIMENTS

Les SCN sont ubiquitaires et commensaux de la peau et des muqueuses des animaux d'élevage animal, c'est donc tout naturellement qu'on les isole fréquemment à partir de produits d'origine animale. Très halotolérants, ils sont également retrouvés dans les aliments saumurés.

1) Les produits carnés

Les SCN constituent la deuxième population bactérienne dans les produits carnés fermentés nonensemencés avec des ferments, derrière les bactéries lactiques, pouvant atteindre des concentrations jusqu'à 10^7 UFC/g (Talon and Leroy 2014). L'identification des SCN dans les produits carnés fermentés français, tel que le saucisson sec, a révélé une dominance des espèces *S. equorum*, *S. saprophyticus*, *S. xylosus* et *S. succinus* (Coton *et al.* 2010, Leroy *et al.* 2010). Dans les produits carnés fermentés espagnols, *S. equorum* apparaît comme une espèce dominante du « chorizo » (Fonseca *et al.* 2013), tandis que *S. xylosus* a été retrouvé comme dominant dans le « fuet » et *S. carnosus*, *S. epidermidis* et *S. warneri* ont été retrouvés avec un pourcentage variable en fonction du type de salaison (Aymerich *et al.* 2003). Dans le salami, *S. xylosus* et *S. saprophyticus* ont été retrouvés comme espèces majoritaires (Pisacane *et al.* 2015). Dans une autre étude, la dominance des espèces *S. equorum*, *S. saprophyticus*, *S. succinus* et *S. carnosus* était identifiée dans du salami (Połka *et al.* 2015). Enfin, dans les saucissons grecques, *S. xylosus* a été retrouvé comme espèce dominante avec *S. saprophyticus* et *S. simulans* (Drosinos *et al.* 2005). Les SCN sont également très présents dans des produits salés et séchés. Dans le jambon cru ibérique, *S. xylosus* a été identifié comme espèce majoritaire tout au long du procédé de fabrication (Rodríguez *et al.* 1994, Vilar *et al.* 2000). Une étude a montré que la saumure utilisée pour la préparation du jambon cru ibérique représentait la principale source des staphylocoques, avec *S. xylosus* représentant 29% des isolats (Cordero and Zumalacárregui 2000). La kitoza est un produit traditionnel malgache à base de viande de porc ou de bœuf, séchée ou fumée. Parmi les 9 espèces de SCN identifiées, *S. saprophyticus* représentait l'espèce majoritaire dans ces différentes préparations excepté pour la viande de porc fumée où une co-dominance de *S. equorum*, *S. saprophyticus*, *S. succinus* et *S. epidermidis* a été observée (Ratsimba *et al.* 2017). Mais les SCN sont également

isolés dans des produits à base de viande fraîche. Ainsi, dans des saucisses fraîches de porc nonensemencées, *S. xylosus* représentait 48% des isolats suivi par *S. equorum* (24%), *S. pasteurii* (13%) et *S. warneri* (9%) (Cocolin *et al.* 2004, Rantsiou *et al.* 2005). Une approche haut-débit de pyroséquençage de l'ADN 16S a permis de révéler la présence de SCN dans les communautés microbiennes d'échantillons de viande fraîche, steaks hachés de bœuf ou de veau, et saucisses de volaille (Chaillou *et al.* 2015). Les OTUs (Operational Taxonomic Unit) identifiées correspondaient à *S. cohnii* (ou *S. arlettae*), *S. epidermidis* (*S. capitis*), *S. equorum*, *S. haemolyticus*, *S. lentus* (*S. sciuri*), *S. saprophyticus* (*S. xylosus*) et *S. warneri* (Chaillou *et al.* 2015).

2) Les produits laitiers

Les communautés microbiennes d'affinage qui colonisent la surface de différents fromages à pâte molle, à pâte persillée ou à pâte cuite, contiennent généralement des staphylocoques. En effet, des SCN sont présents dans 78% des échantillons de croûte de fromage (Irlinger *et al.* 2015). Les staphylocoques appartenant aux espèces *S. equorum*, *S. vitulinus* et *S. xylosus* deviennent majoritaires en surface des fromages à pâte molle en fin d'affinage (Irlinger *et al.* 1997, Irlinger 2008). En début d'affinage, les SCN sont par contre minoritaires au regard des bactéries corynéformes (Brennan *et al.* 2002). Coton *et al.* (2010) ont montré que les SCN isolés à partir d'une large diversité de fromages français appartenaient majoritairement aux espèces *S. equorum* (23,4%), *S. xylosus* (20,3%), *S. succinus* (10,6%) et *S. saprophyticus* (10,1%). Outre Atlantique, *S. saprophyticus* (40%), *S. xylosus* (30%) et *S. sciuri* (20%) constituent les espèces dominantes du « Minas Frescal », un fromage frais brésilien (Casaes Nunes *et al.* 2016). Les espèces *S. equorum* (12%), *S. lentus* (12%), *S. simulans* (12%), *S. sciuri* (10%) et *S. xylosus* (9%) ont été fréquemment isolées à partir de lait cru et de fromages italiens (Ruaro *et al.* 2013). *S. equorum* et *S. saprophyticus* ont été identifiés comme majoritaires dans une usine de production laitière au Portugal (Soares *et al.* 2011). Une approche haut-débit de pyroséquençage de l'ADN 16S réalisée sur 12 variétés de fromages français a confirmé que des SCN font partie des communautés microbiennes des croûtes de fromage (Dugat-Bony *et al.* 2016). Dans cette étude, seules les espèces *S. equorum* et *S. vitulinus* ont été identifiées.

3) Les produits de la mer

Les SCN sont, avec les *Bacillus*, les bactéries majoritairement isolées du Lanhouin, une préparation à base de « Cassava fish » fermenté que l'on utilise comme condiment au Bénin, Togo et Ghana. Deux espèces dominaient et étaient retrouvées tout le long du processus de fermentation de ce poisson, les espèces *S. lentus* (51.2%) et *S. xylosus* (34.1%) (Anihouvi *et al.* 2007). Dans le « jeotgal », un produit Coréen fabriqué à partir de fruits de mer fermentés, les SCN constituent les espèces majoritaires avec une prédominance de *S. equorum* (Jeong *et al.* 2014a). Une approche haut-débit de pyroséquençage de l'ADN 16S a permis de révéler la présence de SCN dans les communautés microbiennes d'échantillons de filets de saumon frais ou fumé, de cabillaud frais et de crevettes cuites (Chaillou *et al.* 2015). Les OTUs identifiées dans tous ces produits correspondaient aux espèces *S. cohnii* (ou *S. arlettae*), *S. epidermidis* (*S. capitis*), *S. equorum*, *S. haemolyticus*, *S. lentus* (*S. sciuri*), *S. saprophyticus* (*S. xylosus*) et *S. warneri* (Chaillou *et al.* 2015).

4) Les produits dérivés du soja

Une étude publiée par Jeong *et al.* (2014b) a montré une dominance des SCN dans le « meju » et le « doenjang », deux produits fermentés traditionnels Coréens à base de graines de soja mélangées à de la saumure. Les SCN isolés de ces produits appartenaient aux espèces *S. saprophyticus* (60%), *S. xylosus* (23%) et *S. succinus* (17%).

- CHAPITRE 2 – PROPRIETES FONCTIONNELLES DES STAPHYLOCOQUES UTILISES COMME FERMENTS

Malgré la grande diversité des staphylocoques présents dans les produits carnés, seules deux espèces sont utilisées comme ferments, *S. xylosus* et *S. carnosus*.

A l'échelle industrielle, l'utilisation de ferments permet de maîtriser la fermentation, d'assurer les qualités sensorielles et la sécurité des produits. Les ferments utilisés pour la fermentation des produits carnés sont en général formés par un mélange de bactéries lactiques (*Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus curvatus* et/ou *Pediococcus pentosaceus*) et de staphylocoques (*S. xylosus* et/ou *S. carnosus*) (Leroy *et al.* 2006, Talon and Leroy 2014). Ces ferments sontensemencés dans la mûlée à des concentrations de 10^6 UFC/g.

Les composants de la mûlée, essentiellement les glucides ajoutés, les lipides et les protéines, vont servir de substrats au développement et à la survie de ces ferments. La dégradation de ces substrats par ces deux espèces va générer des métabolites qui vont contribuer au développement de la saveur des saucissons (Leroy *et al.* 2006). De plus, *S. xylosus* et *S. carnosus* doivent s'adapter aux différentes conditions de stress rencontrées au cours de la fabrication des saucissons, comme le stress oxydant/nitrosant et osmotique (Vermassen *et al.* 2014, Vermassen *et al.* 2016a).

Ces ferments participent également au développement et à la stabilité de la couleur de ces produits. Cet aspect sera traité dans le chapitre 3.

A) LE METABOLISME DES SUBSTRATS CARBONES

1) Les glucides

Dans la mûlée, les principaux sucres ajoutés sont le glucose, le saccharose et/ou le lactose. Le métabolisme des glucides permet d'obtenir une acidification plus ou moins rapide et intense des produits, qui dépend de la nature et de la concentration du glucide utilisé (Arkoudelos and Nychas 1995). L'acidification a un rôle essentiel dans le développement de la saveur (Leroy *et al.* 2006). Ce sont principalement les bactéries lactiques qui produisent de l'acide lactique, les staphylocoques contribuant modérément à cette production (Montel *et al.* 1996). Le métabolisme des glucides est bien caractérisé chez les staphylocoques, notamment celui du

glucose, du saccharose et du lactose chez *S. xylosus* et celui du glucose et du lactose chez *S. carnosus*. Nous nous focaliserons sur ces trois principaux glucides utilisés dans la fabrication du saucisson.

1.1) Les systèmes de transport

S. xylosus et *S. carnosus* possèdent le potentiel génétique pour le transport et le métabolisme de 12 et 6 glucides, respectivement (Götz *et al.* 2006, Rosenstein *et al.* 2009) (Tableau 2). Ces glucides peuvent être transportés par deux systèmes de transport, le système PTS-dépendant et PTS-indépendant.

Tableau 2. Systèmes de transport des glucides chez *Staphylococcus xylosus* et *Staphylococcus carnosus*. Adapté de Götz *et al.* (2006) et Rosenstein *et al.* (2009). « + » transporteur présent, « - » transporteur non présent, « N.D » non déterminé. * : principaux sucres ajoutés dans la viande.

Sucres	<i>S. xylosus</i>		<i>S. carnosus</i>	
	PTS	Non PTS	PTS	Non PTS
Glucose*	+	+	+	+
Galactose	-	+	N.D	N.D
Fructose	+	N.D	N.D	N.D
Mannitol	+	N.D	+	N.D
Mannose	+	N.D	N.D	N.D
Tréhalose	+	N.D	+	N.D
Lactose*	-	+	+	+
Maltose	+	N.D	-	-
Saccharose*	+	N.D	-	-
Xylose	-	+	-	-
Ribose	-	+	N.D	+
Arabinose	-	+	-	-
Sorbitol	-	-	+	N.D

Le premier système est appelé PTS pour « phosphotransférase system ». Il est formé d'un complexe enzymatique constitué de 5 enzymes (EI, HPr, EIIA, EIIB et EIIC) qui permettent d'assurer la translocation membranaire et la phosphorylation des sucres (Brückner and Rosenstein 2006). Dans ce système, le phosphoénolpyruvate (PEP) est le donneur initial du groupement phosphate. Ce groupement phosphate est ensuite transféré en cascade, de l'enzyme EI à HPr puis à EIIA et à EIIB jusqu'au glucide, qui a été transloqué dans la cellule par l'intermédiaire de la perméase EIIC (Brückner & Rosenstein, 2006). Les enzymes EI et HPr sont des protéines cytoplasmiques solubles considérées comme les enzymes générales de ce système. Chez *S. xylosum* et *S. carnosus*, les gènes codant les protéines EI et HPr, *ptsI* et *ptsH* sont co-localisés (Eisermann *et al.* 1991, Jankovic *et al.* 2001, Kuroda *et al.* 2001, Zhang *et al.* 2003). Contrairement à EI et HPr, le complexe EII, composé de trois domaines protéiques, EIIA, EIIB, EIIC, et parfois d'un domaine EIID, est spécifique à un ou plusieurs substrats carbonés. Les domaines protéiques EIIA et EIIB sont deux domaines membranaires périphériques et hydrophiles de taille identique qui jouent un rôle de phosphotransférase. EIIC est le domaine transmembranaire qui catalyse le transport du sucre à travers la membrane. Le domaine EIID est un homologue du domaine EIIC (Brückner and Rosenstein 2006). Concernant le système PTS spécifique du glucose chez *S. carnosus*, deux gènes positionnés en tandem, *glcA* et *glcB*, ont été caractérisés (Christiansen and Hengstenberg 1999). Les protéines GlcA (IIA) GlcB (IIB) partagent 67% d'identité entre elles (Rosenstein *et al.* 2009). Elles utilisent le glucose comme substrat majoritaire, mais d'autres glucosides peuvent être assimilés par ces perméases (Christiansen and Hengstenberg 1999). Chez *S. carnosus*, le gène *glcT* est en amont de *glcA*. Chez cette espèce, une étude de l'activité de la protéine GlcT a montré qu'elle pouvait provoquer une anti-terminaison (Knezevic *et al.* 2000). Dans le génome de *S. xylosum*, deux gènes codant des perméases glucose spécifiques, le gène *ptsG* codant EIICBA et le gène SXYL_00253 codant EIIBC sont présents mais ils ne sont pas organisés en tandem (LN554884).

Le deuxième système est le système PTS-indépendant. Chez *S. xylosum* et *S. carnosus*, les gènes *glcU* et *glkA* ont été identifiés, permettant l'assimilation du glucose. Le glucose est transporté à travers la membrane par la perméase GlcU puis phosphorylé par la kinase GlkA (Wagner *et al.* 1995, Fiegler *et al.* 1999). Chez *S. xylosum* et *S. carnosus* le gène *gdh* codant une glucose déshydrogénase est en aval de *glcU* (Fiegler *et al.* 1999). L'enzyme Gdh permet la formation de gluconate à partir de glucose et est co-exprimée avec GlcU. Cette co-

expression laisse supposer que les bactéries utilisent deux voies métaboliques en parallèle pour produire de l'énergie à partir du glucose (Fiegler *et al.* 1999).

Le glucose peut être transporté par les deux systèmes chez *S. xylosus* et *S. carnosus* (Jankovic and Brückner 2002, Rosenstein *et al.* 2009). L'entrée du glucose dans la cellule dépend de sa concentration dans le milieu extracellulaire (Götz *et al.* 2006). La perméase GlcU est fonctionnelle quand il y a une forte concentration de glucose tandis que le système PTS spécifique du glucose le transporte préférentiellement quand il est en faible concentration dans le milieu extracellulaire (Götz *et al.* 2006). En matrice carnée, l'entrée du glucose se fait *via* le système PTS-indépendant chez *S. xylosus* C2a (Vermassen *et al.* 2016a).

Chez *S. xylosus*, quatre gènes *scr* permettent l'utilisation du saccharose (Brückner *et al.* 1993). Le gène *scrA* code une saccharose perméase composée des domaines EIIBC du système PTS. Une fois le saccharose-6-phosphate internalisé, il est clivé par une saccharose phosphate hydrolase (sucrase) codée par le gène *scrB*, donnant ainsi du glucose-6-phosphate et du fructose (Brückner *et al.* 1993). Le fructose est ensuite phosphorylé par une fructokinase codée par *scrK* (Jankovic and Brückner 2007). Les gènes *scrB* et *scrK* sont co-localisés et organisés en opéron. Le gène *scrA* est indépendant (Jankovic and Brückner 2007). L'expression des deux gènes *scrA* et *scrB* est induite par la concentration de saccharose présente dans le milieu. Cette régulation est sous la dépendance d'un répresseur codé par le gène *scrR*, localisé en amont du gène *scrB* (Gering and Brückner 1996). Chez *S. carnosus*, le saccharose n'est pas utilisé, cette espèce ne possède pas les gènes codant la voie d'utilisation de ce glucide (Rosenstein *et al.* 2009).

Chez *S. xylosus*, le lactose est assimilé, non phosphorylé, par une lactose perméase qui transporte les galactosides et les pentoses (Poolman *et al.* 1996). Le système comprend deux gènes *lacP* et *lacH* qui codent respectivement une lactose perméase et une β -galactosidase qui hydrolyse le lactose en glucose et galactose. Un gène régulateur *lacR* est positionné en amont de l'opéron et orienté de façon opposée à l'opéron *lacPH* (Bassias and Brückner 1998). Le transport du lactose est unique chez *S. carnosus* comparé aux autres staphylocoques, puisque il existe à la fois un système PTS-dépendant et PTS-indépendant (lactose permease) (Rosenstein *et al.* 2009).

1.2) Le catabolisme

Les deux principales voies de catabolisme du glucose chez les staphylocoques sont la voie d'Embden Meyeroff Parnas (EMP) ou glycolyse et celle des pentoses phosphates (PP) (Brückner and Rosenstein 2006). Cependant, dans des conditions de croissance en milieu complexe, environ 85% du glucose est catabolisé par la voie EMP. Le principal produit issu du métabolisme anaérobie du glucose est le lactate, bien que faiblement produit chez *S. xylosus* (Figure 2) (Brückner and Rosenstein 2006). L'acétate et le CO₂ sont les principaux produits issus du métabolisme aérobie du glucose. Les staphylocoques ont la capacité à s'adapter aux conditions d'oxygénation via la voie EMP, PP, du cycle de Krebs et leur chaîne respiratoire. La disponibilité des substrats carbonés dans le milieu environnant, conduit à un processus régulateur appelé répression catabolique du carbone (Götz *et al.* 2006). Ceci se traduit par la répression de gènes ou opérons permettant l'utilisation de source carbonée alternative. Chez les staphylocoques, la répression catabolique du glucose est assurée par un régulateur transcriptionnel CcpA (Brückner and Rosenstein 2006).

Chez *S. xylosus*, le saccharose est hydrolysé en fructose et en glucose-6-phosphate qui vont rejoindre la glycolyse (Brückner and Rosenstein 2006). Sous l'action d'une β -galactosidase (codée par *lacH*), le lactose est hydrolysé en galactose et en glucose qui va entrer dans la glycolyse. Le galactose est dégradé selon la voie de Leloir (Götz *et al.* 2006). Chez *S. carnosus*, le lactose peut être catabolisé selon deux voies, la voie de Leloir et celle du Tagatose 6-P (Rosenstein *et al.* 2009).

Le pyruvate généré par les diverses voies peut être catabolisé par les staphylocoques en composés volatils comme l'acétoïne, le diacétyle et l'acétaldehyde qui sont associés à des arômes de beurre et de produits laitiers (Sánchez Mainar *et al.* 2016). Cette production est très faible voire absente chez *S. xylosus* (Kloos and Schleifer 1986) mais possible chez *S. carnosus* (Schleifer and Fischer 1982).

En matrice carnée, *S. xylosus* consomme simultanément le glucose ajouté et le lactate présent qui sont métabolisés par la voie EMP et la voie PP (Figure 2) (Vermassen *et al.* 2016a). Le lactate (importé par une lactate perméase) est catabolisé en pyruvate par une lactate-quinone oxydoréductase. L'acétyl-CoA généré par la dégradation du glucose et du lactate peut alimenter le cycle de Krebs et une partie est catabolisée en acétate qui est excrété dans la matrice. Ce composé ayant un arôme de vinaigre peut contribuer à la saveur des produits

carnés. Les gènes codant une ATP synthase sont surexprimés conduisant à une alimentation énergétique nécessaire à *S. xylosus* (Vermassen *et al.* 2016a).

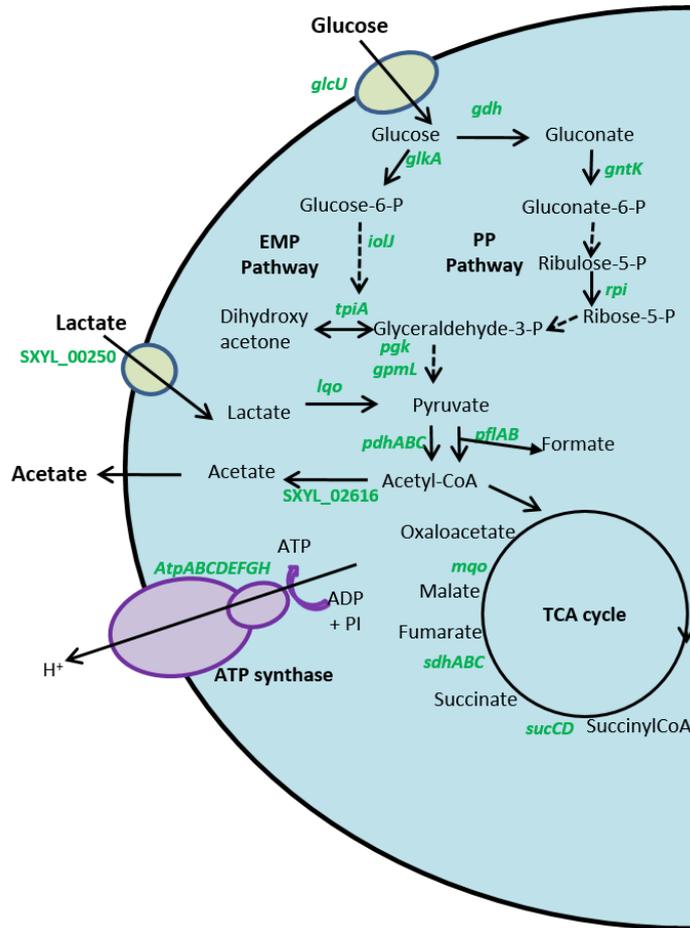


Figure 2. Le catabolisme du glucose et du lactate en matrice carnée chez *Staphylococcus xylosus*. En vert sont indiqués les gènes surexprimés. D'après Vermassen *et al.* (2016a)

2) Les nucléosides

Lorsque les substrats fermentescibles sont épuisés, les nucléosides peuvent servir de substrats énergétiques. Dans la viande, les nucléosides telles l'adénosine et l'inosine sont relarguées au cours de l'hydrolyse *post mortem* de l'ATP et peuvent atteindre des taux de l'ordre de 300 mg pour 100 g de muscle (Coconcelli 2007). Les nucléosides sont internalisés via des transporteurs et une partie de l'adénosine est convertie par une adénosine déaminase en inosine et en ammoniacque chez les bactéries lactiques (Chaillou *et al.* 2005, Rimaux *et al.* 2011). Sous l'action de nucléosides phosphorylases ou de nucléosides hydrolases, la partie nucléotidique va être séparée du ribose. Les produits formés sont l'adénine ou l'hypoxanthine et du ribose-1-phosphate via l'activité nucléoside phosphorylase ou du ribose via l'activité

nucléoside hydrolase (Chaillou *et al.* 2005, Rimaux *et al.* 2011). Le ribose peut alimenter la voie des pentoses phosphates et servir de source d'énergie quand les autres sources de carbone sont épuisées. Janssens *et al.* (2014) ont étudié le potentiel d'utilisation des nucléosides parmi 61 souches de SCN. L'étude a montré que toutes les souches, incluant les espèces *S. carnosus* et *S. xylosus*, sont capables d'utiliser l'adénosine et l'inosine en condition de laboratoire. Les génomes de *S. xylosus* et *S. carnosus* contiennent les gènes impliqués dans le transport et le métabolisme des nucléosides et donc sont donc potentiellement capables de dégrader les nucléotides (Figure 3). En matrice carnée, 14 gènes codant des enzymes impliquées dans le transport et le métabolisme de nucléotides sont surexprimés chez *S. xylosus* (Vermassen *et al.* 2016a). Parmi ces gènes, *pbuX* codant une xanthine perméase est surexprimé. La xanthine est issue de l'oxydation de l'inosine (Batlle *et al.* 2000, 2001).

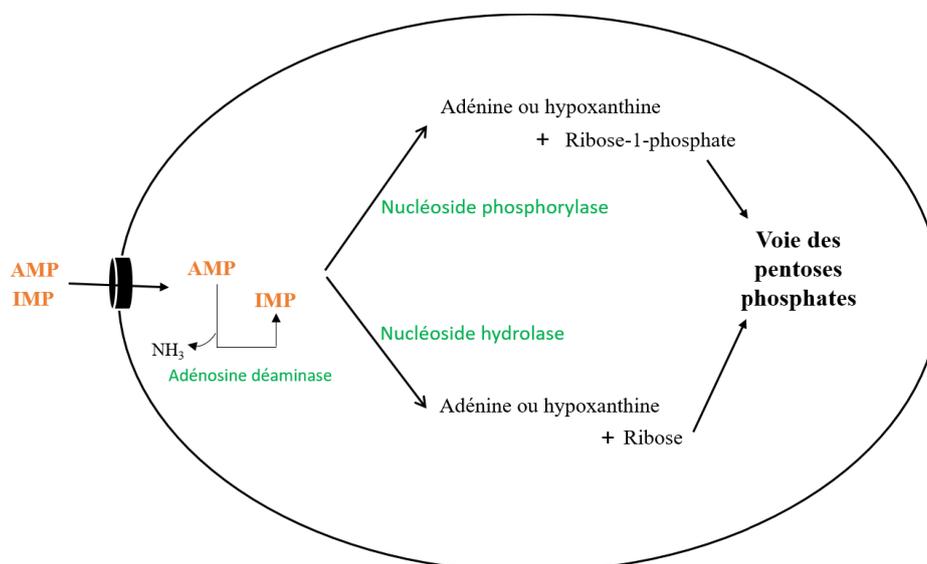


Figure 3. Le catabolisme des nucléosides par les staphylocoques. AMP : Adénosine monophosphate, IMP : Inosine monophosphate. D'après Sánchez Mainar *et al.* (2016)

B) LE METABOLISME DES PROTEINES ET ACIDES AMINES

La viande est composée d'environ 70% de tissu musculaire qui représente la principale source de composés azotés. Les protéines musculaires sont divisées en trois groupes : les protéines sarcoplasmiques (enzymes de la glycolyse, protéines des organites), les protéines myofibrillaires (actine et myosine) et les protéines du tissu conjonctif (collagène et élastine). Les protéines sont progressivement dégradées durant la fermentation et la maturation des

saucissons majoritairement sous l'action des protéases endogènes qui relarguent des peptides (Toldrá and Reig 2015). L'activité protéolytique des staphylocoques est faible (Miralles *et al.* 1996). Les peptides peuvent ensuite être dégradés par des peptidases endogènes et bactériennes qui vont libérer des acides aminés (Hughes *et al.* 2002). *S. xylosus* et *S. carnosus* utilisés comme ferment en association avec une bactérie lactique contribuent à l'enrichissement en acides aminés libres des saucissons (Hughes *et al.* 2002, Aro *et al.* 2010). *S. xylosus*ensemencé dans une matrice carnée surexprime 3 gènes codant des transporteurs de peptides et 4 gènes codant des peptidases (Vermassen *et al.* 2016a). Les peptides vont ainsi jouer un rôle clé dans la nutrition des bactéries.

1) Le catabolisme des acides aminés

Les acides aminés présents dans la mûlée de saucisson servent de sources azotées pour la croissance de *S. xylosus* (Vermassen *et al.* 2016a). En parallèle, certains acides aminés dont les acides aminés à chaîne latérale ramifiée peuvent être transformés en molécules odorantes de types aldéhydes, acides et alcools (Figure 4) (Talon *et al.* 2002). Le principal composé synthétisé par *S. xylosus* et *S. carnosus* est le 3-méthyl butanal dérivant du catabolisme de la leucine (Stahnke 1999). En phase stationnaire de croissance, les aldéhydes à chaîne latérale ramifiée sont convertis en acides carboxyliques correspondants. Les paramètres comme la température, le pH, la concentration en sel ou en nitrate/nitrite peuvent moduler le catabolisme de la leucine chez les staphylocoques et, par conséquent, la proportion en aldéhyde, alcool et acide. Une augmentation de la température de 15 à 25°C augmente la production d'acide 3-méthyl butanoïque et de 3-méthyl butanol tandis que celle de 3-méthyl butanal est diminuée chez *S. xylosus* et *S. carnosus* (Tjener *et al.* 2004, Olesen *et al.* 2004a). Une diminution de pH (6 à 5) augmente la production de 3-méthyl-butanol chez *S. xylosus* et *S. carnosus* (Olesen *et al.* 2004a, Ravyts *et al.* 2009). Une augmentation de la concentration en sel augmente la concentration de 3-méthyl butanal chez ces espèces alors qu'elle diminue la production d'acide 3-méthyl butanoïque et de 3-méthyl butanol (Tjener *et al.* 2004, Olesen *et al.* 2004a). Enfin chez *S. carnosus*, les nitrates et nitrites entraînent une diminution de la production de 3-méthyl butanal, d'acide 3-méthyl butanoïque et de 3-méthyl butanol (Masson *et al.* 1999).

2) Le catabolisme de l'arginine

L'arginine est présente en quantité de l'ordre de 6 mg pour 100 g de viande, et peut augmenter d'un facteur trois au cours de la fermentation (Aristoy and Toldrá 1998). Il existe deux voies

de catabolisme de cet acide aminé chez les SCN : la voie de l'arginine déiminase et la voie de l'arginase (Figure 5).

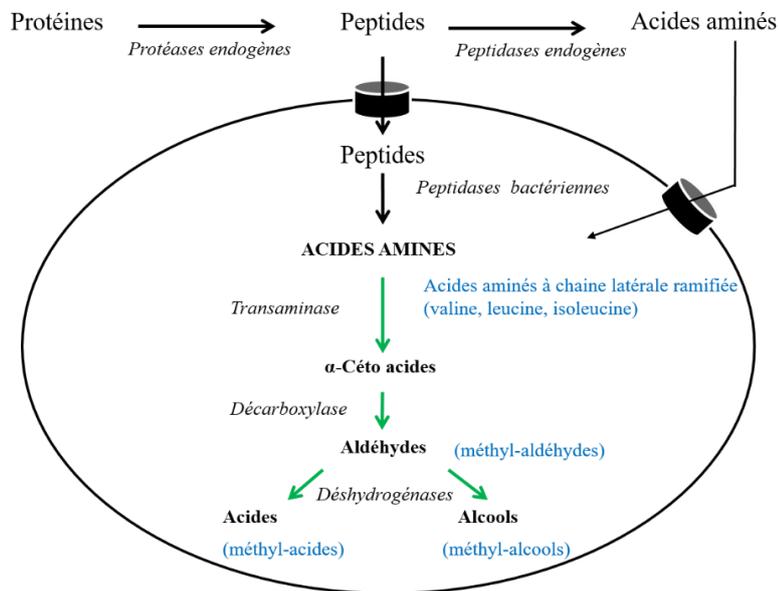


Figure 4. Le catabolisme des acides aminés à chaîne latérale ramifiée dans la viande par *S. xylosus*. Adapté de Vermassen (2014).

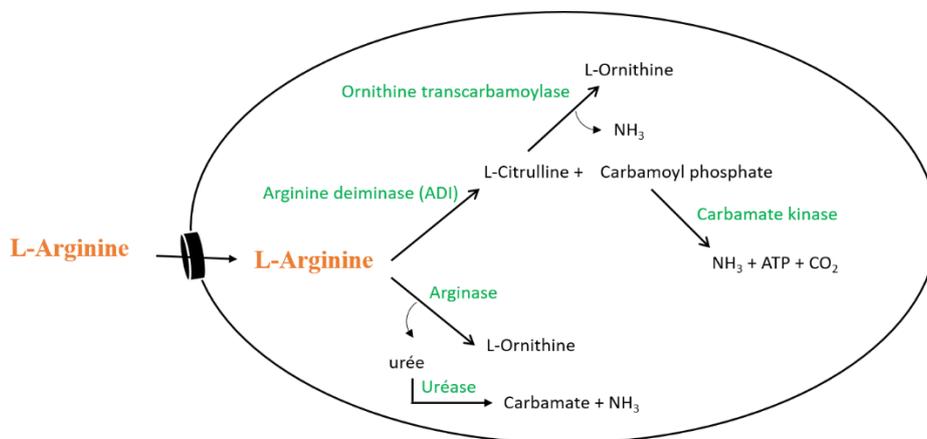


Figure 5. Le catabolisme de l'arginine chez les staphylocoques. D'après Sánchez Mainar et al. (2016)

2.1) La voie de l'arginine déiminase (ADI)

Cette voie enzymatique comporte trois réactions (Figure 5). L'arginine déiminase convertie l'arginine en citrulline et en carbamoyl phosphate. La citrulline est catabolisée en ornithine et en ammoniacque (NH_3) sous l'action de l'ornithine transcarbamoylase (OTC). En parallèle, le carbamoyl phosphate est catabolisé en dioxyde de carbone, NH_3 et en ATP *via* l'action de la carbamate kinase. Le NH_3 permet de lutter contre l'acidité générée par les bactéries lactiques

pendant la fermentation. Les enzymes de la voie ADI sont codées par les gènes *arc* où *arcA* code l'arginine déiminase, *arcB* code l'ornithine transcarbamoylase et *arcC* code la carbamate kinase. La voie de l'ADI semble être régulée à de multiples niveaux, mais tous les mécanismes ne sont pas totalement établis (Hall and Ji 2013). Cependant, chez *S. aureus*, il apparaît que la voie ADI est activée en condition anaérobie sous le contrôle d'ArcR (Makhlin *et al.* 2007). L'activité ADI est limitée quand la biomasse est faible due à un pH acide non favorable à la croissance des staphylocoques (Janssens *et al.* 2014), et les conditions aérobies provoquent un changement vers l'activité arginase chez certaines souches de staphylocoques (Sánchez Mainar *et al.* 2014). La voie de l'ADI est espèce- et souche-dépendante chez les SCN (Janssens *et al.* 2014). Alors que les gènes *arcA*, *arcB* et *arcC* étaient présents chez les 13 souches de *S. carnosus* caractérisées, le gène *arcA* n'était présent chez *S. xylosus* que chez 3 souches sur 13 (Sánchez Mainar *et al.* 2014). Ni la souche *S. xylosus* C2a (LN554884) ni les deux autres souches de *S. xylosus* séquencées (NZ_CP008724.1 et NZ_CP007208.1) ne possèdent le gène *arcA* alors que ce gène est présent chez *S. carnosus* TM300 (Rosenstein *et al.* 2009).

2.2) La voie arginase

L'arginase est une enzyme qui catalyse la transformation d'arginine en ornithine et en urée. L'arginase a été identifiée chez *S. xylosus* C2a (Planchon *et al.* 2009). Comme pour la voie ADI, le potentiel arginase chez les SCN est espèce et souche-dépendant. Le gène *arg* était absent chez les 13 souches de *S. carnosus* testées mais présent dans 12 souches sur 13 de *S. xylosus* (Sánchez Mainar *et al.* 2014). L'urée, sous l'action d'une uréase, va conduire à la formation de carbamate et d'ammoniaque. Ce dernier peut neutraliser l'environnement acide, contribuant à la survie des SCN dans les produits carnés. Le génome de *S. xylosus* C2a contient l'opéron *ureABCDEFG* codant l'uréase. *S. xylosus* C2a est capable d'utiliser l'ammoniaque comme seule source d'azote (Vermassen *et al.* 2016a) tandis que *S. carnosus* n'a pas ce potentiel.

C) LE METABOLISME DES LIPIDES ET ACIDES GRAS

1) La lipolyse

La lipolyse correspond à l'hydrolyse partielle ou complète des esters liés aux triglycérides et aux phospholipides. Elle entraîne l'augmentation de la concentration des acides gras libres et des diglycérides. Les lipides sont majoritairement hydrolysés par des lipases tissulaires. Il existe deux types de lipases endogènes : les triglycérides lipases, présentes dans le muscle et dans le tissu adipeux qui sont actives sur les triglycérides, et les phospholipases qui hydrolysent les phospholipides et dont le pH optimum est situé à 5,5 (Shadbolt *et al.* 2001). L'activité lipolytique n'a pas été observée chez *S. carnosus*. En revanche, *S. xylosus* possède une activité permettant la dégradation des lipides à longue chaîne en acides gras libres (Kenneally *et al.* 1998). Cette activité lipolytique est maximale à 30°C et à pH 7 (Talon *et al.* 2002). Cependant, la fermentation a généralement lieu à des pH compris entre 5 et 5,8 et à des températures comprises entre 18 et 25°C, ce qui minimise probablement l'activité lipolytique de *S. xylosus* (Talon *et al.* 2002). Chez *S. xylosus*, deux lipases ont été décrites : SXL et GehM (Mosbah *et al.* 2005, Sakinc *et al.* 2005). La lipase SXL dans sa forme mature ne montre que 53% de similarité avec GehM mais 99,7% avec la lipase de *S. simulans* (Mosbah *et al.* 2005). Cette lipase n'est pas induite par la présence d'acides gras à chaînes longues ou courtes. Elle est monomérique, a une masse moléculaire de 43 kDa et est excrétée dans le milieu de culture. De plus, elle est thermostable et son activité est maximale à 45°C. SXL s'est avérée être la lipase staphylococcique la plus active sur une émulsion de trioléine, un lipide composé de longues chaînes d'acides gras (Mosbah *et al.* 2005). La lipase GehM a été beaucoup moins caractérisée. Elle est thermostable et son activité est maximale à pH 9 et 42°C (Brod *et al.* 2010). L'expression du gène *gehM* est réduite lorsque le contenu en triglycéride dans un milieu de culture augmente (Iacumin *et al.* 2007).

2) Le catabolisme des acides gras

L'oxydation des acides gras dans la viande est responsable de la production de nombreux composés aromatiques, mais ces composés, en excès, peuvent altérer les qualités sensorielles des produits. L'oxydation des acides gras peut être enzymatique (β -oxydation) ou chimique (peroxydation) (Figure 6).

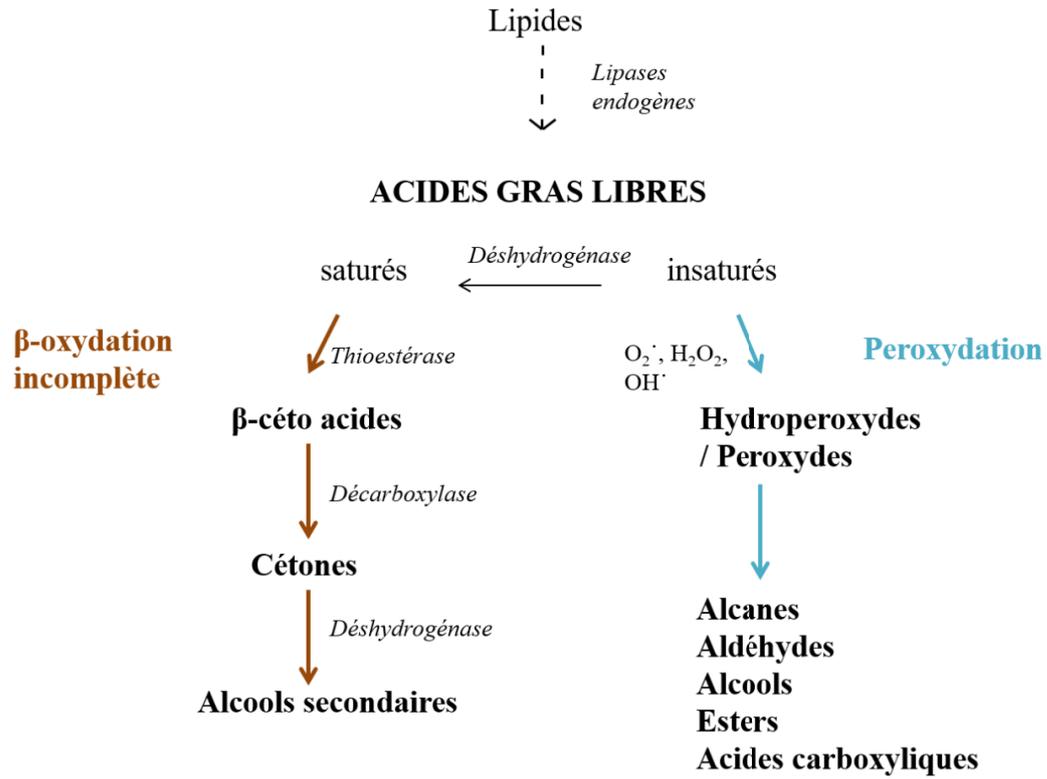


Figure 6. Le catabolisme des acides gras. Adapté de Vermassen (2014).

2.1) La β -oxydation

La β -oxydation est une succession de réactions enzymatiques qui dégrade les acides gras saturés en acide acétique par éliminations successives de groupement acétyl CoA. Au cours d'un cycle de β -oxydation incomplet, des intermédiaires du coenzyme A (esters) sont convertis en β -céto acides par une activité thioestérase, puis catabolisés en cétones sous l'action d'une décarboxylase, puis en alcools secondaires par effet d'une déshydrogénase (Figure 6). Il a été montré que l'inoculation de *S. carnosus* ou *S. xylosus* conduit à des saucissons enrichis en méthyl cétones (Montel *et al.* 1996). *S. carnosus* possède des activités de β -oxydation et thioestérase qui sont induites par des méthyl-esters de longues chaînes (Engelvin *et al.* 2000). Une activité décarboxylase a été mise en évidence chez *S. carnosus* durant toutes les phases de croissance (Fadda *et al.* 2002). La même étude a montré que l'oxygène, la présence de nitrate et un pH acide (de 5) peuvent augmenter la production de méthyl cétones. Fadda *et al.* (2002) ont également mis en évidence une β -oxydation et une activité décarboxylase chez *S. xylosus*.

2.2) La peroxydation

La peroxydation est une réaction chimique entre les composés actifs de l'oxygène ($O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , OH^{\cdot}) et les acides gras insaturés. Ce processus aboutit à des hydroperoxydes, substrats pour la formation d'autres radicaux (RO^{\cdot} , ROO^{\cdot}) qui se propagent par des réactions en chaîne pour former des peroxydes. La condensation de deux radicaux libres entraîne la formation de produits secondaires d'oxydation tels qu'aldéhydes, alcools, alcanes, esters et acides carboxyliques (Flores and Olivares 2015) (Figure 6). Les aldéhydes participent à l'arôme des salaisons, mais lorsqu'ils sont produits en excès, ils altèrent les propriétés sensorielles du produit en contribuant au rancissement (Morrissey *et al.* 1998). Il a été montré que différentes souches de *S. xylosus* inhibent l'oxydation des acides gras, comme l'acide linoléique, un acide gras insaturé libéré lors de la lipolyse (Talon *et al.* 2002). Cette inhibition résulte des activités antioxydantes de *S. xylosus* dont la superoxyde dismutase et la catalase (Barrière *et al.* 2001b).

2.2.1) La superoxyde dismutase

Les superoxydes dismutases (SODs) sont des métallo-enzymes, classées en fonction de leur cofacteur métallique. Ces enzymes catalysent la dismutation de l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) en

H₂O₂. *S. carnosus* et *S. xylosus* possèdent une seule SOD de type MnSOD contrairement à *S. aureus* qui possède deux SODs, SodA et SodM (Barrière *et al.* 2001a, Rosenstein *et al.* 2009). La SOD de *S. xylosus* et *S. carnosus* montre une grande similarité avec SodA de *S. aureus*. Chez *S. xylosus*, la SOD n'est pas inhibée par le peroxyde d'hydrogène, et le manganèse est nécessaire pour le maintien de son activité en phase stationnaire (Barrière *et al.* 2001a). En milieu riche, l'expression du gène *sodA* chez *S. xylosus* est induite en phase stationnaire de croissance (Barrière *et al.* 2001a). SOD n'est pas essentielle à la croissance en condition aérobie de *S. xylosus*, ce qui suppose la présence d'autres mécanismes de protection (Barrière *et al.* 2001a). Un mutant délété de ce gène a montré, en plus d'une perte totale d'activité SOD, un phénotype sensible aux hautes pressions en O₂ et au paraquat, une substance qui génère des radicaux superoxydes (Barrière *et al.* 2001a).

Chez *S. carnosus*, l'activité SOD varie en fonction de la phase de croissance et est significativement supérieure en phase stationnaire de croissance. Cette activité est très peu influencée par les facteurs environnementaux comme la condition d'oxygénation, la présence de nitrate ou de glucose (Barrière *et al.* 2001c). Toutefois, la présence de manganèse est indispensable au maintien de son activité (Barrière *et al.* 2001c).

2.2.2) Les catalases

Les catalases catalysent la transformation de l'H₂O₂ en eau et en oxygène. Ces enzymes jouent un rôle très important en réduisant la formation de radicaux hydroxyles hautement réactifs, qui résultent de la transformation de l'H₂O₂ via la réaction de Fenton (Jang and Imlay 2007). La plupart des staphylocoques sont catalase positifs. La majorité des staphylocoques possède une seule catalase comme *S. aureus* (Gaupp *et al.* 2012). Cependant, la souche *S. carnosus* TM300 en possède deux (Rosenstein *et al.* 2009), tout comme certaines souches de *S. xylosus*, *S. saprophyticus* et *S. equorum* (Blaiotta *et al.* 2010). Chez la souche *S. xylosus* C2a, trois catalases ont été identifiées (Planchon *et al.* 2009), LN554884. Les gènes codant ces trois catalases sont également présents dans les génomes des deux autres souches de *S. xylosus* séquencées (NZ_CP008724.1 et NZ_CP007208.1). La première des trois catalases mise en évidence est KatA (Barrière *et al.* 2002). Cette étude a montré que l'expression du gène *katA* est induite en phase stationnaire par l'oxygène et l'H₂O₂ et réprimée par le fer et le manganèse (Barrière *et al.* 2002). Le mutant de délétion du gène *katA* garde une importante activité catalase ce qui suggérait que la souche C2a possédait au moins une autre enzyme responsable de cette activité (Barrière *et al.* 2002). Par analyse des protéomes de *S. xylosus* C2a, deux

autres catalases ont été identifiées et nommées KatB et KatC (Planchon *et al.* 2007, Planchon *et al.* 2009). Ces trois catalases appartiennent au groupe des catalases monofonctionnelles. L'expression de ces catalases est modulée lors d'un stress nitrosant (Vermassen *et al.* 2014).

D) L'ADAPTATION AU STRESS

1) Le stress nitrosant/oxydant

Les staphylocoques disposent, en plus de SOD et catalases, d'autres mécanismes leur permettant de lutter contre les stress oxydant et nitrosant (Gaupp *et al.* 2012). Chez *S. aureus*, la catalase est le principal acteur de la dégradation de l' H_2O_2 mais une partie de cette dégradation est médiée par l'alkyl-hydroperoxyde réductase AhpC (Cosgrove *et al.* 2007). *S. xylosus* surexprime 12 gènes impliqués dans le mécanisme de protection et de détoxification des espèces réactives de l'azote et de l'oxygène (Vermassen *et al.* 2014). Parmi ces gènes, 3 codent des catalases : *katA* est sous-exprimé alors que *katB* et *katC* sont surexprimés. De plus, les gènes codant une alkyl-hydroperoxyde réductase (*ahpC*), une thiorédoxine réductase (*trxB*), une glutathione peroxydase (*bsaA*), une bactérioferritine (*bcp*) sont surexprimés. Le régulateur transcriptionnel PerR appartient à la famille du régulateur Fur dont l'activité dépend de la présence d'ions métalliques (Horsburgh *et al.* 2001b). PerR contient du fer ou du manganèse et fonctionne comme un répresseur qui se fixe sur des séquences d'ADN consensus appelées « PerR box » (Horsburgh *et al.* 2001a, Gaupp *et al.* 2012). Des séquences putatives de fixation de PerR ont été identifiées en amont des gènes *katB*, *katC*, *ahpC* et *trxB* chez *S. xylosus* C2a (Vermassen *et al.* 2014). En cas de stress nitrosant, le répresseur PerR est inhibé ce qui entraîne une activation des gènes impliqués dans la réponse au stress comme *katB*, *katC*, *ahpC* et *trxB* chez *S. xylosus* C2a (Figure 7) (Vermassen *et al.* 2014).

Dans la viande, en condition de stress nitrosant, *S. xylosus* répond notamment par l'activation de 17 gènes impliqués dans la captation du fer (Vermassen *et al.* 2014). Le fer peut être utilisé comme un nutriment pour la bactérie (Vermassen *et al.* 2016b), mais des taux intracellulaires élevés de fer libre sont toxiques (Vermassen *et al.* 2014). Le fer sous sa forme ferreux (Fe^{2+}) est un catalyseur de la peroxydation lipidique par interaction avec l' H_2O_2 , conduisant à la formation du radical OH^\cdot via la réaction de Fenton. Parmi les 17 gènes, la majorité est liée à la production ou à la reconnaissance des sidérophores (*sfa*, *hts*, *fhu*, *sst*). Le gène *fntA* codant une ferritine impliquée dans le stockage du fer est également surexprimé. Certains d'entre eux

(*htsA*, *sstA*, *fhuC*, *fhuD1*, *fhuD2*) sont sous la dépendance du régulateur Fur dont l'activité dépend également du fer. En cas de stress nitrosant, le répresseur Fur est inhibé ce qui entraîne une activation des gènes sous sa dépendance (Figure 7).

2) Le stress osmotique

L'osmotolérance est une des caractéristiques des staphylocoques (Kuroda *et al.* 2005). *S. carnosus* et *S. xylosus* sont équipés pour répondre à la présence de sel dans les produits carnés.

La réponse de *S. xylosus* à la présence de NaCl a été étudiée dans une mèche de viande (Vermassen *et al.* 2016a). Il répond en sous exprimant le gène *mscL* qui code un canal mécanosensible qui prévient l'efflux de soluté. Il met également en jeu différents mécanismes d'accumulation d'osmoprotectants et d'excrétion de Na⁺. Ainsi, *S. xylosus* surexprime deux systèmes de transport et de synthèse de la glycine bêtaïne, un osmoprotectant majeur. Le cluster *opuC(ABCD)* code un transporteur bêtaïne/carnitine/choline de type ABC qui permettrait le transport de la carnitine présente dans la viande et le gène *lcdH* code la L-carnitine déshydrogénase qui catabolise la carnitine en glycine bêtaïne. Les gènes *cudT* et *cudA* codent des enzymes impliqués dans l'acquisition de la choline et sa déshydrogénation en glycine bêtaïne. En parallèle, deux clusters *mnh* codant des systèmes antiporteurs Na⁺/H⁺ sont surexprimés par *S. xylosus* dans le modèle viande (Figure 7) (Vermassen *et al.* 2016a).

S. carnosus possède 9 systèmes liés à l'osmoprotection : 4 sont impliqués dans le transport de la proline dont deux sont aussi responsables du transport de la glycine bêtaïne (Rosenstein *et al.* 2009). Les autres transporteurs incluent trois transporteurs OpuD similaires à des transporteurs de glycine bêtaïne, un transporteur complexe pour la glycine bêtaïne/carnitine/choline et un système de déshydrogénation de la choline (Rosenstein *et al.* 2009).

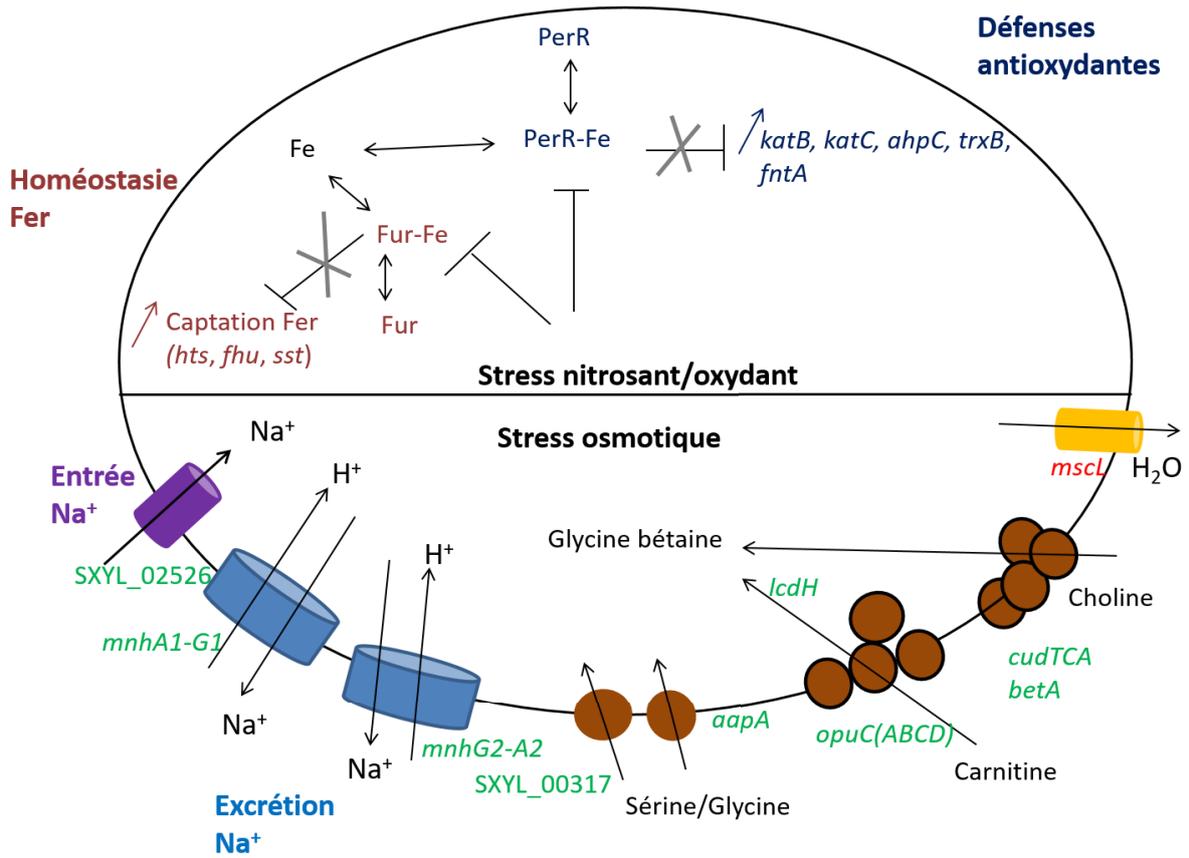


Figure 7. Principaux gènes exprimés par *S. xylosus* en réponse à un stress nitrosant/oxydant et à un stress osmotique en matrice carnée. D'après Vermassen *et al.* (2014 et 2016a)

- CHAPITRE 3 - DEVELOPPEMENT DE LA COULEUR ET ROLE DES STAPHYLOCOQUES

Comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent, les staphylocoques utilisés comme ferments ont de nombreuses propriétés fonctionnelles mais leur principale fonction dans les produits carnés est leur rôle dans le développement de la couleur typique de ces produits où il est d'usage de rajouter du nitrate ou du nitrite.

L'utilisation du nitrate et du nitrite en agro-alimentaire est appelée « curing », un terme qui signifie traiter ou restaurer. Dès le début du 19^{ème} siècle les propriétés du salpêtre (ou KNO_3) sont reconnues pour améliorer la préservation et assurer une couleur adéquate aux produits carnés. Fin du 19^{ème} siècle, Polenske (1891) a montré que le nitrate pouvait être réduit en nitrite sous l'action de microorganismes. Quelques années après, Lehmann (1899) et Kisskalt (1899) ont montré que seul le nitrite était responsable de la couleur rouge et stable de la viande. Puis, au début du 20^{ème} siècle, Hoagland (1910) a montré que l'acide nitreux (HNO_2) ou un métabolite comme le monoxyde d'azote (NO) était responsable de la formation de la couleur rouge. Depuis, le nitrate et le nitrite sont couramment ajoutés comme additifs dans le processus de fabrication de nombreux produits carnés.

Le nitrite est un composé toxique à forte dose, la toxicité du nitrate étant due à sa réduction en nitrite. Pour un homme de 70 kg, la dose orale létale moyenne est établie à 30 g de nitrate et 10 g de nitrite (Honikel 2008). De ce fait, leur addition est strictement réglementée. D'après les directives de 2006 (2006/52/EC) et de 2011 (N°1129 du 11 novembre 2011), l'ajout de 100 à 150 mg de nitrite par kg est autorisé pour les viandes transformées traitées thermiquement et de 150 mg de nitrite plus 150 mg de nitrate par kg pour celles non traitées thermiquement. Cependant, la quantité résiduelle de nitrite et/ou de nitrate dans du saucisson ou du jambon cuit est inférieure à 20 mg/kg.

La dégradation du nitrate et du nitrite dans les produits carnés est le résultat des activités enzymatiques des staphylocoques mais aussi de nombreuses réactions chimiques en interaction notamment avec les pigments de la viande. Ces réactions enzymatiques et chimiques dépendent du pH, de la concentration en pigment, du potentiel redox et de la température (Chasco *et al.* 1996).

A) LA MYOGLOBINE ET SES DIFFÉRENTES FORMES

La myoglobine est une protéine globulaire qui assure le stockage de l'oxygène dans le muscle (Ordway and Garry 2004). Cette protéine est formée d'une seule chaîne polypeptidique de 153 acides aminés à laquelle est liée une molécule d'hème, qui contient un atome de fer en son centre (Pegg and Honikel 2015).

La myoglobine existe dans la viande sous trois formes en fonction de l'état d'oxydo-réduction du fer (ferrique Fe^{3+} ou ferreux Fe^{2+}) et de l'oxygénation (Honikel 2008). Lorsque le fer de l'hème est à l'état ferreux et en absence d'oxygène, la myoglobine est présente sous la forme réduite de déoxy-myoglobine (MbFe^{2+}) de couleur pourpre (Figure 8A). En présence d'oxygène, le fer ferreux se lie à l'oxygène et la déoxy-myoglobine passe à la forme oxymyoglobine ($\text{MbFe}^{2+}\text{O}_2$), de couleur rouge (Figure 8A). Cependant, l'oxygène et d'autres agents oxydants comme les nitrites peuvent oxyder le fer ferreux en fer ferrique (Honikel 2008). Dans ce cas on assiste au passage de l'oxymyoglobine vers la metmyoglobine (MetMbFe^{3+}) de couleur marron (Figure 8A). Les trois formes : MbFe^{2+} , $\text{MbFe}^{2+}\text{O}_2$ et MetMbFe^{3+} existent de façon concomitante dans la viande (Honikel 2008). Dans un muscle *ante-mortem*, la forme metmyoglobine est très peu présente, mais son niveau augmente *post-mortem* due à la disparition d'oxygène (Honikel 2008). Chacune de ces trois formes présente un spectre d'absorbance caractéristique entre 400 et 700 nm (Figure 8B).

Le NO provenant de la réduction du nitrate et du nitrite est aussi capable d'interagir avec le fer ferreux de l'hème de la déoxy-myoglobine pour former la nitrosomyoglobine ($\text{MbFe}^{2+}\text{NO}$), un pigment de couleur rouge et stable, typique des produits de salaison (Figure 8B) (Sebranek and Bacus 2007, Honikel 2008). La nitrosomyoglobine a un spectre d'absorbance dont les maximums d'absorption chevauchent ceux de l'oxymyoglobine (Gøtterup *et al.* 2007).

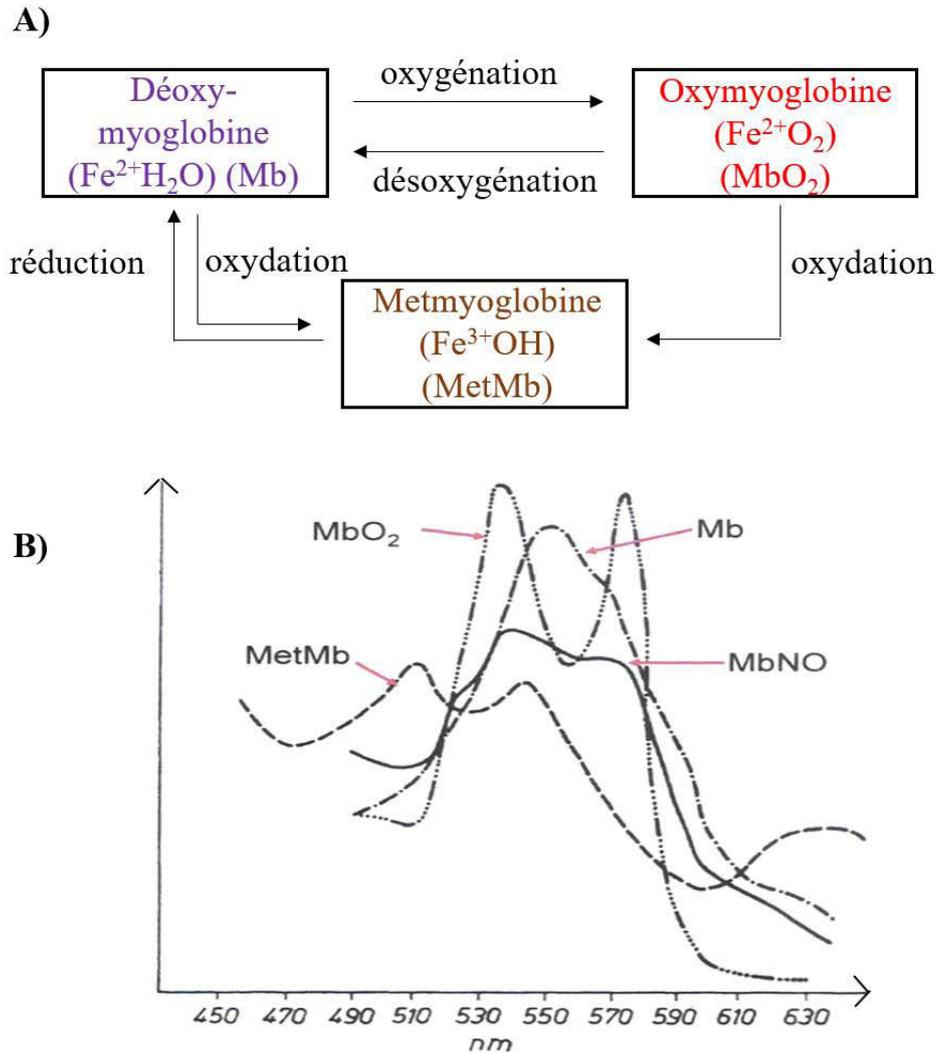


Figure 8. Les différentes formes de la myoglobine. A) Influence de l'état d'oxydo-réduction du fer de l'hème et de l'oxygénation sur les différentes formes de la myoglobine B) Spectres des différentes formes de la myoglobine. Mb : déoxy-myoglobine, MbO₂ : oxymyoglobine, MetMb : metmyoglobine, MbNO : nitrosomyoglobine. Honikel (2008).

B) LE ROLE DU NITRATE ET DU NITRITE SUR LA COULEUR

1) Les nitrates et nitrites dans la viande

Le nitrate ajouté dans la viande (sous forme de sel nitrate de potassium ou nitrate de sodium) va être réduit en nitrite (sel nitrité) sous l'action de la nitrate réductase des staphylocoques utilisés comme ferments. Le sel nitrité formé se dissout facilement du fait de sa solubilité à pH 5.5 dans l'eau contenue dans la viande (Honikel 2008). Dû à un pK de 3.37, il est attendu que 99% de l'acide nitreux (HNO₂) soit sous sa forme anionique NO₂⁻ à pH 5.5. Le nitrite va alors oxyder l'oxymyoglobine pour former de la metmyoglobine (Skibsted 2011). Cette

réaction est responsable du changement initial de couleur rouge vers marron qui survient durant les premières heures du processus de saumurage. Sous l'action d'un réducteur tel que l'acide ascorbique, la metmyoglobine est réduite à nouveau à l'état myoglobine (Skibsted 2011). La faible proportion d'acide nitreux (HNO_2) restante est en équilibre avec sa forme anhydre : le trioxyde d'azote anhydre (N_2O_3) (Honikel 2008). Ce dernier forme un état d'équilibre avec le NO et du dioxyde d'azote (NO_2), et le NO_2 peut réagir avec de l'eau. En somme, à partir de 2 molécules de HNO_2 , il est possible de former une molécule de HNO_3 et une molécule de HNO_2 et ainsi le système se réalimente (Figure 9) (Honikel 2008).

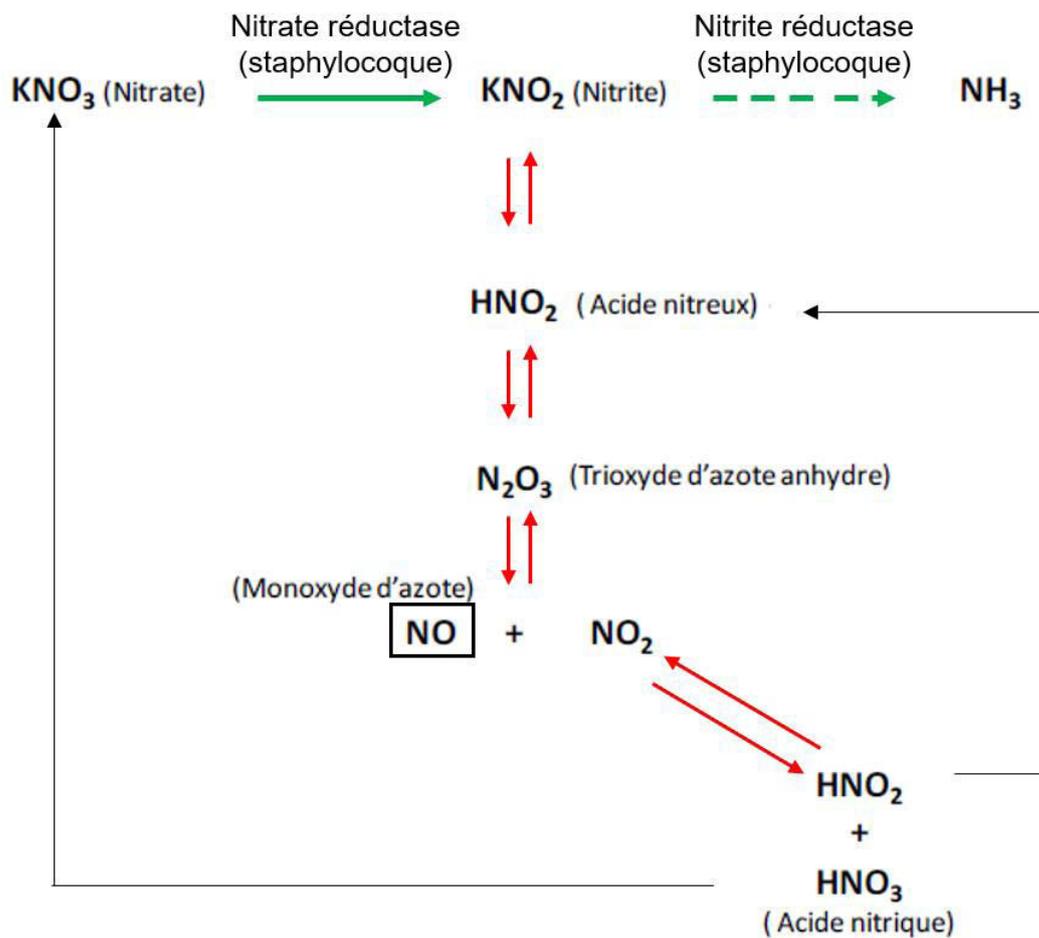


Figure 9. Schéma réactionnel simplifié du nitrate et du nitrite dans la viande. Vert : réactions enzymatiques, rouge : réactions chimiques. D'après Honikel (2008).

2) Le NO dans la viande

Le NO est une molécule diatomique radicalaire qui possède un électron célibataire, ce qui lui confère une forte réactivité à la fois sur des composés organiques et inorganiques. A l'inverse d'autres radicaux libres, le NO ne se dimérise et ne se dismute pas. Le NO est liposoluble, ce qui lui permet de traverser facilement les membranes cellulaires (Figuroa *et al.* 2013). En général, l'action du NO est locale et proche de son lieu de synthèse (Ignarro *et al.* 1993). Le NO peut être retrouvé sous différentes formes, NO ou ses dérivés, en fonction du potentiel d'oxydoréduction du milieu dans lequel il se trouve. Ainsi, dans la viande, le NO est capable de réagir avec l'oxygène, les groupements thiols (cystéines), les noyaux aromatiques (ex : tyrosine), les groupements amines, mais aussi avec des radicaux tel que l'anion superoxyde (O_2^-), et avec des métaux de transitions comme le fer. Quelques exemples de réaction du NO sont présentés dans le Tableau 3 et la Figure 10 (Skibsted 2011).

Tableau 3. Chimie du NO et ses dérivés : quelques exemples

NO ou dérivés	Interaction	Formation
Réaction avec l'oxygène et ses dérivés		
$\cdot\text{NO}$	O_2	$4 \cdot\text{NO} + O_2 + 2 H_2O \rightarrow 4 NO_2^- + 4H^+$
$\cdot\text{NO}$	$O_2^{\cdot-}$	$\cdot\text{NO} + O_2^{\cdot-} \rightarrow ONOO^-$
$ONOO^-$	CO_2	$ONOO^- + CO_2 \rightarrow ONOOCO_2^-$ $ONOOCO_2^- \rightarrow NO_3^- + CO_2$ $ONOOCO_2^- + 2 \cdot\text{NO} + H_2O \rightarrow 3 \cdot\text{NO}_2 + CO_3^{\cdot-} + 2 H^+$
$\cdot\text{NO}$	$\cdot\text{NO}_2$	$\cdot\text{NO} + \cdot\text{NO}_2 \rightarrow N_2O_3$
$\cdot\text{NO}$	H_2O_2	$\cdot\text{NO} + H_2O_2 \rightarrow H_2O + \cdot\text{NO}_2$
Réaction avec les groupements thiols		
$\cdot\text{NO}$	$R-S\cdot$	$\cdot\text{NO} + R-S\cdot \rightarrow R-SNO$
N_2O_3	$R-SH$	$N_2O_3 + R-SH \rightarrow R-SNO + H^+ + NO_2^-$
$ONOO^-$	$R-SH$	$ONOO^- + R-SH \rightarrow R-SOH + NO_2^-$
Réaction avec les métaux de transition		
$\cdot\text{NO}$	Hème- Fe^{2+} (Mb)	$\cdot\text{NO} + Mb \rightarrow \text{Hème-Fe}^{2+}\text{NO (MbNO)}$
$\cdot\text{NO}$	Hème- $Fe^{2+}O_2$ (MbO ₂)	$\cdot\text{NO} + MbO_2 \rightarrow \text{Hème-Fe}^{3+} \text{ (MetMb)} + NO_3^-$

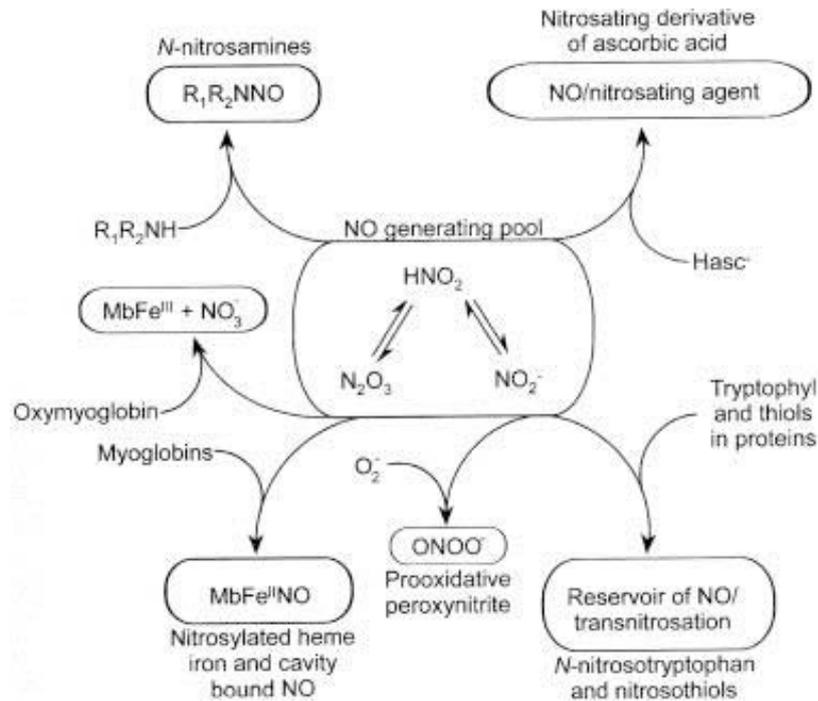


Figure 10. Réactions du NO avec les composés de la viande. Hasc- : ascorbate. Skibsted (2011).

2.1) Réaction avec l'oxygène et ses dérivés

Dans le cas d'une interaction avec l'oxygène (O_2), le NO est capable de former rapidement le dioxyde d'azote (NO_2). Cette molécule a un pouvoir oxydant et est capable de rapidement capter un électron pour former du nitrite (NO_2^-) (Lewis and Deen 1994). La réaction entre le NO et le NO_2 conduit à la formation de l'anhydride nitreux (N_2O_3).

Le NO peut aussi interagir avec l'anion superoxyde (O_2^-). Dans ce cas, la molécule formée est le peroxyne (ONOO $^-$) (Figure 10). Cette molécule peut facilement réagir avec le dioxyde de carbone (CO_2) et va dans 2/3 des cas se réarranger en nitrate (NO_3^-), le 1/3 restant donnant du NO_2 (Lancaster 2015). Le NO peut interagir directement avec le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) pour former de l'espèce NO_2 associée au relargage d'eau.

2.2) Réaction avec les acides aminés

2.2.1) Les groupements thiols

L'oxydation du groupement thiol (R-SH) d'une cystéine (constituant des protéines et du glutathion) par le NO_2 conduit à la formation d'un radical thiyle (R-S \cdot). La fixation covalente du NO sur le thiyle conduit à la formation de S-nitrosothiols (R-SNO) (Tableau 3). La conversion du groupement thiol vers un nitrosothiol est appelée S-nitrosation (Smith and

Marletta 2012). Le N_2O_3 réagit avec le groupement thiol conduisant à la formation de nitrosothiols et de nitrite (Møller *et al.* 2015). Les nitrosothiols agissent comme un réservoir de NO et pourraient le relarguer au cours du temps, notamment au cours du stockage et de la cuisson des produits carnés traités au nitrate/nitrite, et quand l'acide ascorbique est consommé (Figure 10) (Skibsted 2011).

La réaction du groupement thiol avec le peroxy-nitrite conduit à la formation d'acide sulfénique et de nitrite (Lancaster 2015).

2.2.2) Les noyaux aromatiques

Ce type de réaction appelé nitration est due à la réaction entre le peroxy-nitrite et le noyau aromatique d'un acide aminé comme la tyrosine. L'oxydation de la tyrosine par le peroxy-nitrite conduit à la formation d'un radical tyrosyl (\cdot Tyr), qui va évoluer vers la 3-nitrotyrosine après réaction avec le NO_2 (Lancaster 2015). La 3-nitrotyrosine augmente en cas de stress nitrosant dans la viande et pourrait être utilisée comme un marqueur de ce stress (Vossen and De Smet 2015).

2.2.3) Les amines

La réaction du N_2O_3 avec le groupement amine d'un acide aminé entraîne la formation de nitrosamines (Figure 10) (Skibsted 2011). Dans la viande, cette réaction a été montrée avec la proline qui conduit à la formation de nitrosoproline (Pegg and Honikel 2015). Cette dernière, après décarboxylation, évolue vers la nitrosopyrrolidine, une nitrosamine que l'on peut retrouver dans le bacon frit (Park *et al.* 2015).

2.3) Réaction avec l'acide ascorbique

L'acide ascorbique est classiquement ajouté au cours de la fabrication de produits carnés pour son rôle réducteur (Honikel 2008). La réaction du N_2O_3 avec l'acide ascorbique conduit, par une suite de réactions successives complexes, à la formation du 3-nitrosoascorbate (Skibsted 2011). Trois réactions semblent possible à partir de ce dernier : i) un clivage homolytique qui libère du NO et un radical ascorbyl, ii) une hydrolyse conduisant à la formation d'acide ascorbique et de nitrite et iii) un clivage qui conduit au déhydroascorbate et au NO (sous forme réduite) (Figure 10) (Skibsted 2011).

2.4) Réaction avec les métaux de transitions

La fixation du NO sur un métal de transition s'appelle une M-nitrosation (Zhang *et al.* 2016). Le NO peut se lier à la plupart des métaux de transition, mais la réaction du NO avec le fer hémique (ferrique Fe^{3+} ou ferreux Fe^{2+}) est la plus étudiée (Cooper 1999). L'affinité du NO est plus forte pour le fer ferreux que pour le fer ferrique. Dans le muscle, la fixation du NO au fer de l'hème de l'oxymyoglobine entraîne la formation de metmyoglobine et de nitrate (Figure 10) (Skibsted 2011). La fixation du NO au fer ferreux de l'hème de la myoglobine forme le complexe rouge et stable de nitrosomyoglobine typique des produits de salaison (Figure 10) (Sebranek and Bacus 2007, Honikel 2008).

C) LE CATABOLISME DES COMPOSES NITROSES PAR *S. XYLOSUS* ET *S. CARNOSUS*

S. xylosus et *S. carnosus* sont principalement utilisés dans les produits carnés fermentés pour leur contribution au développement de la couleur rouge, typique de ces produits. Les sels nitrates utilisés comme sels de saumurage sont réduits en nitrites par l'activité nitrate réductase de ces ferments. Le nitrate importé par la bactérie est réduit en nitrite. Ce dernier est excrété. Quand la concentration de nitrate devient limitante, le nitrite est réimporté et réduit en ammoniacque via la nitrite réductase. La nitrate réductase est une enzyme membranaire tandis que la nitrite réductase est cytosolique (Neubauer and Götz 1996). Le catabolisme du nitrate et du nitrite a été bien étudié chez *S. carnosus* (Neubauer and Götz 1996).

1) La nitrate réductase

1.1) L'opéron *nar*

Les gènes codant cette enzyme sont organisés en opéron, appelé l'opéron *nar*, pour les deux espèces *S. carnosus* et *S. xylosus* (Figure 11).

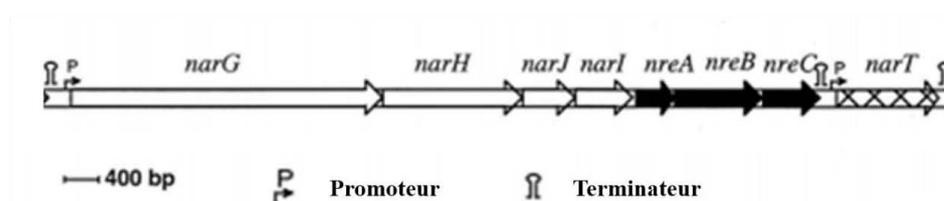
L'opéron *nar* a été particulièrement bien décrit chez *S. carnosus* TM300 (Pantel *et al.* 1998). Cet opéron est constitué de quatre gènes *narGHJI* qui se chevauchent et sont organisés en une seule unité transcriptionnelle (Pantel *et al.* 1998). Pour ces 4 gènes, une région promotrice putative est retrouvée 260 nucléotides en amont de l'opéron et une séquence putative de Shine-Dalgarno est présente en amont de la séquence codante. Cependant, le signal de

terminaison est absent à la fin de l'opéron (Pantel *et al.* 1998). Chacun des gènes code une sous-unité de la nitrate réductase, les sous-unités α , β , δ et γ , respectivement (Pantel *et al.* 1998).

Le gène *narG* code la grosse sous-unité α de l'enzyme (138,4 kDa) qui possède un site de liaison au cofacteur molybdène. Le gène *narH* code la sous-unité β (59,9 kDa) possédant 4 clusters [Fe-S] coordonnés par des cystéines et qui est impliquée dans le transfert d'électron. Le gène *narJ* code la sous-unité δ (22,6 kDa) indispensable à l'activité nitrate réductase. En effet, une mutation dans ce gène obtenue par insertion d'un transposon induit la perte de la capacité de *S. carnosus* à réduire les nitrates (Blasco *et al.* 1992). Le gène *narI* code la sous-unité γ (26,4 kDa) qui a 5 segments transmembranaires. Chez *S. carnosus*, un mutant obtenu par insertion d'un transposon dans ce gène montre aussi une perte de sa capacité à réduire le nitrate (Pantel *et al.* 1998). Un gène nommé *narT* situé en aval de l'opéron *nar* a été identifié chez *S. carnosus* (Fast *et al.* 1996, Fedtke *et al.* 2002). Chez *S. carnosus*, la protéine NarT est transmembranaire (42 kDa) mais son rôle n'est pas clairement déterminé. Il semble que NarT importe le nitrate et exporte le nitrite (Fast *et al.* 1996).

Il a été montré chez *S. carnosus* que l'expression de l'opéron *nar* est influencée par la présence d'oxygène (Pantel *et al.* 1998). Une diminution de l'oxygène associée à une densité cellulaire qui augmente, induit l'expression de l'opéron *nar*. La présence de nitrate induit aussi l'expression de cet opéron.

A)



B)

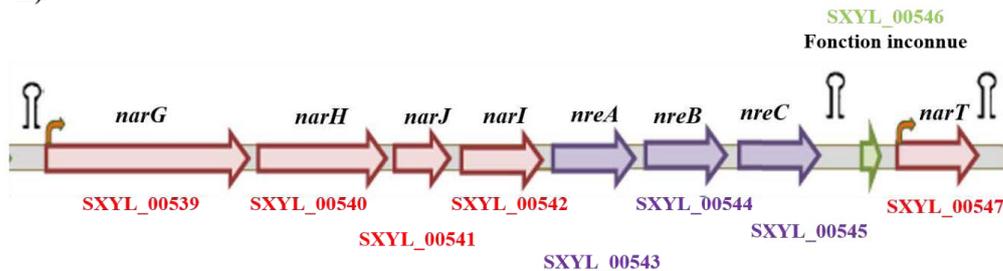


Figure 11. Cartographie de l'opéron *nar* et environnement génétique chez *S. carnosus* TM300 et *S. xylosus* C2a. A) *S. carnosus*, B) *S. xylosus*. D'après Fedtke *et al.* (2002), Vermassen (2014).

1.2) L'activité nitrate réductase

La capacité de réduire le nitrate chez les staphylocoques est assez répandue. Elle est cependant espèce- et souche-dépendante (Miralles *et al.* 1996, Mauriello *et al.* 2004, Casaburi *et al.* 2005, Gøtterup *et al.* 2007, 2008, Sánchez Mainar and Leroy 2015). Chez *S. carnosus*, toutes les souches sont capables de réduire le nitrate, la majorité d'entre elles (plus de 60%) montrant une activité nitrate réductase élevée (Sánchez Mainar and Leroy 2015). Ce potentiel est plus variable pour d'autres espèces, en particulier chez *S. xylosus* où environ 1/3 des souches ont une activité nitrate réductase élevée, 1/3 montre une activité modérée et le tiers restant montre peu ou pas d'activité nitrate réductase (Sánchez Mainar and Leroy 2015).

Gøtterup *et al.* (2007) et (2008) ont caractérisé l'activité nitrate réductase de souches de SCN, dont *S. carnosus* et *S. xylosus*, inoculées dans un milieu de laboratoire supplémenté en metmyoglobine et en nitrate ou dans un modèle de saucisson contenant du nitrate, en évaluant leur capacité à former de la nitrosomyoglobine.

L'activité Nar est modulée par plusieurs paramètres comme la présence du cofacteur molybdène (Maia and Moura 2015). Talon *et al.* (1999) ont montré que la synthèse de la nitrate réductase des souches appartenant à *S. carnosus* et à *S. xylosus* est dépendante de l'oxygène. La synthèse de l'enzyme est maximale en début de phase stationnaire en condition aérobie, tandis que celle-ci est maximale durant la phase exponentielle en condition statique. De plus, la synthèse de l'enzyme est fortement augmentée en présence de nitrate, surtout chez *S. carnosus* (Talon *et al.* 1999).

Dans une matrice carnée, le nitrate est réduit en nitrite par *S. xylosus* C2a (Vermassen *et al.* 2014). Dans cette même étude, l'opéron *nar* n'est pas différentiellement exprimé entre la condition avec et sans nitrate après 24h et après 72h d'incubation (Vermassen *et al.* 2014). Le dosage du nitrate dans la matrice carnée a montré qu'après 24h plus de 80% du nitrate a été consommé, ce qui peut expliquer pourquoi les gènes ne sont pas différentiellement exprimés dans les conditions de l'étude.

2) La nitrite réductase

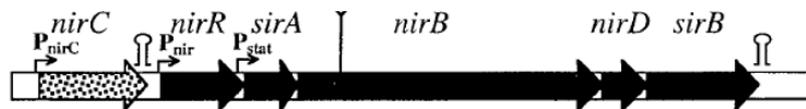
2.1) L'opéron *nir*

Comme pour la nitrate réductase, la nitrite réductase a été particulièrement bien décrite chez *S. carnosus* (Neubauer *et al.* 1999). Cette nitrite réductase montre des similarités avec la

nitrite réductase Nir de *Escherichia coli* et les nitrites réductases Yrh et Nas de *Bacillus subtilis* (Neubauer *et al.* 1999).

Chez *S. carnosus* et chez *S. xylosus*, les gènes *sirA*, *nirB*, *nirD* et *sirB* constituent l'opéron nitrite réductase (*nir*) (Neubauer *et al.* 1999, Vermassen 2014). Une région promotrice a été identifiée en amont de *sirA* chez *S. carnosus* (Figure 12) (Neubauer *et al.* 1999). Les gènes *nirB* et *nirD* codent respectivement les protéines NirB et NirD impliquées dans l'activité nitrite réductase. Chez *S. carnosus*, les protéines NirB et NirD sont essentielles et suffisantes pour la réduction du nitrite de façon NADH dépendante (Neubauer *et al.* 1999). Les gènes *sirA* et *sirB* codent respectivement les protéines SirA et SirB qui sont essentielles à la biosynthèse du groupement prosthétique de type sirohème servant de cofacteur (Spencer *et al.* 1993, Neubauer *et al.* 1999). SirA catalyse la méthylation *S*-adenosyl-méthionine-dépendante de l'uroporphyrinogène III en dihydrosirohydrochlorine, tandis que SirB est importante pour la déhydrogénation pyridine-dinucléotide-dépendante de la dihydrosirohydrochlorine en sirohydrochlorine.

A)



B)

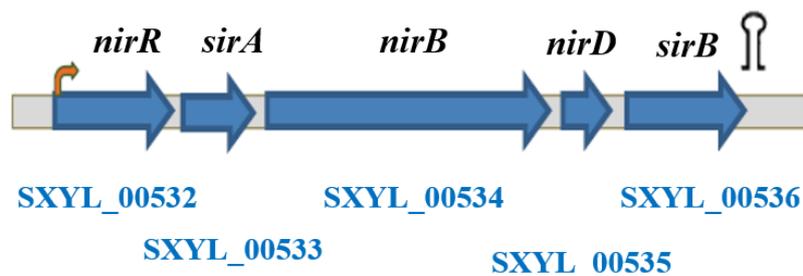


Figure 12. Cartographie de l'opéron *nir* et environnement génétique chez *S. carnosus* TM300 et *S. xylosus* C2a. A) *S. carnosus*, B) *S. xylosus*. D'après Neubauer *et al.* (1999), Vermassen (2014).

Chez *S. carnosus*, deux gènes sont en amont du gène *sirA* : *nirC* et *nirR* tandis que chez *S. xylosus* le gène *nirC* est absent (Vermassen 2014). Chez *S. carnosus*, la protéine NirC possède son propre promoteur et son propre terminateur et ne fait pas partie de l'opéron *nir* (Neubauer *et al.* 1999). Le rôle de NirC reste à définir. Le rôle de NirR est également mal défini mais il pourrait avoir un rôle de régulateur ou être impliqué dans l'assemblage du complexe *nir* (Neubauer *et al.* 1999).

La réduction du nitrite est régulée à différents niveaux chez *S. carnosus* (Neubauer *et al.* 1999). Le premier niveau de régulation se situe au niveau de la transcription. L'oxygène, sous la dépendance de protéines régulatrices, inhibe la transcription de l'opéron *nir* alors que la présence de nitrite favorise cette transcription. D'autres étapes comme la traduction, le repliement et l'assemblage des protéines du complexe et l'incorporation de groupes prosthétiques sont également sensibles à l'oxygène (Neubauer *et al.* 1999).

2.2) L'activité nitrite réductase

Différentes espèces de staphylocoques dont *S. carnosus* et *S. xylosus* sont capables de réduire le nitrite en ammoniacque (Hartmann *et al.* 1995). Götterup *et al.* (2007) ont également testé le potentiel nitrite réductase de 4 souches de *S. carnosus* et d'une souche de *S. xylosus*. Alors que toutes les souches de *S. carnosus* présentent une activité nitrite réductase, celle de *S. xylosus* n'en possède pas (Götterup *et al.* 2007).

La nitrite réductase chez *S. carnosus* est une enzyme cytosolique impliquée dans la régénération du NADH (Neubauer and Götz 1996). L'activité nitrite réductase a lieu en condition anaérobie et est induite par la présence de nitrate et de nitrite *in vitro* (Neubauer and Götz 1996).

3) La régulation des opérons *nar* et *nir*

Chez *S. carnosus* TM300, trois gènes situés en aval de l'opéron *narGHJI* et en amont du gène *narT* ont été identifiés et désignés *nreABC* (Figure 11) (Fedtke *et al.* 2002). Ces gènes sont aussi retrouvés chez *S. xylosus* C2a et sont organisés de la même façon que chez *S. carnosus*, à l'exception d'un gène de fonction inconnue situé entre le gène *nreC* et le gène *narT* (Vermassen 2014). Chez *S. carnosus*, le mutant de délétion *nre* est sévèrement impacté dans sa capacité à réduire le nitrate et le nitrite en aérobiose et anaérobiose du fait de la transcription réduite des opérons *nar*, *nir* et du gène *narT* (Fedtke *et al.* 2002).

Chez *S. carnosus*, la protéine NreB est le principal senseur d'oxygène. NreB et NreC fonctionnent comme un système senseur-régulateur où, en absence d'oxygène, l'activité d'autophosphorylation de l'histidine kinase cytoplasmique NreB augmente, la protéine NreC est ensuite phosphorylée par NreB et s'accroche spécifiquement aux promoteurs des opérons *nar* et *nir* pour augmenter leur transcription (Fedtke *et al.* 2002, Müllner *et al.* 2008).

Le rôle de la protéine NreA a été mis en évidence chez *S. carnosus* (Niemann *et al.* 2014, Nilkens *et al.* 2014). Il a été montré qu'en absence de nitrate, NreA interagit directement avec NreB et empêche son activité d'autophosphorylation, conduisant à la diminution de la transcription des gènes des opérons *nar* et *nir*. A l'inverse, en présence de nitrate, NreA forme un complexe avec le nitrate et ne peut plus inhiber NreB qui peut alors agir sur elle-même et phosphoryler NreC, ce qui active la transcription des gènes des opérons *nar* et *nir* (Nilkens *et al.* 2014).

En matrice carnée, le gène *nreB* chez *S. xylosum* C2a est fortement activé après 24 heures d'incubation (Vermassen *et al.* 2016a). Par conséquent, les gènes de l'opéron *nar*, *narT* et de l'opéron *nir* sont surexprimés à 24 heures et à 72 heures (Vermassen *et al.* 2016a).

D) LES ALTERNATIVES AUX NITRATES/NITRITES POUR LA FORMATION DE LA COULEUR

Les sels de nitrate et de nitrite sont classiquement ajoutés au cours de la fabrication des produits carnés, pour leur rôle clé dans la formation de la couleur rouge de ces produits (Pegg and Honikel 2015). Le nitrate et le nitrite jouent également un rôle dans le développement de la flaveur et dans le contrôle de la qualité microbiologique (Sindelar and Milkowski 2011). Cependant, ces composés présentent un risque lié à la formation de composés N-nitrosés tels que les nitrosamines, qui ont des propriétés cancérigènes (Honikel 2008). De ce fait, plusieurs alternatives au nitrate/nitrite ont été ou sont envisagées, en particulier, pour assurer le développement de la couleur. Toutefois, l'omission totale de ces additifs, sans une bonne connaissance technologique et sans modification du procédé de fabrication, résulte en une faible qualité sensorielle et microbiologique des produits (Hammes 2012).

1) Les extraits de plantes

Des extraits de plantes tels que des épices ou du jus de céleri contenant de façon naturelle du nitrate ont été testés (Schlüchter *et al.* 2000, Sebranek and Bacus 2007). La concentration en nitrate d'une poudre provenant d'un jus concentré de céleri est élevée (2,75 %) et son addition dans une mûlée en vue de la fabrication de saucissons résulte en une concentration en nitrite de 100 mg/kg (Sebranek and Bacus 2007). Les produits fabriqués par ces nouvelles pratiques sont catégorisés sous le terme « clean label food ». Le nitrate ajouté de façon « naturelle » est réduit en nitrite sous l'action de la nitrate réductase des staphylocoques.

L'addition de nitrate « naturel » à des produits carnés cuits nécessite aussi l'addition de staphylocoques pour le développement de la couleur ; ceci a entraîné des modifications de procédé, en particulier la température est maintenue 60 min à 42°C, permettant l'action des staphylocoques, avant la procédure habituelle de fabrication de ces produits (Sebranek and Bacus 2007).

Des essais basés sur une saumure contenant des extraits de plantes et un ferment staphylocoque, incubée pendant 12h à 38°C pour permettre la réduction du nitrate, ont été testés. Ces essais permettent d'obtenir du jambon cuit avec une couleur et un contrôle de l'oxydation des lipides similaires à celui traité avec du nitrite tout en ayant des taux résiduels plus faibles (Krause *et al.* 2011).

Le Comité Permanent de la Chaîne Alimentaire et de la Santé Animale (CPCASA) considère que lorsqu'il y a adjonction simultanée de ferments en présence d'extraits de plantes riches en nitrate, le nitrite produit grâce à l'activité de la nitrate réductase de ces ferments n'est pas considéré comme un additif. Par contre, si les extraits de plantes sont pré-incubés en présence de ferments avant d'être incorporés à la saumure, le nitrite produit est considéré comme un additif et donc soumis à la réglementation en vigueur.

L'addition de nitrate « naturel » et non de nitrate comme additif, n'est en réalité qu'une « pseudo alternative » puisque le risque lié au résidu de nitrite est le même.

2) Les colorants naturels

Des extraits de tomate ou du paprika ont été ajoutés en tant que colorants naturels en supplément à des taux réduits de nitrite dans des fabrications de mûlée (100 mg au lieu de 150 mg/kg dans le témoin) (Bazan-Lugo *et al.* 2012). L'addition d'un extrait de tomate (2,5-3,0%) permet d'obtenir une couleur proche de celle du témoin confirmant la possibilité de réduire le taux de nitrite sans affecter la couleur. De même, le taux de nitrite dans des saucisses de

Francfort peut être réduit de 150 mg/kg à 100 mg/kg en présence de 12% d'extrait de tomate, avec une conservation de la couleur usuelle des produits (Deda *et al.* 2007).

3) Les bactéries

S. xylosus est capable de former de la nitrosomyoglobine dans un milieu de culture de laboratoire supplémenté avec de la metmyoglobine et en absence de nitrate (Morita *et al.* 1998). La formation de nitrosomyoglobine a également été mise en évidence dans une mèche sans nitrate ou nitrite (Li *et al.* 2013). Cependant, dans toutes ces études le mécanisme de production du NO reste inconnu. Les bactéries pourraient produire du NO à partir de l'arginine via l'oxyde nitrique synthase (NOS) (Crane *et al.* 2010). Le gène *nos* codant cette enzyme a été identifié chez différentes espèces de SCN (van Sorge *et al.* 2013, Sánchez Mainar *et al.* 2014). La production de NO dépendante de la NOS est développée dans le chapitre suivant.

- CHAPITRE 4 - SYNTHÈSE DU MONOXYDE D'AZOTE ET L'OXYDE NITRIQUE SYNTHASE (NOS)

Il est connu depuis la fin des années 1960 que les bactéries dénitrifiantes peuvent produire du monoxyde d'azote ou oxyde nitrique (NO) comme produit intermédiaire lors de la réduction du nitrate par la voie de dissimilation. Du NO peut également être produit par la réduction du nitrite par des nitrites réductases ou nitrates réductases bactériennes. Chez certaines espèces, le NO peut provenir de l'oxydation de l'arginine *via* un mécanisme complexe mettant en jeu une oxyde nitrique synthase (NOS) (Crane *et al.* 2010).

A) LA REDUCTION DES NITRITES CHEZ LES PROCARYOTES

Chez les bactéries, deux voies enzymatiques conduisent à la réduction du nitrite en NO. Il a été montré que la synthèse de NO s'établit à partir d'une nitrite réductase au cours des 3 étapes du cycle de l'azote : dénitrification (Zafiriou *et al.* 1989), fixation de l'azote atmosphérique (Molina-Favero *et al.* 2008) et nitrification (Cantera and Stein 2007). De plus, la nitrate réductase, initialement impliquée dans la réduction du nitrate en nitrite, peut, sous certaines conditions, synthétiser du NO (Rodionov *et al.* 2005, Maia and Moura 2015).

1) La réduction du nitrite par une nitrite réductase

1.1) Les bactéries dénitrifiantes

La dénitrification est une forme de métabolisme du nitrate qui aboutit à la production de diazote (N₂) et au cours duquel le NO est formé. La dénitrification permet une respiration anaérobie dépendante du nitrate et permet aussi d'éliminer l'excès d'équivalent réducteur (NAD) et de moduler le potentiel redox de la cellule (Shapleigh 2006). Le passage de nitrate au diazote est séquentiel et se fait par l'intermédiaire de quatre réductases. Le nitrate est réduit en nitrite par une nitrate réductase (membranaire et/ou périplasmique). Le nitrite est réduit en NO soit par une nitrite réductase cytochrome-cd1 contenant de l'hème (NirS) soit par une nitrite réductase contenant du cuivre (NirK) (Priemé *et al.* 2002). Le NO est réduit en protoxyde d'azote N₂O par une NO-réductase, et enfin, le N₂O est réduit en N₂ par une N₂O-

réductase. La synthèse de NO au cours de la dénitrification a été observé chez plusieurs espèces du genre *Pseudomonas* (γ -proteobacteria) ainsi que pour deux α -proteobacteria, *Rhodobacter sphaeroides* et *Parococcus denitrificans*, deux β -proteobacteria, *Achromobacter cycloclastes* et *Ralstonia eutropha*, et quelques représentantes d'archées (Röszer 2012). Les nitrites réductases sont majoritairement localisées au niveau de la membrane plasmique et l'espace périplasmique des genres *Pseudomonas* et *Achromobacter* (Coyne *et al.* 1990), ce qui en fait un lieu privilégié pour la synthèse de NO. Au cours de la dénitrification, le NO est formé comme un intermédiaire réactionnel. Cependant, chez *R. sphaeroides*, le régulateur transcriptionnel NnrR (membre de la famille des FNR) active l'expression du gène *nirK* et de l'opéron *nor* (NO-réductase) en présence de NO (Laratta and Shapleigh 2003). Chez *R. eutropha*, l'expression de l'opéron *nor*, en réponse au NO, est activée par le régulateur NorR (régulateur transcriptionnel sigma-dépendant) (Cramm *et al.* 2006).

1.2) Les bactéries fixatrices d'azote

Les rhizobiums comme *Azospirillum brasilense* sont des bactéries symbiotiques des légumineuses, retrouvées dans le sol et capables de fixer l'azote atmosphérique (N_2) pour le transformer en ammonium (NH_4^+). L'opéron *napABC* codant une nitrate réductase périplasmique (Nap) ainsi que deux copies du gène *nirK* (*nirK1* et *nirK2*) codant la nitrite réductase NirK ont été identifiés chez *A. brasilense* (Steenhoudt *et al.* 2001, Pothier *et al.* 2008). Nap et NirK sont impliquées dans la dénitrification où NirK contribue à la synthèse de NO par réduction du nitrite. Chez les bactéries fixatrices de N_2 , le NO joue un rôle important dans le développement des racines des légumineuses et stabilise la relation symbiotique bactérie-plante (del Giudice *et al.* 2011).

1.3) Les bactéries nitrifiantes

La nitrification est l'étape du cycle de l'azote au cours de laquelle du nitrite est formé par oxydation aérobie de l'ammonium (NH_4^+) puis convertis en nitrate. Les bactéries comme *Nitrosomonas europaea*, *Nitrosovibrio* spp et *Nitrospira* spp (β -proteobacteria) réalisent l'oxydation aérobie de l'ammonium tandis que *Nitrobacter winogradskyi* (α -proteobacteria) réalise l'oxydation du nitrite en nitrate (Röszer 2012).

Un gène codant la protéine NirK a été identifié chez *N. europaea* (Beaumont *et al.* 2002). Un mutant déficient du gène *nirK* chez *N. europaea* reste capable de produire du NO ce qui

suggère qu'un autre mécanisme serait impliqué dans la synthèse de NO (Beaumont *et al.* 2002). L'expression de *nirK* est sous la dépendance du répresseur NsrR. Une augmentation de la concentration de nitrite et une diminution du pH entraînent une augmentation de la transcription de *nirK* (Beaumont *et al.* 2004). Chez les bactéries nitrifiantes, leur capacité à réduire le nitrite en NO leur permet de contrôler la toxicité du nitrite (Cantera and Stein 2007). Un gène codant potentiellement une protéine NirK a été identifiée chez *N. winogradskyi* (Starkenbourg *et al.* 2008). La présence de nitrite augmente la transcription de ce gène et la protéine correspondante réduit le nitrite en NO (Starkenbourg *et al.* 2008).

1.4) Les bactéries « anammox »

L'« anammox » (oxydation anaérobie de l'ammonium) est un processus qui permet d'oxyder l'ammonium en N₂ où le nitrite agit comme accepteur final d'électron. Ce processus est observé uniquement chez les bactéries de l'ordre des Planctomycétales (van der Star *et al.* 2008) et a lieu dans les environnements aquatiques anaérobies. Un gène *nirS* a été identifié chez la bactérie *Kuenenia stuttgartiensis* (Kartal *et al.* 2007). Comme pour les bactéries dénitrifiantes, les bactéries « anammox » pourraient réduire le nitrite en NO par l'intermédiaire de la protéine NirS.

2) La réduction du nitrite par une nitrate réductase

La réduction du nitrite qui conduit à la production de NO, indépendamment de la respiration, est probablement due à une molybdo-enzyme telle que la nitrate réductase (Maia and Moura 2015). Il existe trois types de nitrates réductases chez les bactéries : la nitrate réductase membranaire (Nar), périplasmique (Nap) et cytosolique (Nas) (Maia and Moura 2015). Les staphylocoques n'ont que la Nar tandis que *Bacillus subtilis* a une Nar plus une Nas (Moreno-Vivián *et al.* 1999). Nar et Nas sont aussi présentes chez de nombreuses bactéries Gram-négatives. Nap est bien évidemment présente uniquement chez les bactéries à Gram négatif (Potter *et al.* 2001, Morozkina and Zvyagilskaya 2007). La présence de ces enzymes est variable en fonction des genres bactériens. Il a été suggéré que la synthèse de NO chez *Salmonella enterica* serovar Typhimurium et *Escherichia coli*, est assurée majoritairement par la Nar (Gilberthorpe and Poole 2008, Vine *et al.* 2011, Rowley *et al.* 2012) et qu'une faible proportion (moins de 3%) soit issue de la Nap (Vine *et al.* 2011, Rowley *et al.* 2012). Le potentiel de la Nas n'a pas été étudié. Les conditions requises pour observer une synthèse de

NO par une nitrate réductase résultent de la combinaison d'une condition anaérobie, associée à une diminution de la concentration de nitrate combinée à l'accumulation du nitrite dans le milieu (Maia and Moura 2015). Il est intéressant de noter que ces conditions sont très similaires à celles observées pour la synthèse de NO par la nitrate réductase chez les plantes (Rockel *et al.* 2002). La forte similitude d'activité entre les nitrates réductases bactériennes et celles des plantes suggère que la réduction du nitrite couplée à la synthèse de NO est une caractéristique générale des nitrates réductases (Maia and Moura 2015).

B) LES OXYDE NITRIQUE SYNTHASES (NOS) CHEZ LES PROCARYOTES

L'enzyme responsable de la synthèse de NO est l'oxyde nitrique synthase, aussi appelée NO-synthase ou NOS (EC 1.14.13.39). Le NO se forme à partir de l'oxydation de la L-arginine en L-citrulline. Les NOS ont été découvertes chez les mammifères en 1989 (Knowles *et al.* 1989, Palacios *et al.* 1989) et ont fait l'objet de nombreuses études (Alderton *et al.* 2001). Les NOS de mammifères possèdent un domaine réductase et un domaine oxygénase. Le séquençage des génomes bactériens a permis l'identification de gènes codant des NOS, par comparaison avec les séquences codantes des domaines oxygénase des NOS de mammifères. En effet, une des particularités des NOS des procaryotes, à une exception près, est de ne posséder qu'un domaine oxygénase (Crane *et al.* 2010).

1) La phylogénie

Des homologues du gène *nos* ont été identifiés pour la première fois dans les génomes de *Bacillus subtilis* (Kunst *et al.* 1997) et de *Deinococcus radiodurans* (White *et al.* 1999). Depuis, de nombreux génomes procaryotes ont été séquencés et des séquences NOS ont été identifiées. Plus de 930 séquences sont ainsi disponibles dans la banque de données UniProtKB (mars 2017). Dans Pfam (version 31.0), un alignement des domaines oxygénases a été établi à partir de 36 séquences de NOS procaryotes représentatives de la diversité (pfam.xfam.org/family/PF02898). Les NOS des procaryotes sont réparties dans 6 phyla bactériens, ceux des Firmicutes, Actinobacteria, Deinococcus-Thermus, Bacteroidetes, Proteobacteria et Cyanobacteria et dans le domaine des Archaea (Figure 13). Quarante-vingt-un % des NOS procaryotes sont retrouvées chez les bactéries à Gram positif et parmi elles 90 % appartiennent au phylum des Firmicutes.

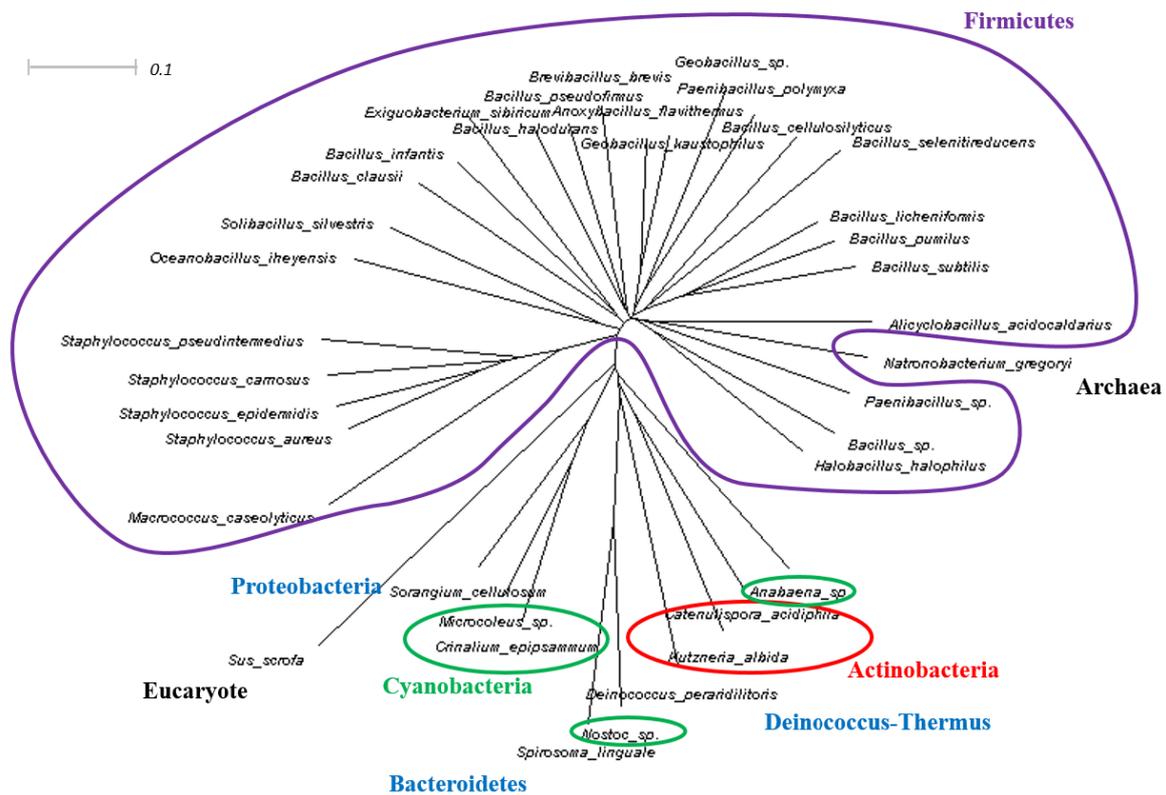


Figure 13. Arbre phylogénétique des NOS procaryotes. L'arbre phylogénétique a été réalisé à partir de l'alignement des séquences NOS de procaryotes disponibles dans la banque de données Pfam 31.0 (pfam.xfam.org/family/PF02898, version 31.0) et construit sur un modèle de distance (NJ) avec le logiciel SplitsTree. Le domaine oxygénase de la NOS d'un eucaryote (*Sus scrofa*) a été ajouté comme référence.

Au sein des Firmicutes, les NOS ont été particulièrement bien étudiées chez les genres *Staphylococcus*, *Bacillus* et *Geobacillus* (Bird *et al.* 2002, Pant *et al.* 2002, Adak *et al.* 2002a, Chartier and Couture 2004, Midha *et al.* 2005, Sudhamsu and Crane 2006, Montgomery *et al.* 2010). La présence du gène *nos* a été recherchée par PCR chez 86 souches de staphylocoques à coagulase négative, après confirmation par séquençage des produits amplifiés, le gène *nos* était présent dans 63 souches soit environ 70% des souches (Sánchez Mainar *et al.* 2014). Une étude réalisée chez *S. aureus* a montré que le gène *nos* fait partie d'un opéron de deux gènes (Sapp *et al.* 2014). En effet, *nos* est co-transcrit avec le gène (*pdt*) situé en aval. Ce gène code une préphénate déshydratase, une enzyme catalysant l'avant dernière réaction de la biosynthèse de la phénylalanine (Sapp *et al.* 2014). Ces auteurs ont montré que ce cluster de gène est spécifique aux staphylocoques et retrouvé dans tous les génomes de staphylocoques séquencés sans que l'on comprenne l'intérêt de cette co-transcription. Chez les autres

Firmicutes, la localisation du gène *nos* est différente. Chez *B. subtilis* (NC_000964.3), *nos* est localisé en amont du gène *yfIL* (BSU07640) codant une acylphosphatase, tandis que *nos* est localisé en amont du gène *sodA2* (BA_5696) codant une superoxyde dismutase chez *Bacillus anthracis* (NC_003997.3). Enfin, chez *Geobacillus stearothermophilus* (NZ_CP008934.1), le gène *nos* est localisé en amont d'un gène (GT50_RS16310) codant un transporteur ABC.

Au sein des Actinobacteria, le gène *nos* de *Streptomyces turgidiscabies* est situé sur un îlot de pathogénicité avec 3 autres gènes impliqués dans la production d'une toxine active sur les plantes (Kers *et al.* 2004).

2) La structure des NOS

Les NOS sont des oxygénases qui font partie de la famille des protéines possédant un hème coordonné à une cystéine, appelée la famille des protéines « hème-thiolates » qui contient notamment les cytochromes P450 (Gorren and Mayer 2007).

2.1) Les domaines des NOS

La majorité des NOS bactériennes (bNOS) n'est constituée que d'un seul domaine appelé le domaine oxygénase où le NO est synthétisé (Figure 14). Ce domaine comprend le site actif où peut se fixer le substrat L-arginine, l'hème et le cofacteur ptérine. Les NOS de mammifères (mNOS) sont beaucoup plus complexes avec un domaine oxygénase et un domaine réductase (Figure 14). Entre ces deux domaines, il y a un site de fixation pour le complexe calcium/calmoduline qui régule le transfert d'électrons et qui est absent chez les bNOS (Sudhamsu and Crane 2009, Crane *et al.* 2010, Rafferty 2011). Le domaine réductase contient un site de fixation pour le FAD (flavine adénine dinucléotide), le FMN (flavine mononucléotide) et le NADPH (nicotinamide adénine dinucléotide phosphate). Un domaine réductase est retrouvé chez une seule bNOS, celle de *Sorangium cellulosum* (Agapie *et al.* 2009). Ce domaine situé en N-terminal contient un groupement fer-soufre et possède un site de fixation pour le FAD et pour le NADPH (Figure 14). Ainsi, chez presque toutes les bactéries et contrairement aux mNOS, le domaine réductase, qui assure le transfert d'électrons jusqu'au site actif, n'est pas associé au domaine oxygénase chez les bNOS et cette réaction doit donc être prise en charge par une enzyme séparée (Sudhamsu and Crane 2009).

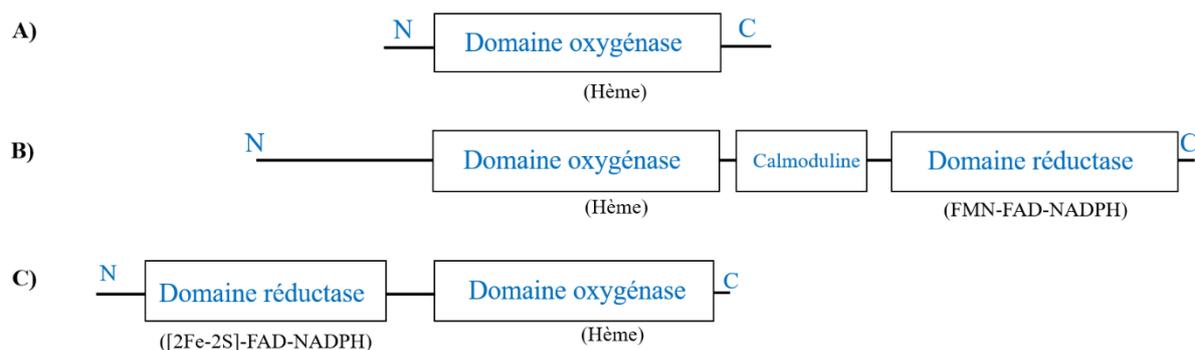


Figure 14. Les domaines des NOS. A) NOS bactériennes (bNOS) B) NOS des mammifères (mNOS) C) NOS de *Sorangium cellulosum*.

2.2) Le domaine oxygénase

Les domaines oxygénases des bNOS partagent jusqu'à 47% d'identité avec ceux des mNOS avec la conservation des résidus de liaison au substrat, à l'hème et au cofacteur (Pant *et al.* 2002, Rafferty 2011). Les domaines oxygénases des bNOS et des mNOS ont une structure tridimensionnelle similaire et sont actifs en homodimères (Figure 15). Chaque sous unité du domaine oxygénase est formée par un assemblage d'hélices- α (13) et de feuillets- β (19) (Pant *et al.* 2002). Le domaine oxygénase représente le site catalytique de l'enzyme et comprend un site de liaison au substrat arginine, un site de liaison avec l'hème et un site pour le cofacteur ptérine. L'interface du dimère est principalement constituée par une région hydrophobe « helical lariat » entourée par 2 hélices perpendiculaires qui adoptent la forme d'un T (« helical T ») (Figure 15). Ces deux régions contribuent à la stabilité du dimère ainsi qu'à la liaison avec le cofacteur ptérine. Des études de biochimie structurale dans lesquelles les bNOS étaient liées soit au substrat L-arginine (Sudhamsu and Crane 2006) soit à l'arginine et au tétrahydrofolate (H_4F) (Pant *et al.* 2002) soit au NAD et au S-éthyl-isothiourée (Bird *et al.* 2002), ont montré que les résidus clés, présents dans le domaine oxygénase des mNOS, sont conservés chez les bNOS. Ceci a suggéré une capacité des bNOS à synthétiser du NO. La caractérisation par spectroscopie UV/visible des NOS de *D. radiodurans* (Adak *et al.* 2002b), de *S. aureus* (Chartier and Couture 2004, Salard *et al.* 2006), de *B. anthracis* (Midha *et al.* 2005, Salard *et al.* 2006) et de *B. subtilis* (Adak *et al.* 2002a, Santolini *et al.* 2006, Salard-Arnaud *et al.* 2012), a révélé un état pentacoordonné du fer de l'hème (dit de haute rotation) en présence d'arginine et un état hexacoordonné (dit de faible rotation) en présence d'autres ligands tels que l'imidazole, le NO, le CO, l' O_2 et le DTT comme cela avait été déterminé pour le noyau hémique des mNOS.

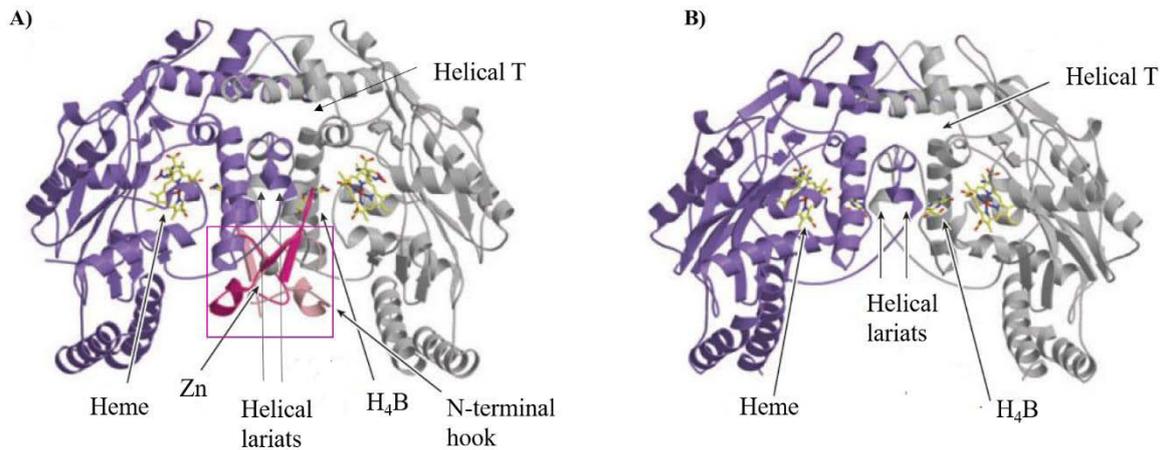


Figure 15. Structure tridimensionnelle du domaine oxygénase des NOS. A) Domaine oxygénase d'une NOS de mammifère (mNOS) (PDB : 1NSI), B) NOS bactérienne (bNOS) (PDB : 1M7V). Les sous-unités de l'homodimère sont représentées en violet et gris. Adapté de Crane *et al.* (2010).

Comme nous l'avons vu, les bNOS et le domaine oxygénase des mNOS montrent des caractéristiques communes, cependant il existe des différences notables entre ces domaines. On peut noter l'absence du crochet N-terminal ou « N-terminal hook » chez les bNOS par opposition à la partie N-terminale du domaine oxygénase des mNOS (Figure 15) (Pant *et al.* 2002). Chez les mNOS, cette région N-terminale, structurée en « épingle à cheveux » contient deux cystéines qui coordonnent un atome de zinc. Ce crochet N-terminal intervient dans la stabilisation du dimère entre les domaines oxygénases des mNOS. Il est impliqué dans la liaison du dimère avec la chaîne latérale du cofacteur tétrahydrobioptérine H₄B. Des études ont montré que la délétion de cette région n'empêchait pas le dimère de se former mais affectait l'activité enzymatique (Rodriguez-Crespo *et al.* 1997, Ghosh *et al.* 1999, Panda *et al.* 2003). L'absence de cette région N-terminale chez bNOS n'empêche pas l'association des sous-unités oxygénases (Crane *et al.* 2010). Une autre différence entre le domaine oxygénase des bNOS et des mNOS est à noter au niveau de l'interface du dimère dans la région « helical lariat ». Une glycine chez les mNOS est substituée par une proline chez toutes les bNOS (Pant *et al.* 2002). La présence de cette proline pourrait renforcer les interactions hydrophobes à l'interface du dimère, même si ce seul acide aminé n'est pas suffisant pour stabiliser le dimère (Bird *et al.* 2002). Au niveau du site actif, on observe également une substitution d'acide aminé où un résidu valine conservé chez les mNOS est substitué par un résidu isoleucine ou parfois méthionine chez toutes les bNOS. Cette substitution affecte considérablement la dissociation du complexe NO-fer ferrique (NO-Fe³⁺) avec une dissociation de 10 à 20 fois plus lente par rapport à ce que l'on observe chez les mNOS (Pant *et al.* 2002).

Au sein des bNOS, bien que leur structure tridimensionnelle soit similaire (Sudhamsu and Crane 2009, Crane *et al.* 2010), des différences peuvent être observées au niveau de la conformation du dimère (Pant *et al.* 2002). Une étude menée chez *B. subtilis* a permis de mettre en avant un état « relâché » du dimère impliquant la région « helical lariat » en absence de substrat et de cofacteur ptérine (Pant and Crane 2005). Dans cet état, les sites de liaison de l'hème et du substrat sont exposés ce qui rend la protéine plus sensible à la protéolyse. A l'inverse, à l'état « resserré », les sites de liaison ne sont pas exposés et l'enzyme est active. La proportion de chacune de ces formes va dépendre de la présence du substrat et du cofacteur ptérine, notamment (Li *et al.* 2006). Une observation similaire a été faite pour la NOS de *S. aureus* dont le dimère est dans un état « relâché » en absence du cofacteur ptérine (Salard *et al.* 2006). Par contre, le dimère de la NOS de *B. anthracis* est dans un état « resserré » malgré l'absence de ptérine (Salard *et al.* 2006).

2.3) Le cofacteur ptérine

Comme les mNOS, les bNOS peuvent utiliser le cofacteur H₄B comme cofacteur ptérine (Holden *et al.* 2013, 2015). Ce cofacteur joue un rôle dans la stabilisation du dimère et intervient dans le cycle catalytique de l'enzyme. Cependant, l'absence de la région N-terminale chez les bNOS permet l'accès à un autre cofacteur, le tétrahydrofolate (H₄F) (Pant *et al.* 2002, Adak *et al.* 2002a). Ces deux cofacteurs ont un noyau hétérocyclique identique mais leur chaîne latérale diffère. Le H₄F a une chaîne latérale de type acide p-amino benzoïque plus longue que la chaîne latérale de type dihydroxypropyle du H₄B (Figure 16). Chez les mNOS, la présence du crochet N-terminal ne permet pas l'interaction avec le cofacteur H₄F en raison de l'encombrement stérique (Crane *et al.* 2010). L'absence du crochet N-terminal chez les bNOS explique pourquoi ces enzymes peuvent utiliser H₄F comme cofacteur. Le cofacteur ptérine (H₄B ou H₄F) établit des liaisons hydrogènes entre son groupement 3,4 amide et le carboxylate de l'hème (Crane *et al.* 2010).

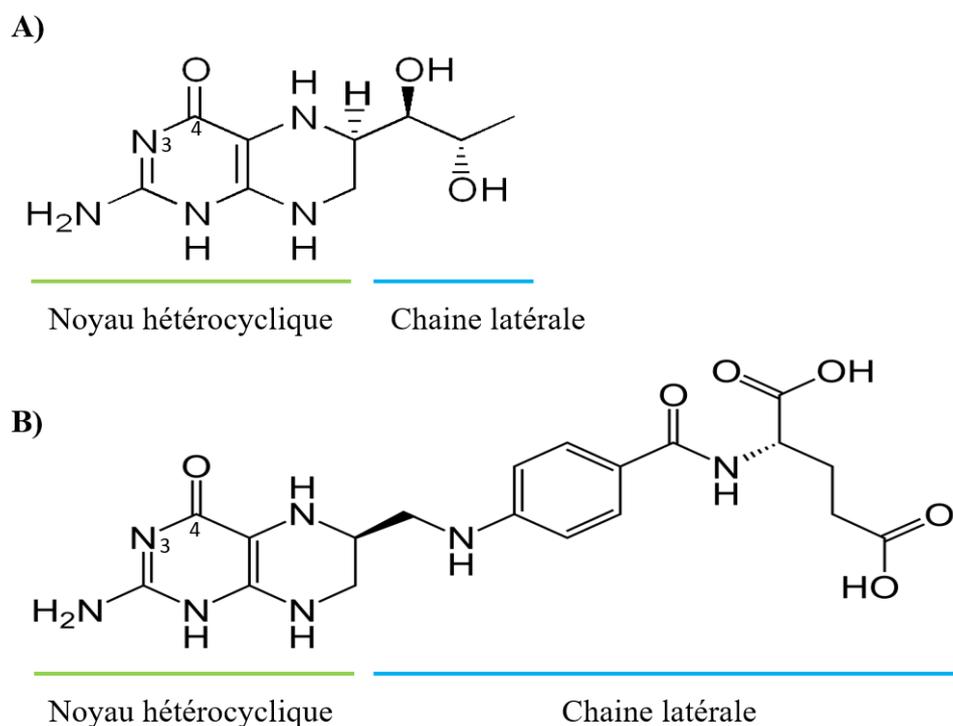


Figure 16. Structure des cofacteurs ptérines. A) H₄B et B) H₄F

Toutes les bactéries sont capables de synthétiser le cofacteur H₄F (Sudhamsu and Crane 2009). Par contre, toutes ne peuvent pas synthétiser du H₄B. *D. radiodurans* n'a pas toutes les enzymes nécessaires à sa synthèse, notamment il lui manque la sépiapterine réductase qui est la dernière enzyme impliquée dans la voie de biosynthèse du H₄B (Reece *et al.* 2009). Le génome de *B. subtilis* contient tous les gènes permettant la synthèse du H₄B et donc, *a priori*, *B. subtilis* serait capable d'en synthétiser (Kunst *et al.* 1997). Il a été montré que la NOS de *B. subtilis* peut interagir avec la même affinité pour H₄F et H₄B (Adak *et al.* 2002a). Il en est de même pour la NOS de *S. aureus* pour laquelle l'interaction avec les deux cofacteurs est possible (Bird *et al.* 2002, Hong *et al.* 2003). Les différences d'utilisation du cofacteur ptérine par les bNOS peuvent probablement s'expliquer par les différences en acides aminés présents au niveau de la zone d'interaction de la NOS avec le cofacteur ptérine. Notamment, chez *B. subtilis*, la région d'interaction de la NOS avec le cofacteur ptérine est composée d'acides aminés chargés négativement (Asp322, Asp343 et Ser345) alors que cette même région chez *D. radiodurans* est composée d'acides aminés chargés positivement (Lys305, Arg326 et Arg328) (Pant *et al.* 2002). La chaîne latérale du H₄F étant majoritairement chargée négativement, la NOS de *B. subtilis* semble moins adaptée que celle de *D. radiodurans* pour lier H₄F (Pant *et al.* 2002). L'interaction avec le cofacteur ptérine, H₄B ou H₄F, joue sur l'affinité de l'enzyme pour son substrat. A l'état natif, l'affinité de la NOS de *S. aureus* et de

B. anthracis pour l'arginine est équivalente (Salard *et al.* 2006). L'ajout *in vitro* de H₄B ou de H₄F augmente fortement l'affinité pour l'arginine de la NOS de *S. aureus* d'un facteur 7 ou 50, respectivement, tandis qu'aucun n'a d'effet sur celle de *B. anthracis* (Salard *et al.* 2006).

3) Le mode d'action et l'activité NOS

3.1) Le mode d'action

Les NOS sont des métalloenzymes qui catalysent l'hydroxylation du L-arginine en L-citrulline et NO en deux étapes en passant par la formation d'un intermédiaire le N^ω-hydroxy-L-arginine (NOHA) (Figure 17). L'hydroxylation de l'arginine s'effectue au niveau de son groupement guanidine (Figure 17). Il est admis que ces enzymes ne peuvent agir qu'en présence d'oxygène, d'hème, d'un cofacteur ptérine (H₄B ou H₄F), ainsi que d'électrons. Les électrons proviennent de la réduction du NADPH par la réductase et sont transportés au niveau du site actif par des flavines type FAD et FMN (Marletta 1993, Alderton *et al.* 2001, Li and Poulos 2005, Crane *et al.* 2010).

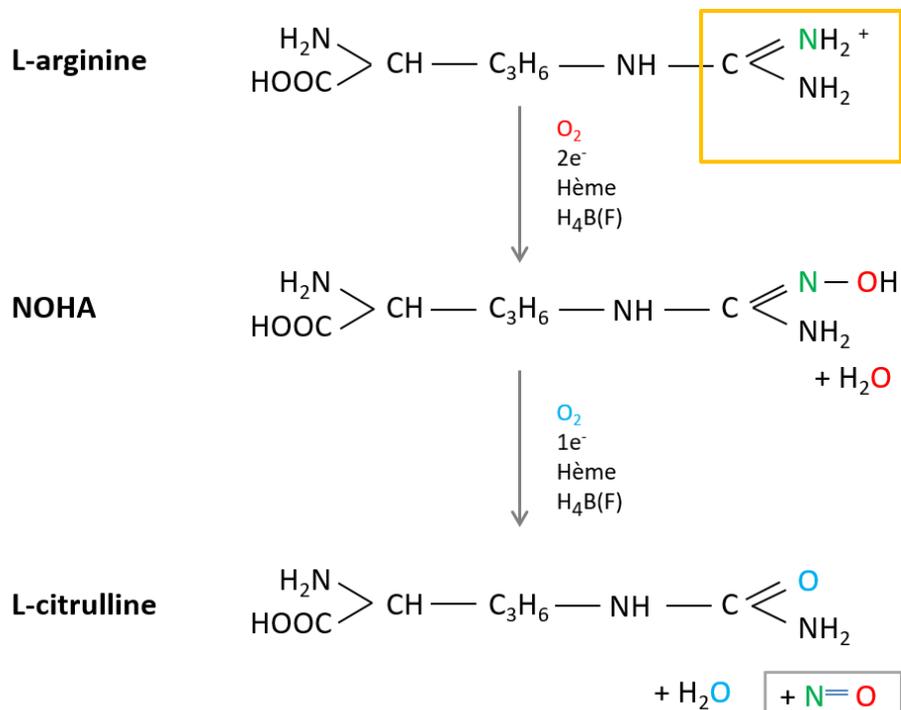


Figure 17 : Synthèse de NO dépendante de NOS. Le groupement guanidine est encadré en orange.

D'un point de vue mécanistique, tout ce qui caractérise la catalyse enzymatique chez les mNOS est applicable aux bNOS (Crane *et al.* 2010). La catalyse s'effectue au niveau d'une poche située au-dessus de l'hème dans laquelle l'arginine, par sa fonction guanidine, vient s'ancrer à un résidu glutamate de l'enzyme et établit un réseau de liaisons hydrogènes avec le squelette carbonyl d'un résidu tryptophane et avec un groupement carboxylate de l'hème (Crane *et al.* 2010). Un premier électron en provenance du NADPH est transféré jusqu'à l'hème et permet de réduire le fer ferrique (Fe^{3+}) vers l'état ferreux (Fe^{2+}) (Figure 18). Une molécule d'oxygène peut alors se lier au fer pour former un complexe oxygéné $\text{Fe}^{2+}\text{-O}_2$ en équilibre avec sa forme ferrique superoxyde $\text{Fe}^{3+}\text{-O}_2^-$ (Figure 18). L'activation de ce complexe oxygéné est nécessaire pour la poursuite du cycle catalytique. Cependant, l'auto-oxydation de ce dernier complexe, aussi appelée réaction de découplage, peut résulter en une libération d'anion superoxyde entraînant l'arrêt du cycle (Stuehr *et al.* 2001, Wei *et al.* 2002). La réaction de découplage est limitée d'une part, par l'interaction du substrat qui stabilise le complexe oxygéné et, d'autre part, par l'apport d'un donneur rapide d'électrons qui permet le passage à l'étape suivante (Santolini *et al.* 2001, Berka *et al.* 2004). Le second électron nécessaire à la réaction est délivré par le cofacteur H_4B ou H_4F chez les bNOS et permet de réduire l'oxygène pour former les espèces $\text{Fe}^{3+}\text{-O}_2^{2-}$ et H_4B^{++} (Figure 18).

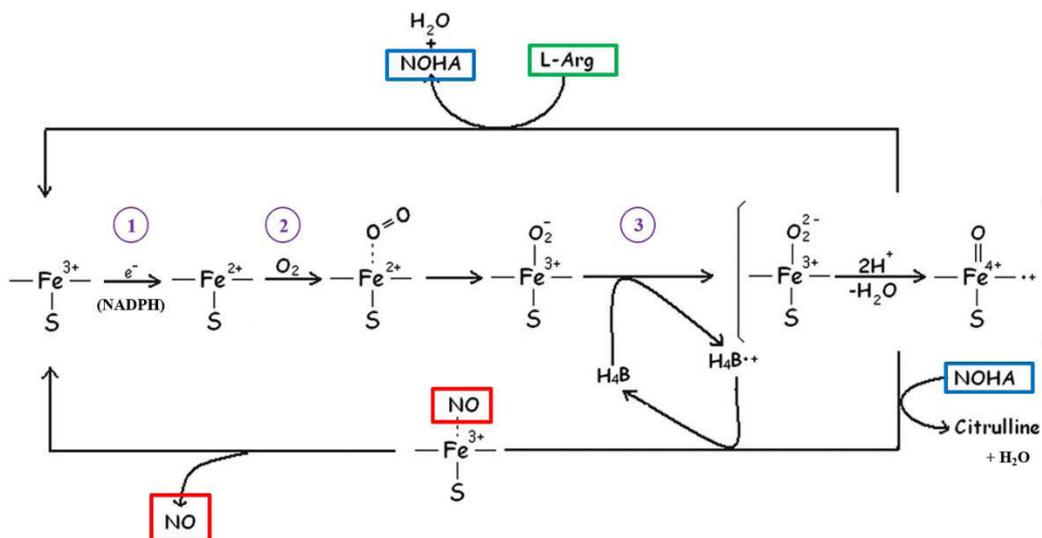


Figure 18. Modèle de synthèse du NO par la NOS. D'après Sudhamsu et Crane (2006), Crane *et al.* (2010).

Un radical oxyferryl est ensuite formé (correspondant à un état radicalaire $\text{Fe}^{4+}=\text{O}$). C'est à partir de cette étape qu'est catalysée la N-hydroxylation de la L-arginine où un atome d'oxygène est greffé sur la fonction guanidine et l'autre est réduit en une molécule d'eau (Figure 18). Le substrat intermédiaire N^o-hydroxy-L-arginine (NOHA) est formé et le fer de l'hème est réduit pour retourner à l'état Fe^{3+} .

Au cours de la transformation du NOHA, l'hème suit le même processus d'activation, à la différence que l'espèce réactive serait directement l'état $\text{Fe}^{3+}-\text{O}_2^{2-}$ (Figure 18) (Marletta 1993, Pant and Crane 2005). Le NOHA est transformé en citrulline avec production concomitante de NO. Le radical H_4B^+ est réduit par l'hème, probablement par l'espèce $\text{Fe}^{2+}-\text{NO}$ (Sørli *et al.* 2003) et le fer retourne à l'état Fe^{3+} et une molécule d'eau est formée.

A la fin d'un cycle catalytique, le NO est donc lié au fer Fe^{3+} ($\text{Fe}^{3+}-\text{NO}$) qui peut donner lieu à la formation d'un complexe $\text{Fe}^{2+}-\text{NO}$ si le partenaire réductase réduit le Fe^{3+} en Fe^{2+} avant que la dissociation $\text{Fe}^{3+}-\text{NO}$ ne se soit accomplie. La formation du complexe $\text{Fe}^{2+}-\text{NO}$ conduira à une inhibition de la NOS (Li and Poulos 2005). Chez les mNOS, la constante de dissociation du NO pour le Fe^{3+} varie de 2 à 5 s⁻¹ tandis que cette constante pour le Fe^{2+} varie de 1.10⁻⁴ à 6.10⁻⁴ s⁻¹ (Stuehr *et al.* 2004). C'est pourquoi le donneur d'électron (la NADPH-réductase) doit être un donneur lent permettant la réduction du Fe^{3+} seulement après la dissociation du NO du fer pour éviter l'auto-inhibition de la NOS (Crane *et al.* 2010).

3.2) L'activité NOS

3.2.1) La mesure de l'activité

L'activité NOS de *S. aureus* a été mesurée dans des lysats de culture et évaluée par transformation d'arginine tritiée (L-[³H] arginine) en L-citrulline tritiée (Choi *et al.* 1998). Il a ainsi été montré que cette enzyme a une activité optimale à pH 6,5 et à 47,5°C (Choi *et al.* 1998). Plus récemment, l'activité NOS de souches de SCN, incluant les espèces *S. xylosus* et *S. carnosus*, a été évaluée après 72 heures d'incubation par quantification de la production de citrulline dans leurs surnageants de culture par HPLC (Sánchez Mainar *et al.* 2014). Sur les 86 souches testées, seule une souche de *Staphylococcus haemolyticus* avait une activité NOS (Sánchez Mainar *et al.* 2014).

Le nitrite peut être considéré comme le produit terminal de l'oxydation du NO (Ignarro *et al.* 1993). La mesure du nitrite peut s'effectuer par un dosage colorimétrique basé sur la réaction de Griess (Bryan and Grisham 2007). Cette méthode a été appliquée au dosage du NO produit

par les NOS de *B. subtilis* et *B. anthracis* dans des surnageants de culture (Gusarov and Nudler 2005, Shatalin *et al.* 2008). Elle a également été utilisée pour estimer l'activité d'une NOS de *S. aureus* après purification de l'enzyme (Bird *et al.* 2002).

Une dernière approche est basée sur l'utilisation de sondes fluorescentes réactives au NO. L'utilisation de la sonde CuFL, a permis d'évaluer la production de NO par la NOS de *B. subtilis* et celle de *S. aureus* (Gusarov *et al.* 2008, van Sorge *et al.* 2013). Cette approche a permis de montrer qu'il n'y avait plus aucune production de NO chez un mutant de *S. aureus* délété du gène *nos* (van Sorge *et al.* 2013). Une autre sonde fluorescente, DAF-FM diacétate, a été utilisée pour révéler une réduction de 35 %, de la production de NO chez un mutant de *S. aureus* délété du gène *nos* (Sapp *et al.* 2014). Cependant, cette diminution de synthèse du NO n'était observée qu'après culture sur un milieu solide, aucune réduction n'étant observée après culture en milieu liquide contrairement à ce qu'avait observé van Sorge *et al.* (2013) dans leur étude.

3.2.2) L'inhibition

Les bNOS peuvent être inhibées avec les inhibiteurs des mNOS. L'ajout de N^ω-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), un analogue de la L-arginine directement dans le milieu de culture a inhibé d'un facteur 2 l'activité de la NOS de *Streptomyces turgidiscabies* (Kers *et al.* 2004) et en quasi-totalité celle de la NOS de *B. subtilis* (Schreiber *et al.* 2011).

Cependant, la présence d'une isoleucine conservée au niveau du site actif chez les bNOS (valine chez les mNOS) et un site de liaison au cofacteur ptérine plus accessible, dû à l'absence du crochet N-terminal, constituent des cibles privilégiées pour l'identification d'inhibiteurs spécifiques des bNOS (Holden *et al.* 2013). Une étude menée chez *B. subtilis* a permis d'identifier deux inhibiteurs de l'activité de sa NOS, ces inhibiteurs interférant sur la croissance de la bactérie soumise à un stress oxydant (Holden *et al.* 2013). Une analyse cristallographique de la NOS de *B. subtilis* a révélé une interaction de ces inhibiteurs avec le site de liaison du cofacteur ptérine (Holden *et al.* 2013). Des études menées chez *S. aureus* et *B. subtilis* ont montré que les inhibiteurs de type aminopyridine ciblent le site de liaison du cofacteur ptérine et donc empêchent sa fixation au site catalytique (Holden *et al.* 2015a, Holden *et al.* 2015b). Les inhibiteurs de type aminoquinoline ciblent eux directement le site actif des bNOS du fait de la présence d'une isoleucine (Ile218 chez *B. subtilis*) (Holden *et al.* 2016).

3.3) Le(s) partenaire(s) réductase(s)

Comme nous l'avons vu précédemment, les bNOS n'ont pas de partenaire réductase lié au domaine oxygénase. Cependant, la réaction catalytique nécessite une source d'électrons. Dans plusieurs études visant à caractériser l'activité des bNOS *in vitro*, les domaines réductases des mNOS ou un système permettant de dériver une partie du cycle de la catalyse par l'ajout de peroxyde ont été utilisés pour fournir les électrons (Adak *et al.* 2002a, 2002b). Il a été montré que les NOS de *B. subtilis* et de *D. radiodurans*, purifiées après leur surexpression dans *E. coli*, acceptaient les électrons du domaine réductase d'une mNOS et produisaient du NO *in vitro* (Adak *et al.* 2002a, 2002b). La même observation a été faite après la surexpression d'une protéine de fusion associant la NOS de *D. radiodurans* et le domaine réductase d'une mNOS (Adak *et al.* 2002b). Chez les mNOS, un motif de surface, formé par un ensemble d'acides aminés conservés, entoure l'hème et est impliqué dans l'interaction avec le partenaire réductase (Pant *et al.* 2002). Chez la NOS de *B. subtilis*, certains de ces résidus sont retrouvés, notamment un dipeptide glycine-arginine (en position 316-317) correspondant au dipeptide arginine-glycine (en position 448-449) chez les mNOS (Pant *et al.* 2002). Ce dipeptide se situant à la surface de l'hème contribue à une charge électrostatique positive et pourrait favoriser l'interaction avec le partenaire réductase (Pant *et al.* 2002). Un partenaire réductase a été identifié chez *B. subtilis* (Wang *et al.* 2007). En effet, il a été montré que la flavodoxine YkuN qui est une NADPH-réductase à FMN intervient dans la synthèse de NO par la NOS de *B. subtilis* (Wang *et al.* 2007). Cependant, chez *B. subtilis*, la délétion du gène correspondant, *ykuN*, n'a pas altéré la capacité de production de NO par la NOS (Gusarov *et al.* 2008). Cette étude a aussi montré que la NOS de *B. subtilis* surexprimée chez *E. coli* gardait son activité catalytique et produisait du NO, ce qui a suggéré que la NOS utilise les réductases présentes chez *E. coli* et donc qu'il n'y a pas de partenaires réductases dédiés (Gusarov *et al.* 2008). Une étude plus récente a permis de mettre en évidence un second partenaire réductase pour la NOS de *B. subtilis*, YumC qui est une NADPH-réductase à FAD (Holden *et al.* 2014). La combinaison de ce nouveau partenaire avec NOS et YkuN augmente fortement l'activité NOS de *B. subtilis* évaluée *in vitro* (Holden *et al.* 2014).

4) Les fonctions des NOS bactériennes

Les rôles exercés par le NO chez les mammifères sont bien connus dans la neurotransmission, la vasodilatation et la réponse immunitaire (Alderton *et al.* 2001). Chez les bactéries, le NO

contribue à la réponse au stress oxydant, mais peut aussi être impliqué dans la formation de métabolites secondaires, de biofilms, et jouer un rôle dans la respiration.

4.1) La cytoprotection

4.1.1) La réponse au stress oxydant

Le rôle des bNOS le plus souvent décrit concerne la protection contre un stress oxydant. Le stress oxydant est déclenché par exposition de la bactérie à différents composés tels que le peroxyde d'hydrogène (Shatalin *et al.* 2008, Vaish and Singh 2013, van Sorge *et al.* 2013, Sapp *et al.* 2014), des antibiotiques comme les β -lactamines, les aminoglycosides et les quinolones (Kohanski *et al.* 2007), l'hème (Wakeman *et al.* 2012) et d'autres molécules comme l'acriflavine et la pyocyanine produite par *Pseudomonas aeruginosa* (Gusarov *et al.* 2009). Toutes ces molécules entraînent la formation d'espèces réactives de l'oxygène.

Chez *S. aureus* et *B. subtilis*, le peroxyde d'hydrogène déclenche la réaction de Fenton (Gusarov and Nudler 2005, van Sorge *et al.* 2013). L' H_2O_2 réagit avec le fer libre dans la cellule (Fe^{2+}) pour produire des radicaux hydroxylés libres (OH^\cdot et OH^-) qui produisent des effets délétères sur l'ADN et entraînent la mort bactérienne. Chez *B. subtilis*, la réaction de Fenton est alimentée par l'activité thiorédoxine réductase qui réduit des groupements thiols (SH) qui, à leur tour, réduisent le fer ferrique (Fe^{3+}) en fer ferreux (Fe^{2+}) et alimentent la réaction de Fenton (Figure 19) (Gusarov and Nudler 2005, Sudhamsu and Crane 2009).

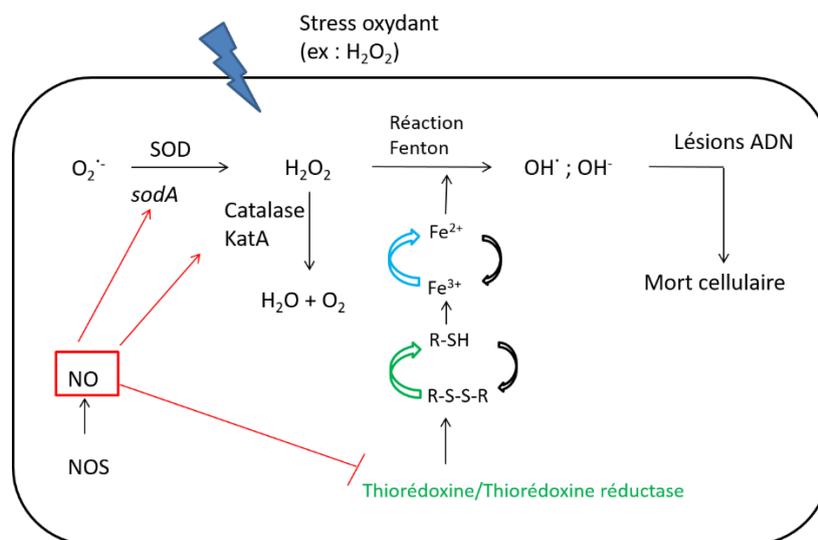


Figure 19. Rôle du NO dans la réponse au stress oxydant chez *Bacillus subtilis*. D'après Sudhamsu et Crane (2009).

Les études basées sur la caractérisation de mutants délétés du gène *nos* ont permis de mettre en évidence des mécanismes de protection médiés par le NO. Chez *B. subtilis*, le NO produit par la NOS peut inhiber la réaction de Fenton par inhibition de l'activité thiorédoxine réductase (Figure 19) (Gusarov and Nudler 2005). Gusarov and Nudler (2005) ont montré qu'un prétraitement de 5 secondes avec du NO exogène juste avant un challenge avec 10 mM d' H_2O_2 augmente le taux de survie de *B. subtilis* d'un facteur 100. L'effet protecteur du NO est dû à l'activation de la catalase KatA qui hydrolyse l' H_2O_2 . L'activité catalase d'une souche délétée du gène *nos* chez *B. anthracis* est réduite de 40% (Shatalin *et al.* 2008). Le NO peut aussi induire l'expression du gène *sodA* codant la superoxyde dismutase chez *B. subtilis* (Gusarov *et al.* 2009).

Il a été montré, chez *E. coli* exprimant la NOS de *B. anthracis*, que le NO produit peut se lier directement à l'acriflavine, un agent intercalant de l'ADN et prooxydant. Cela conduit à l'inactivation de ce composé par nitrosation (Gusarov *et al.* 2009).

Récemment, une étude a mis en avant le rôle de la NOS dans la protection contre un stress oxydant médié par l'hème chez *S. aureus* (Surdel *et al.* 2016). Le NO est impliqué dans l'activation d'un système senseur de l'hème (HssRS) qui contrôle l'expression de gènes dont *hrtB* (système d'efflux) (Surdel *et al.* 2016). La croissance du mutant délété du gène *nos* est peu affectée par la toxicité de l'hème alors que la croissance du double mutant, délété de *nos* et *hrtB*, est réduite de moitié (Surdel *et al.* 2016).

4.1.2) La réponse au stress aux rayons ultra-violets

Une seule étude a été menée chez *D. radiodurans* établissant le lien entre NOS et stress aux rayons ultra-violets (UV) (Patel *et al.* 2009). Un mutant délété du gène *nos* chez *D. radiodurans* est incapable de reprendre sa croissance après un stress UV. Il a été supposé que le NO joue un rôle de régulateur transcriptionnel qui active plusieurs gènes en réponse au stress UV. Parmi ces gènes, le NO active l'expression de *obgE*, codant une GTPase impliquée dans la croissance cellulaire et la réponse au stress. Un traitement avec du NO exogène active l'expression de *obgE* ce qui permet au mutant délété de *nos* de reprendre sa croissance après un stress aux UV (Patel *et al.* 2009).

4.2) La formation de métabolites secondaires

4.2.1) La nitration de la toxine thaxtomine

Streptomyces turgidiscabies est un pathogène de plante responsable de la gale de la pomme de terre (Kers *et al.* 2004). La pathogénicité de *S. turgidiscabies* est due à la thaxtomine, une toxine qui inhibe la synthèse de la paroi chez les plantes (Hogenhout and Loria 2008). La thaxtomine, un dipeptide formé par l'assemblage d'un tryptophane et d'une phénylalanine, est nitrée en position 4 sur le groupement tryptophanyl (Healy *et al.* 2000). La synthèse de la toxine est pratiquement abolie quand le gène *nos* est délété, et l'ajout de l'inhibiteur L-NAME dans le milieu de culture réduit sa synthèse de près de 90% (Kers *et al.* 2004). Les auteurs ont montré que l'azote impliqué dans la nitration du tryptophane est celui provenant de l'arginine marquée (azote de la fonction guanidine, ^{15}N), démontrant le rôle de la NOS dans la synthèse de cette toxine (Kers *et al.* 2004).

4.2.2) La nitration du tryptophane

Les tryptophanyl tRNA synthétases (TrpRS) (EC 6.1.1.2) sont des enzymes impliquées dans l'activation du tryptophane avant d'être chargé sur un ARN de transfert. Cette réaction est ATP-dépendante et conduit, en deux étapes, à la formation du tryptophanyl-tRNA (pouvant être incorporé au cours de la synthèse protéique). Chez *D. radiodurans*, deux TrpRS ont été identifiées (Buddha *et al.* 2004a). TrpRSI est similaire aux autres TrpRS connues chez les bactéries tandis que TrpRSII est spécifique de *D. radiodurans* (Buddha *et al.* 2004a). Il a été montré que TrpRSII et la NOS de *D. radiodurans* sont co-purifiées (Buddha *et al.* 2004a). Cette interaction augmente la solubilité de la NOS, son affinité pour l'arginine (augmentation d'un facteur 4) et son activité (de deux à trois fois plus forte) (Buddha *et al.* 2004a). La NOS et TrpRSII agissent de concert pour produire du 4-nitro-tryptophane *in vitro* (Buddha *et al.* 2004a). La nitration du tryptophane en position 4 est similaire à celle observée chez *S. turgidiscabies* (Kers *et al.* 2004). L'utilisation du 4-nitro-tryptophane *in vivo* chez *D. radiodurans* pourrait avoir un rôle physiologique (Buddha *et al.* 2004b). Cependant, ce rôle n'est pas encore connu.

4.3) Les biofilms

La formation et la dispersion d'un biofilm sont régulées par le di-GMP cyclique chez *B. subtilis* et chez *Pseudomonas aeruginosa* (Chen *et al.* 2012, Ha and O'Toole 2015). Un fort ou un faible niveau intracellulaire de di-GMP cyclique conduit à un mode de vie sessile ou planctonique, respectivement (Hengge 2009). Le taux de di-GMP cyclique dépend notamment de la présence de NO (Barraud *et al.* 2009). Il a été montré que le NO joue un rôle signal dans la dispersion des biofilms chez *P. aeruginosa* (Barraud *et al.* 2006, 2015) mais participe à la formation de biofilm chez *Shewanella oneidensis* (Plate and Marletta 2012).

Ahmo-Almand (2010) a montré qu'un mutant délété du gène *nos* chez *S. aureus* forme un biofilm plus épais qui présente une biomasse plus importante que le biofilm formé par la souche sauvage. Cependant, le ratio surface du biofilm/biomasse est plus faible chez ce mutant en comparaison avec la souche sauvage (Ahmo Almand 2010).

Chez *B. subtilis*, la délétion du gène *nos* conduit à une dispersion accrue d'un facteur 10 du biofilm. Une forte dispersion du biofilm a aussi été observée pour *B. subtilis* cultivé en présence d'un inhibiteur de NOS (Schreiber *et al.* 2011).

4.4) La respiration aérobie et anaérobie

Le rôle du NO produit par la NOS dans le contrôle de la respiration aérobie et anaérobie, a récemment été étudié (Kinkel *et al.* 2016). La caractérisation de mutants délétés du gène *nos* chez *S. aureus* et *B. subtilis* a permis de montrer que le NO contrôle le taux de consommation d'oxygène chez ces bactéries, probablement par inhibition des oxydases terminales de la chaîne respiratoire (Pilet *et al.* 2007, Giuffrè *et al.* 2012, Kinkel *et al.* 2016). Les mutants délétés de *nos* consomment plus rapidement l'oxygène que les souches sauvages. En condition de microaérobie et en présence de nitrate, le mutant *nos* chez *S. aureus* est retardé dans sa capacité à consommer le nitrate ce qui conduit rapidement à une dissipation de son potentiel de membrane, alors que le potentiel de membrane est maintenu chez la souche sauvage (Kinkel *et al.* 2016). La capacité de *S. aureus* à maintenir son potentiel de membrane lui permet de résister à l'action d'antibiotique tel que la daptomycine qui entraîne une dépolarisation membranaire (Silverman *et al.* 2003).

Le NO exogène se lie aux protéines contenant des centres fer-soufre, ce qui entraîne leur inactivation. Par exemple, la fixation du NO sur le centre fer-soufre de l'aconitase de

Burkholderia mallei, une enzyme du cycle de Krebs, inhibe cette enzyme (Jones-Carson *et al.* 2008). De nombreux régulateurs transcriptionnels ont des centres fer-soufre sur lesquels le NO peut se fixer (Green *et al.* 2014). Par exemple, le FNR (Fumarate Nitrate reduction Regulator) est un régulateur transcriptionnel possédant un centre fer-soufre [4Fe-4S] sensible à l'oxygène. Chez *E. coli* K12, le FNR régule l'expression de nombreux gènes dont ceux impliqués dans le métabolisme anaérobie (ex : réduction du nitrate/nitrite, fermentation) (Myers *et al.* 2013). L'interaction du NO avec les atomes de fer du centre fer-soufre de FNR forme un complexe fer-dinitroso qui entraîne une perte de l'activité de liaison à l'ADN *in vitro* ainsi qu'une perte de l'expression des gènes FNR-dépendante *in vivo* (Cruz-Ramos *et al.* 2002, Crack *et al.* 2013). L'inactivation de FNR par le NO est un mécanisme permettant de limiter la toxicité du NO.

Chez *S. aureus*, le système à deux composantes AirRS (anciennement YhcRS) agit comme un régulateur global en condition anaérobie, et contrôle l'expression, soit par activation soit par inhibition, de plus de 350 gènes incluant ceux codant le système Agr impliqué dans le quorum sensing, des facteurs de virulence comme la capsule et la protéine A, *nreABC* impliqués dans la respiration nitrate (Green *et al.* 2014). La région N-terminale de la protéine AirS possède un centre fer-soufre [2Fe-2S]. Cette protéine a une activité kinase lui permettant de phosphoryler AirR qui, une fois phosphorylée, active l'expression de gènes cibles. Il a été montré, *in vitro*, que la fixation du NO sur le centre fer-soufre d'AirS entraîne une perte de l'activité kinase (Sun *et al.* 2012).

RESULTATS

**MISE EN EVIDENCE D'UNE ACTIVITE OXYDE
NITRIQUE SYNTHASE CHEZ
*STAPHYLOCOCCUS XYLOSUS***

Contexte de l'étude

S. xylosus est un ferment particulièrement utilisé pour sa contribution au développement et à la stabilité de la couleur des produits carnés *via* son activité nitrate réductase qui réduit le nitrate en nitrite. Le nitrite est chimiquement réduit en NO. Le NO va se lier au fer du groupement hème de la myoglobine pour former de la nitrosomyoglobine, le pigment rouge et stable typique de la couleur des salaisons. Cependant, l'utilisation du nitrate/nitrite dans la fabrication des produits carnés est remise en question, notamment à cause du risque de formation de composés cancérigènes tels que les nitrosamines. Une alternative innovante à l'utilisation de ces additifs pour le développement de la couleur pourrait reposer sur l'utilisation de ferments capables de générer du NO. Il a été montré que *S. xylosus* peut convertir la metmyoglobine en nitrosomyoglobine *in vitro* et *in situ* dans des produits carnés. Cependant, le mécanisme de production du NO n'était pas démontré.

Nous avons émis l'hypothèse que le NO pouvait être généré *via* une activité oxyde nitrique synthase (NOS). Cette enzyme produit de la citrulline et du NO à partir de l'arginine. Le gène *nos* a été identifié chez différentes espèces de staphylocoques mais l'activité NOS n'a été démontrée que chez *Staphylococcus aureus*. Pour démontrer l'implication de la NOS de *S. xylosus* dans la production de NO, nous avons construit un mutant de délétion du gène *nos* chez la souche *S. xylosus* C2a. La production de NO a été évaluée sur sa capacité à former du nitrosohème à partir de la metmyoglobine. Le rôle de la NOS en réponse à un stress oxydant a également été étudié.

Résultats de l'étude

- Nous avons construit un mutant de délétion du gène *nos* (Δnos) chez *S. xylosus* C2a par insertion d'une cassette de résistance à l'érythromycine dans la séquence codante de ce gène. La délétion/insertion a été confirmée par PCR puis séquençage. Ce mutant a été complété avec le gène *nos* cloné avec son promoteur putatif dans le vecteur pRB473 (Δnos pRB*nos*).
- La croissance de la souche *S. xylosus* C2a et des mutants (Δnos , Δnos pRB*nos*) a été évaluée en milieu complexe à 30°C pendant 24 heures. En condition aérobie, le mutant Δnos présente un léger retard de croissance en comparaison de la souche sauvage et du

mutant complémenté $\Delta nosRBnos$. Aucune différence de croissance n'a été observée en condition microaérobie (Bioscreen).

- La croissance de *S. xylosus* C2a et des mutants (Δnos , $\Delta nosRBnos$) a été évaluée dans un milieu minimum dépourvu d'acides aminés, en condition microaérobie. Le mutant Δnos est incapable de croître et sa croissance n'est pas restaurée par la complémentation. Chez *S. xylosus* C2a, nous avons montré que le gène *nos* forme un opéron avec le gène *pdt*, qui code la préphénate déshydratase, une enzyme impliquée dans la voie de biosynthèse de la phénylalanine. Nous avons supposé que l'insertion de la cassette érythromycine a entraîné un effet polaire sur l'expression du gène *pdt*. En effet l'addition de phénylalanine dans le milieu minimum restaure la croissance du mutant déficient Δnos et du complémenté $\Delta nosRBnos$. Deux autres complémentations ont été réalisées : le mutant Δnos complémenté avec le gène *pdt* ($\Delta nosRBpdt$) ou avec l'opéron *nos-pdt* ($\Delta nosRBnospdt$). Les deux mutants complémentés sont capables de croître en milieu minimum, montrant que seul *pdt* est requis pour la croissance dans cette condition.
- La capacité de production de NO chez *S. xylosus* C2a a été évaluée par un test basé sur la metmyoglobine. La metmyoglobine a la capacité de réagir avec l'oxygène ou le NO conduisant à la formation de deux pigments rouges l'oxymyoglobine et la nitrosomyoglobine, respectivement, dont les maxima d'absorption sont quasiment identiques et proches de λ_{540nm} et λ_{580nm} . Afin de déterminer les conditions optimales de ce test, nous avons inoculé la souche C2a dans un milieu supplémenté en metmyoglobine incubé à 30°C, en condition limitée en oxygène (sous huile) ou sous agitation (150 rpm), et suivi la formation de ces pigments au cours du temps par spectrométrie. La formation de ces pigments augmente au cours du temps (Figure 20). Elle est maximale à partir de 24h en condition limitée en oxygène (Figure 20A) pour une population de 8 log CFU/ml proche de la population initiale. En condition aérobie, la formation du pigment n'a été observée qu'après 24h et elle maximale à 30 et 48 h d'incubation (Figure 20B). La population est de 9 log CFU/ml à 24h et commence à lyster à 48h. Ces résultats ont conduit à choisir le temps 24 h pour mesurer la formation de pigments rouges dans les deux conditions chez *S. xylosus* C2a et les mutants (Δnos , $\Delta nosRBnos$). Dans les deux conditions d'oxygénation, la formation des pigments rouges est fortement réduite chez le mutant Δnos et restaurée au niveau du sauvage

pour le mutant complétement ($\Delta nospRBnos$). Pour distinguer les deux pigments, l'oxymyoglobine et la nitrosomyoglobine, nous avons extrait le nitrosohème des surnageants de culture. La formation du nitrosohème est réduite chez le mutant Δnos en condition limitée en oxygène et abolie en condition aérobie. Pour évaluer la contribution de *pdt* dans la formation des pigments rouges, nous avons mesuré l'activité des mutants complétements $\Delta nospRBpdt$ et $\Delta nospRBnospdt$. L'activité du mutant complétement $\Delta nospRBpdt$ est identique à celle du mutant Δnos tandis que celles du complétement $\Delta nospRBnospdt$ et de la souche sauvage sont identiques. Par conséquent, seule la NOS est impliquée dans la formation de NO.

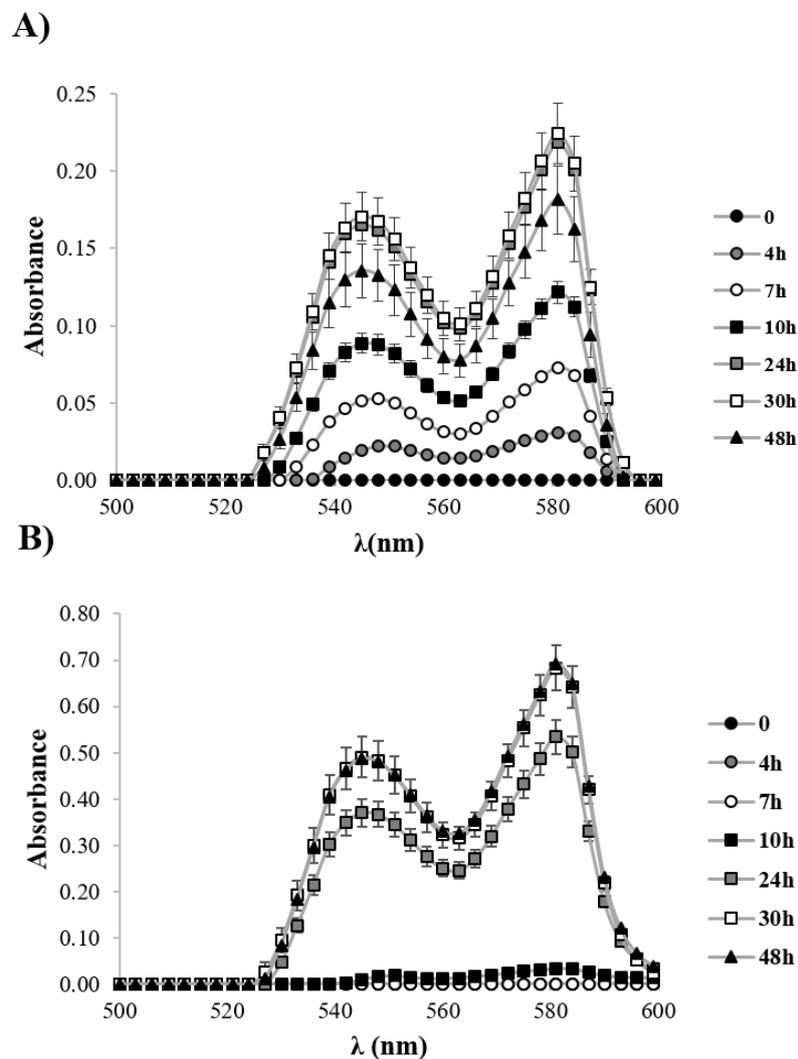


Figure 20. Cinétique de conversion de la metmyoglobine par *S. xylosus* C2a A) en condition limitée en oxygène (sous huile) et **B)** sous agitation (150 rpm).

- Nous avons constaté en culture gélosée une pigmentation orange accrue chez les mutants Δnos et $\Delta nospRBpdt$ comparée à celle de la souche sauvage et des mutants

$\Delta nospRBnos$ et $\Delta nospRBnos\Delta dt$. Après extraction et mesure de l'absorbance à 460 nm, nous avons confirmé que la production de ce pigment de type caroténoïde est significativement supérieure chez le mutant Δnos comparée à la souche sauvage et au mutant complémenté $\Delta nospRBnos$.

- Nous avons mis en évidence le rôle de la NOS dans la défense contre un stress oxydant chez *S. xylosus* C2a. Ainsi, un traitement à l' H_2O_2 entraîne chez le mutant Δnos une perte de viabilité de 5 log alors que la survie de la souche sauvage et du mutant complémenté $\Delta nospRBnos$ n'est pas affectée. Chez le mutant complémenté, le gène *nos* est fortement surexprimé après 6 et 24 heures de croissance. Cependant, aucune différence de survie n'a été observée entre la souche sauvage et le mutant complémenté. A noter que la surexpression du gène *nos* chez le mutant complémenté n'a pas augmenté la capacité de ce mutant à former du nitrosohème.
- Etant donné le rôle de la NOS contre le stress oxydant, nous avons évalué s'il pouvait y avoir une interaction avec les trois catalases de *S. xylosus*, enzymes clés contre ce stress. L'expression des gènes codant ces catalases a été mesurée par RT-qPCR après 6 et 24 heures de croissance en condition aérobie chez *S. xylosus* C2a et les mutants Δnos et $\Delta nospRBnos$. Le gène *katA* est fortement surexprimé chez le mutant Δnos aux deux temps d'incubation. A contrario, *katB* et *katC* sont réprimés chez le mutant Δnos après 24 heures d'incubation. Les gènes *katA*, *katB* et *katC* ne sont pas différenciellement exprimés chez le mutant complémenté $\Delta nospRBnos$ en comparaison de la souche sauvage.

Résultats complémentaires

Expression du gène nos

L'expression du gène *nos* de la souche *S. xylosus* C2a a été évaluée par RT-qPCR sur des cultures incubées en milieu complexe (TSB) ou en milieu chimiquement défini et minimum (MX), en condition aérobie ou de faible oxygénation, à 30°C et à différents temps (2h, 6h et 24h). L'expression du gène *nos* n'a pas varié au cours du temps, quels que soient le milieu de culture et la condition d'oxygénation. De plus, l'ajout de metmyoglobine dans le TSB n'a pas influencé l'expression du gène *nos*. L'expression de ce gène n'a pas non plus été modulée en réponse à un stress H_2O_2 (150 mM pendant 30 min).

Mesure de l'activité NOS

Plusieurs méthodes sont décrites dans la littérature, certaines sont basées sur le dosage de la citrulline, qui constitue avec le NO les produits terminaux de la réaction catalysée par la NOS, d'autres sur le dosage du nitrate et du nitrite considérés comme les produits terminaux de l'oxydation du NO et d'autres sur l'utilisation de sondes fluorescentes réagissant avec le NO. Nous avons testé ces trois approches.

Dosage de la citrulline

Dans notre étude, nous avons utilisé un kit de dosage colorimétrique (L-Citrullin Kit, Immundiagnostik) pour comparer la production de citrulline à partir de contenus intracellulaires de la souche *S. xyloso* C2a et du mutant Δnos qui ont été incubés en présence d'arginine ou de NOHA à différentes concentrations (1 à 5 mM) et à différents temps d'incubation (7, 15, 30 minutes). Dans toutes ces conditions, les quantités de citrulline produites étaient identiques à celle de l'échantillon témoin (mélange réactionnel sans contenu intracellulaire) incubé dans les mêmes conditions. Sanchez Mainar *et al.* (2014) ont évalué l'activité NOS de 86 souches de SCN incubées dans différentes conditions d'aération, par mesure de la conversion d'arginine en citrulline par HPLC et une seule souche a produit de la citrulline. D'autres auteurs ont évalué la formation de citrulline radioactive lors de la conversion d'arginine tritiée chez *S. aureus*, à partir d'extraits bruts ou de l'enzyme purifiée (Choi *et al.* 1997, Hong *et al.* 2003).

Dosage du nitrite et du nitrate

Ces composés sont quantifiés par un dosage colorimétrique basé sur la réaction de Griess (Bryan and Grisham 2007). Ce dosage est fréquemment utilisé lors d'études de la NOS des eucaryotes qui peut produire du NO à des quantités de l'ordre du micromolaire (Krieglstein *et al.* 2001). Ce dosage a permis de quantifier l'activité de la NOS de *S. aureus* (Bird *et al.* 2002). Ces auteurs ont mesuré son activité à partir d'une enzyme purifiée incubée dans un tampon en présence du substrat intermédiaire de la NOS, le N-hydroxy-L-arginine (NOHA), et en présence d'H₂O₂. L'H₂O₂ est ajouté pour fournir de l'oxygène et des électrons nécessaires à la réaction.

Pour notre étude, nous avons utilisé les contenus intracellulaires des souches *S. xyloso* C2a et du mutant Δnos qui ont été incubés en présence de NOHA à différentes concentrations (0.5 à 5 mM) et en présence ou non d'H₂O₂, à différents temps d'incubation (7, 15, 30 minutes).

Dans toutes ces conditions, nous n'avons pas pu quantifier de nitrate/nitrite, le seuil de détection de la méthode étant de 10 μM dans nos conditions. Nous avons également évalué la production de nitrite chez la souche *S. aureus* ATCC 6538P pour laquelle une activité NOS avait été dosée (Choi et al. 1997). Le contenu intracellulaire de cette souche a été incubé en présence d'arginine ou de NOHA et dans les conditions décrites par Hong *et al.* (2003) comme étant optimales de l'activité NOS de *S. aureus*. C'est-à-dire, une incubation de 7 min à 47,5°C en présence des cofacteurs NADPH, FAD, FMN, H₄B, calmoduline et CaCl₂. Cependant, nous n'avons pas mis en évidence de production de nitrite dans ces conditions. L'activité NOS de cette souche avait été initialement dosée *via* la synthèse de citrulline tritiée, une méthode de dosage beaucoup plus sensible.

Détection du NO avec des sondes fluorescentes

Nous avons utilisé deux sondes fluorescentes permettant la détection du NO : CuFL et DAF-FM Diacétate.

La sonde CuFL (07-0293, Strem Chemicals) est un complexe formé par un ion cuivre (Cu^{2+}) et une molécule de fluorescéine (FL). La réaction du NO avec ce complexe entraîne une réduction du Cu^{2+} ce qui libère la molécule FL. La nitrosation de la molécule FL par le NO forme un complexe (FL-NO) fluorescent (Lim *et al.* 2006).

La sonde DAF-FM Diacétate (MP 23841, Thermo Fisher Scientific) diffuse facilement au travers des membranes cellulaires. Une fois à l'intérieur de la cellule, cette sonde est déacétylée par des estérases intracellulaires et libère la molécule DAF-FM dont la fluorescence est faible. La fluorescence augmente fortement après réaction avec le NO.

Ces sondes ont été utilisées dans deux études pour comparer la production intracellulaire de NO entre une souche de *S. aureus* et le mutant délété du gène *nos* correspondant (van Sorge *et al.* 2013, Sapp *et al.* 2014). Dans l'étude de van Sorge *et al.* (2013), les cellules, collectées à partir de culture en bouillon, étaient incubées en tampon en présence d'arginine et de la sonde CuFL puis observées par microscopie à épifluorescence. Dans l'étude de Sapp *et al.* (2014), les cellules ont été collectées à partir de culture en milieu gélosé, incubées en tampon en présence de la sonde DAF-FM Diacétate et la fluorescence a été mesurée avec un lecteur de fluorescence. Dans ces deux études, une différence de fluorescence a été notée entre les souches sauvages et les mutants délétés du gène *nos*.

Détection par microscopie à épifluorescence

Dans une première étude, nous nous sommes attachés à comparer la production intracellulaire de NO entre la souche *S. xylosus* C2a et le mutant Δnos en utilisant les deux sondes.

Les souches ont été cultivées en TSB pendant 20 h à 30°C. Les cellules ont été lavées en tampon BisTris (50mM, pH 6.5) puis reprises à une DO de 10 dans ce même tampon en présence de 20 μ M de la sonde CuFL ou de la sonde DAF-FM Diacétate. Les cellules ont été incubées à 37°C pendant 45 min et 90 min avec la sonde CuFL et DAF-FM, respectivement.

La fluorescence a été observée par microscopie à épifluorescence (Figure 21). Aucune différence de fluorescence n'a été observée entre la souche sauvage et le mutant Δnos quelle que soit la sonde utilisée.

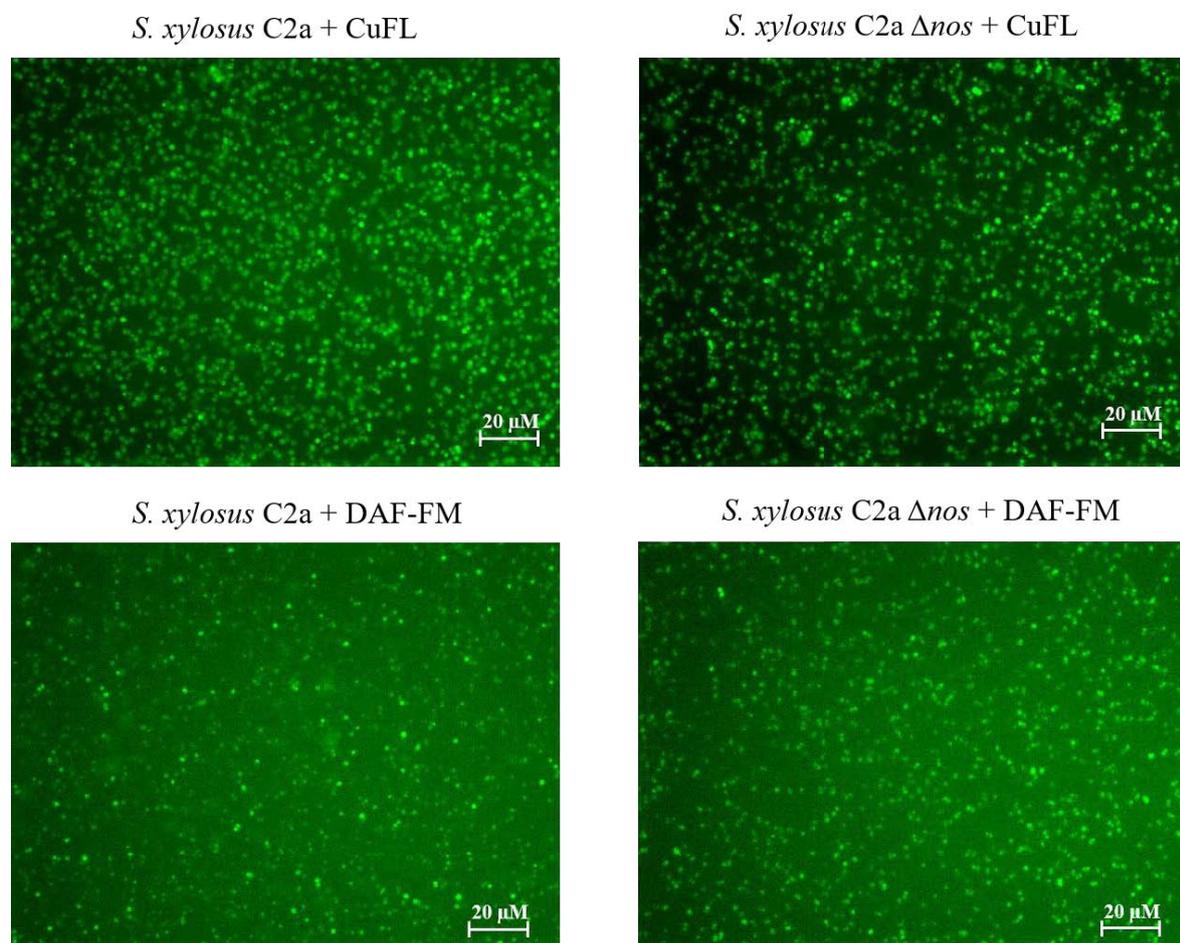


Figure 21. Détection du NO intracellulaire par des sondes fluorescentes. Les cellules de *S. xylosus* C2a et du mutant Δnos ont été incubées en tampon BisTris (50 mM, pH 6.5) avec 20 μ M de la sonde CuFL ou DAF-FM. Observation en microscopie à épifluorescence, filtre FITC, Objectif x63.

Estimation par fluorimétrie

L'estimation de la production de NO a été effectuée uniquement avec la sonde DAF-FM, car la sonde CuFL auto-fluoresce dans ces conditions probablement due à sa dégradation.

La souche *S. xyloso*s C2a et les mutants (Δnos et $\Delta nospRBnos$) ont été cultivés sur milieu gélosé (TSA) pendant 26 h, 48h et 72h à 30°C. Les cellules ont été collectées et lavées en tampon BisTris (50 mM, pH 6.5), puis normalisées à une DO de 10 dans ce tampon contenant 5 μ M de DAF-FM Diacétate et incubées 90 min à 37°C. La fluorescence a été mesurée sur un lecteur de microplaque (Mithras LB 940, Berthold Technologies) au moyen d'un filtre FITC ($\lambda_{excitation}= 485nm$ et $\lambda_{émission}= 535nm$). Trois réplicats biologiques ont été réalisés. Il apparaît très nettement qu'il n'y a pas de reproductibilité dans la mesure de la fluorescence au niveau des réplicats, quels que soient les temps de collecte des cellules sur le milieu gélosé (Figures 22 et 23, collecte à 26h et 48h). La même variabilité de résultats a été observée avec des souches cultivées sur TSA pendant 72h. Nous avons obtenu les mêmes résultats après culture en milieu liquide. De ce fait, il n'a pas été possible d'estimer la production de NO chez *S. xyloso*s C2a et ses mutants.

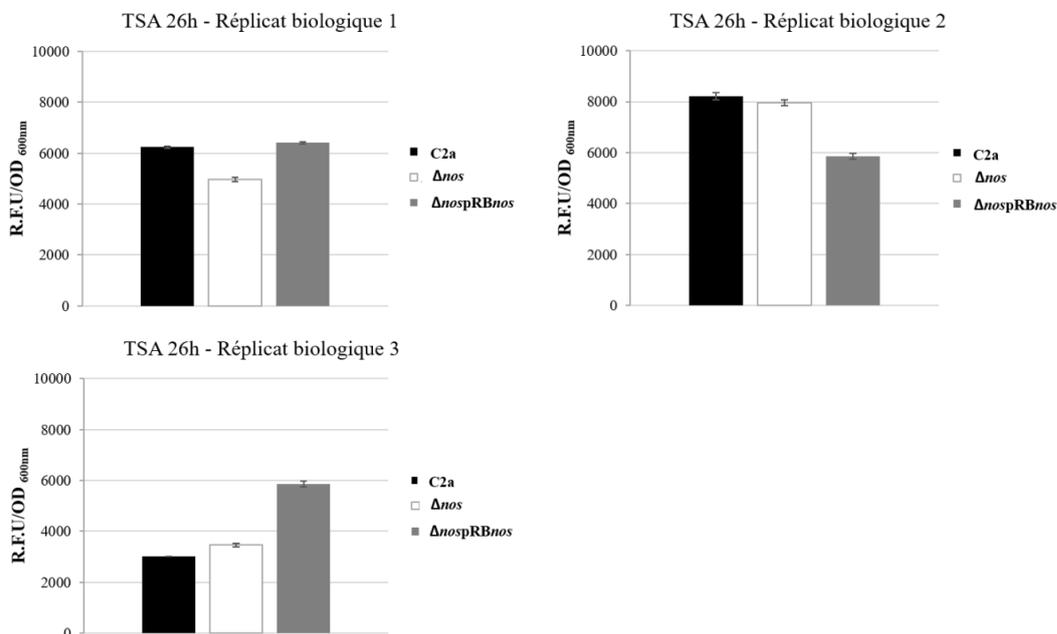


Figure 22. Estimation de la production intracellulaire de NO chez *S. xyloso*s C2a et les mutants (Δnos et $\Delta nospRBnos$) après 26h de culture sur gélose TSA.

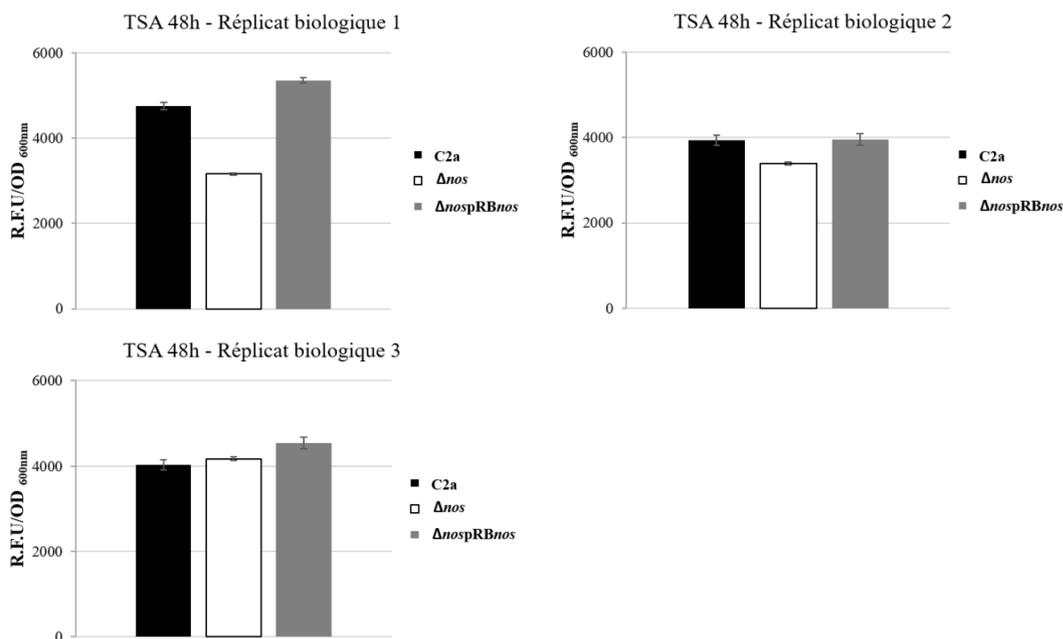


Figure 23. Estimation de la production intracellulaire de NO chez *S. xylosois* C2a et les mutants (Δnos et $\Delta nospRBnos$) après 48h de culture sur gélose TSA.

Rôle du substrat et des cofacteurs dans la production de NO

Dans les expériences précédentes, ni le substrat ni les cofacteurs n'avaient été ajoutés dans le milieu réactionnel. De ce fait, nous avons réalisés de nouveaux essais intégrant ces facteurs.

La souche *S. xylosois* C2a et le mutant Δnos ont été cultivés en TSB pendant 20h à 30°C. Les cellules ont été lavées en tampon BisTris (50mM, pH 6.5) puis reprises à une DO de 10 dans ce tampon 1) sans substrat, 2) arginine (1 mM), 3) arginine et cofacteurs (NADPH 1mM, FAD 10 μ M, FMN 10 μ M, H₄B 20 μ M, calmoduline 2 μ g/ml et CaCl₂ 1mM), 4) NOHA (1 mM), 5) NOHA et cofacteurs (comme précédemment). Des témoins substrats et cofacteurs ont été réalisés. Dans tous les essais, 5 μ M de DAF-FM Diacétate ont été ajoutés et l'incubation a été réalisée 90 min à 37°C.

Il apparait que l'arginine n'influence pas la production de NO chez la souche C2a et le mutant Δnos dans ces conditions (Figure 24). Les témoins NOHA et cofacteurs présentent un niveau élevé et très élevé de fluorescence, respectivement (Figure 24). De ce fait, nous ne pouvons pas conclure sur le rôle des cofacteurs dans la production de NO ni sur le potentiel des souches à produire du NO à partir du NOHA.

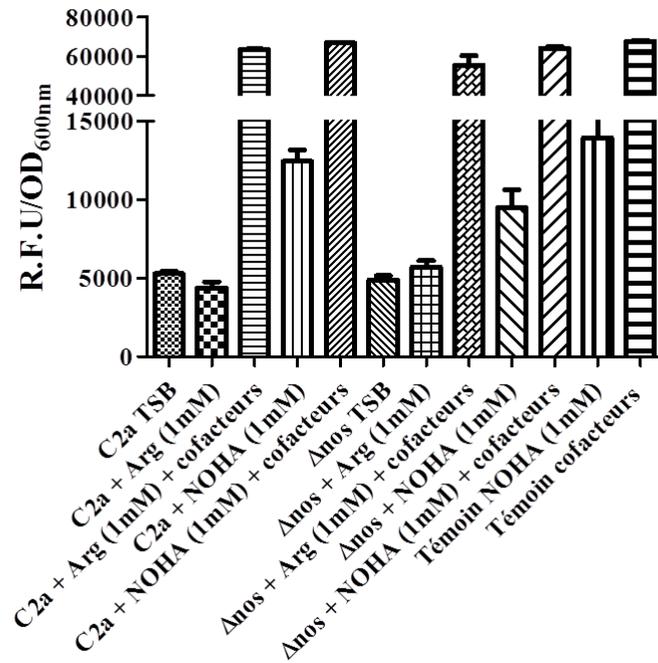


Figure 24. Impact des substrats et des cofacteurs de la NOS sur la production de NO chez *S. xylosus* C2a et son mutant Δnos .

En conclusion, il n'a pas été possible d'utiliser ni la quantification de la citrulline et du nitrate/nitrite ni les approches basées sur la fluorescence pour étudier la production de NO chez *S. xylosus* C2a et ses mutants.

ARTICLE 1

Publié dans le journal : **Frontiers in Microbiology**

Section: Food Microbiology

**Evidence for Nitric Oxide Synthase Activity in *Staphylococcus xylosus*
Mediating Nitrosoheme Formation**

Geoffrey Ras, Véronique Zuliani, Patrick Derkx, Tim M. Seibert, Sabine Leroy and Régine Talon



Evidence for Nitric Oxide Synthase Activity in *Staphylococcus xylosus* Mediating Nitrosoheme Formation

Geoffrey Ras^{1,2}, Véronique Zuliani², Patrick Derkx³, Tim M. Seibert⁴, Sabine Leroy^{1*} and Régine Talon^{1*}

¹ Université Clermont Auvergne – INRA, MEDIS, Clermont-Ferrand, France, ² CHR. HANSEN SAS, Saint Germain les Arpajon, France, ³ CHR. HANSEN A/S, Hørsholm, Denmark, ⁴ CHR. HANSEN GmbH, Pohlheim, Germany

OPEN ACCESS

Edited by:

Giovanna Suzzi,
University of Teramo, Italy

Reviewed by:

Giuseppe Blaiotta,
Università degli Studi di Napoli
Federico II, Italy
Maria João Fraqueza,
Universidade de Lisboa, Portugal

*Correspondence:

Sabine Leroy
sabine.leroy@inra.fr
Régine Talon
regine.talon@inra.fr

†These authors have contributed
equally to this work.

Specialty section:

This article was submitted to
Food Microbiology,
a section of the journal
Frontiers in Microbiology

Received: 31 January 2017

Accepted: 23 March 2017

Published: 06 April 2017

Citation:

Ras G, Zuliani V, Derkx P,
Seibert TM, Leroy S and Talon R
(2017) Evidence for Nitric Oxide
Synthase Activity in *Staphylococcus*
xylosus Mediating Nitrosoheme
Formation. *Front. Microbiol.* 8:598.
doi: 10.3389/fmicb.2017.00598

Staphylococcus xylosus is used as a starter culture in fermented meat products and contributes to color formation by the reduction of nitrate to nitrite. Nitrite is a food additive that is chemically turned to nitric oxide (NO) in meat but its safety has been questioned. The objective of this study was to determine the ability of NO synthase (NOS) of *S. xylosus* C2a to produce NO. For this purpose, a *nos* deletion mutant (Δnos) in *S. xylosus* was constructed and NO production was evaluated in a test based on its ability to form nitrosomyoglobin and nitrosoheme. Production of NO was abrogated in the Δnos mutant under aerobic conditions and reduced about 35-40% comparing to the wild type C2a under limited oxygenation. This mutant was sensitive to oxidative stress. The expression of genes encoding catalase was modulated in the mutant with an up-regulation of *katA* and a down-regulation of *katB* and *katC*. The Δnos mutant displayed high colony pigmentation after prolonged growth on agar medium. Finally, the Δnos mutant showed no growth in minimal medium. Growth was not restored in the minimal medium by complementation with *nos*, but was restored by either addition of phenylalanine or complementation with *pdt*, a gene that encodes a prephenate dehydratase involved in phenylalanine biosynthesis and co-transcribed with *nos*. Our findings clearly demonstrate NOS-mediated NO production in *S. xylosus*, a meat-associated coagulase-negative *Staphylococcus*.

Keywords: nitric oxide synthase, nitric oxide, nitrosoheme, *Staphylococcus xylosus*, coagulase-negative *Staphylococcus*, oxidative stress

INTRODUCTION

Staphylococcus xylosus, a coagulase-negative *Staphylococcus* (CNS), is commonly used as starter culture to boost color development of cured meat products such as dried fermented sausages (Talon and Leroy, 2006). The typical reddish color relies on the presence of the curing salts, nitrate and nitrite. Nitrate salts are reduced to nitrite by nitrate reductase activity of *S. xylosus* (Talon et al., 1999; Götterup et al., 2008). Nitrite is subsequently converted by chemical reactions to nitric oxide (NO), which is able to bind to the ferrous heme-iron to form the stable red nitrosomyoglobin pigment (Götterup et al., 2007, 2008).

The use of the curing agents nitrate and nitrite is regulated by law, with specific indications in the United States (Code of Federal Regulations, 2016) and Europe (Commission Regulation [EU], 2011). Nowadays, the safety regarding the use of such additives on meat products is questioned.

Nitrites can react with secondary amine groups of muscle proteins as well as compounds present in the gastrointestinal tract to form undesired N-nitroso compounds such as nitrosamines, which could pose a health threat (Honikel, 2008). The meat industry is therefore looking for alternatives to decrease nitrate/nitrite in the production of meat products.

Staphylococcus xylosus has been shown to convert metmyoglobin to nitrosomyoglobin in culture medium, in salami (Morita et al., 1998) and in raw meat batter (Li et al., 2013, 2016), without addition of nitrate or nitrite. NO production has been suggested to be linked to NO synthase (NOS) activity. NOS catalyzes the production of NO from L-arginine and was initially described in mammals (Alderton et al., 2001). Homologs of the oxygenase domain of mammalian NOS were identified in Gram-positive bacteria. NOS is involved in the production of NO by *Bacillus subtilis* (Gusarov and Nudler, 2005; Gusarov et al., 2008), *Bacillus anthracis* (Shatalin et al., 2008), *Bacillus cereus* (Montgomery et al., 2010), *Geobacillus stearothermophilus* (Kabir et al., 2008), *Streptomyces turgidiscabies* (Kers et al., 2004), *Deinococcus radiodurans* (Patel et al., 2009), and *Staphylococcus aureus* (van Sorge et al., 2013). *S. aureus* NOS is involved in resistance to oxidative stress and antibiotics, and virulence (Vaish and Singh, 2013; van Sorge et al., 2013; Sapp et al., 2014). In all sequenced *S. aureus* genomes, the *nos* gene is part of a cluster containing another gene encoding a prephenate dehydratase, which is involved in phenylalanine biosynthesis. This genetic organization appears to be unique to staphylococcal genomes (Sapp et al., 2014). The *nos* genes have been identified in many staphylococci (van Sorge et al., 2013; Sánchez-Mainar et al., 2014; Sapp et al., 2014), but NOS-mediated NO production has only been characterized in the pathogenic *S. aureus*. The contribution of the NOS activity of *S. xylosus* to formation of nitrosomyoglobin remains to be demonstrated.

In an attempt to determine the ability of *S. xylosus* NOS to produce NO, we generated a *nos* deletion mutant in the *S. xylosus* C2a strain. NO production in *S. xylosus* C2a and mutants was investigated using an assay based on the conversion of metmyoglobin to red pigment derivatives followed by an extraction of nitrosoheme. We also assessed the sensitivity of the mutants to oxidative stress.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial Strains and Growth Conditions

The bacterial strains and plasmids used in this study are listed in **Table 1**. Experiments were performed using *S. xylosus* strain C2a or its isogenic mutants. *S. xylosus* was routinely cultured in Tryptic Soy Broth (TSB, Difco) under aerobic conditions (1:10 volume to flask ratio, 150 rpm) or on Tryptic Soy Agar (TSA, Difco) at 30°C. When required, strains were grown in a minimal medium (MX) as already described (Fiegler and Brückner, 1997). The MX medium, when needed, was supplemented with amino acids (100 mg/L). For genetic manipulation, *Escherichia coli* was cultured in Luria–Bertani (LB, Difco) broth with shaking aeration (150 rpm) or on LB agar (Difco) at 37°C. Antibiotics,

when required to maintain plasmids or select recombinants, were added at the following concentrations: for *E. coli*, 100 µg/mL ampicillin; for *S. xylosus*, 20 µg/mL chloramphenicol, or 2.5 to 10 µg/mL erythromycin. All chemicals were from Sigma–Aldrich.

To compare growth kinetics under microaerobic conditions, overnight cultures of *S. xylosus* were diluted to an optical density (OD) of 0.05 to 0.10 at 600 nm and incubated in 100-well microtiter plates with shaking at 30°C in a Bioscreen C plate reader (Labsystems France) while the turbidity was monitored every 30 min for 24 h. Three independent experiments were done for each set of conditions.

DNA Manipulation

Genomic DNA from *S. xylosus* was prepared from overnight cultures. Briefly, cells were resuspended in Tris-EDTA-sucrose buffer containing 0.1 mg/mL lysostaphin (Sigma-Aldrich) and incubated for 30 min at 37°C. Cells were lysed with sodium dodecyl sulfate and treated with RNase A. Following extraction with phenol-chloroform-isoamyl alcohol (25/24/1) and chloroform, DNA was precipitated with ethanol and resuspended in Tris-EDTA buffer (pH 8.0). Plasmid DNA from *E. coli* was isolated using the NucleoSpin Plasmid Quick-Pure kit (Macherey-Nagel). Restriction digests were performed using high-fidelity restriction enzymes (New England Biolabs). Ligations were performed using T4 DNA ligase (Roche). Amplifications were performed using Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs) for cloning and GO Taq DNA polymerase (Promega) for standard purposes. PCR products were visualized by 0.8% agarose gel electrophoresis and ethidium bromide staining, and imaged on a Gel Doc 2000 (Bio-Rad). As required, they were purified using the QIAquick Gel Extraction kit (Qiagen). DNA sequencing was performed by GATC Biotech (Mulhouse, France).

Construction of *S. xylosus* NO Synthase Mutant

The oligonucleotides used in this study were designed based on the genome sequence of *S. xylosus* C2a (GenBank accession no. LN554884) and are listed in **Table 2**. A chromosomal *nos* disruption mutant was constructed by deletion of the *nos* coding sequence corresponding to amino acids 11 to 345 (out of 354) and insertion of an erythromycin resistance cassette (*ermB*) using the temperature-sensitive vector pBT2. Briefly, a 756-bp upstream fragment and a 783-bp downstream fragment were separately amplified by using the genomic DNA of *S. xylosus* C2a as template. The *ermB* gene was amplified from the pEC4 vector generating an amplicon of 1,366-bp. The three purified PCR products were annealed by overlapping PCR using the outside primers and inserted into pBT2 using appropriate restriction enzymes. The resulting plasmid was constructed in competent *E. coli* TOP10 and introduced into *S. xylosus* C2a by electroporation as described (Götz et al., 1983; Brückner, 1997). Gene replacement was allowed to take place by incubating the temperature-sensitive plasmid at 42°C as described (Brückner, 1997).

TABLE 1 | List of strains and vectors used in this study.

Strain or plasmid	Relevant characteristics	Source or reference
Staphylococcus xylosus		
C2a	Derived from the type strain DSM20267 and genetically transformable strain	Götz et al., 1983, LN554884
Δnos	Isoogenic mutant of C2a deleted of the SXYL_00923 gene, $\Delta nos::ermB$	This study
$\Delta nospRBnos$	Δnos complemented with <i>nos</i>	This study
$\Delta nospRBpdt$	Δnos complemented with <i>pdt</i> (SXYL_00922)	This study
$\Delta nospRBnospdt$	Δnos complemented with <i>nospdt</i>	This study
C2apRB473	C2a containing empty vector pRB473	This study
C2apRB474	C2a containing empty vector pRB474	This study
$\Delta nospRB473$	Δnos containing empty vector pRB473	This study
$\Delta nospRB474$	Δnos containing empty vector pRB474	This study
Escherichia coli		
TOP10	Competent strain for plasmid transformation	Invitrogen
Plasmids		
pBT2	<i>E. coli</i> - <i>S. xylosus</i> thermosensitive shuttle vector, Ap ^R Cm ^R	Brückner, 1997
pEC4	pBluescript KS + derivative. Source of <i>ermB</i> gene (EmR). ApR	Brückner, 1997
pRB473	Shuttle vector Ap ^R and Cm ^R	Brückner, 1992
pRB474	Shuttle vector Ap ^R and Cm ^R	Brückner, 1992
pBT Δnos	pBT2, SXYL_00923 [13-317]:: <i>ermB</i> shuttle vector	This study
pRBnos	pRB473 derivate for expression of <i>nos</i>	This study
pRBpdt	pRB474 derivate for expression of <i>pdt</i>	This study
pRBnospdt	pRB473 derivate for expression of <i>nos</i> and <i>pdt</i>	This study

Successful C2a Δnos mutant was screened for resistance to erythromycin and sensitivity to chloramphenicol, indicating loss of the pBT2 backbone, and this was confirmed by PCR and sequencing.

Creation of Complementation Plasmids

Complementation of the *nos* mutation was performed by amplifying the *nos* gene with its putative promoter. The corresponding amplicon was cloned into the shuttle vector pRB473 using appropriate enzymes, generating pRBnos. Similarly, an *nos-pdt* complementation vector (pRBnospdt) was constructed. A complementation vector pRBpdt was constructed, placing the expression of *pdt* under the constitutive promoter of pRB474. All PCR-amplified fragments were verified by sequencing. The resulting plasmids were constructed in competent *E. coli* TOP10 and introduced into *S. xylosus* C2a Δnos by electroporation according to an established protocol (Brückner, 1997).

Metmyoglobin Conversion and Assessment of Nitrosoheme Formation

A 20 mg/mL metmyoglobin solution was freshly prepared from equine heart myoglobin (Sigma-Aldrich) as described (Gündoğdu et al., 2006). Overnight *S. xylosus* cultures were inoculated in TSB supplemented with 2 mg/mL metmyoglobin to a final OD_{600 nm} of 0.5 (8 log CFU/mL). Cultures were incubated either under limited oxygenation (covered with mineral oil and without stirring) or under aerobic conditions as described above. After 24 h of incubation at 30°C, OD_{600 nm} and pH of the cultures were measured and cells were serial-diluted and plated on TSA for enumeration. Cultures were centrifuged and supernatants

were used to measure the absorbance spectrum between 500 and 600 nm (BioMate 3, Thermo Fisher Scientific) using as control a solution of sterile TSB supplemented with metmyoglobin and incubated in the same conditions. Finally, supernatants were treated with acetone 1:4 (v/v) to extract the nitrosoheme from nitrosomyoglobin, and the absorbance spectrum was acquired between 450 and 640 nm (V-770 UV/visible, Jasco). Sterile TSB supplemented with metmyoglobin and extracted with acetone was used as control. Experiments were carried out in three independent biological replicates.

Analysis of colony pigmentation

After overnight growth in TSB, *S. xylosus* strains were plated on TSA. After 2 days of growth (when pigmentation is strongest), 100 mg of each strain was collected from plates and pigments were extracted and quantified according the method of Morikawa et al. (2001). Briefly, cells were washed once in water, centrifuged for 5 min at 15,000 g, re-suspended in 1 mL of methanol and heated for 5 min at 55°C. Cells were centrifuged and the supernatant containing pigment was retrieved. The absorbance spectrum of methanol-extracted pigment was measured between 400 and 600 nm to evaluate carotenoid content. A peak at $\lambda = 460$ nm was detected and results are expressed as relative optical density at 460 nm with normalization to C2a. Experiments were performed with three independent biological replicates.

Survival Experiments after Exposure to Different Stresses

The *S. xylosus* strains were grown in TSB under aerobic conditions. To assess sensitivity to oxidative stress, overnight

TABLE 2 | Oligonucleotides used in this study.

Name	Primer Sequence (5' to 3') ^{a,b}	Used for
Up923F1-EcoRI Up923R1-ErmF	<u>CGGAATTC</u> GACGCGTACCAAATCCATT CACAATAGAGAGATGTCACC TGTCGATAAAGGATTCGCTTC	Amplification of sequence upstream <i>nos</i>
Dn923F2-ErmR Dn923R2-BamHI	GGTATACTACTGACAGCTTCC AACAGAAAGCTACTGGTTGTCCA <u>CGGATCC</u> GGTGTGTCTGCTTGGACAAA	Amplification of sequence downstream <i>nos</i>
ErmF-Up923R1 ErmR-Dn923F2	GAAGCGAAATCCTTTATCGACA GGTGACATCTCTATTGTG TGGACAACCAGTAGCTTCTGTT GGAAAGCTGCAGTAGTATACC	Amplification of <i>ermB</i>
Up923F3 Dn923R3	TCCTGCTCGCACATTACTTG CGTCAGGTATCTTGTGCTCA	Control of <i>nos::erm</i> construction
Up923PF5-Sall Dn923R5-EcoRI	<u>ACGCGTCGAC</u> GTGCTTGATAGCACATGAAAAAGGA <u>CGGAATTC</u> GGGTCGTTAATGAAATGGACA	Complementation of <i>nos</i> in pRB473
Up923PF5-Sall Dn922-EcoRI	<u>ACGCGTCGAC</u> GTGCTTGATAGCACATGAAAAAGGA <u>CGGAATTC</u> TGCTCATTAGGTTGTGCTAATTC	Complementation of <i>nos-pdt</i> in pRB473
Up922-Sall Dn922-EcoRI	<u>ACGCGTCGAC</u> GTAAAGGGTAACGTCAAATGAAA <u>CGGAATTC</u> TGCTCATTAGGTTGTGCTAATTC	Complementation of <i>pdt</i> in pRB474
923F4 922R1	AAGCGAAATCCTTTATCGACAC CTAATGGCAGGCCCAATAGA	Co-transcription <i>nos-pdt</i>
923F2 923R2	TGCAGAAGCGTTTGAATTTG GCTTCGATGCAGTGAGATGA	qRT-PCR of <i>nos</i> (SXYL_00923)
2505F 2505R	CGTCATCTTCACGAAAGTCATATTC CGCTAGTACACATTATTATCCAATAG	qRT-PCR of <i>katA</i> (SXYL_2505)
1551F 1551R	ATTCGTGGATTGCGATAAAAAG AGCTTCTGGTAGTGACGT	qRT-PCR of <i>katB</i> (SXYL_1551)
2533F 2533R	TTCGATCATGAACGTATACCA GTGTCTGGTGAACCTTTAGAG	qRT-PCR of <i>katC</i> (SXYL_2533)
1303F 1303R	CGCAGCAGTAGAAGGAACTG ATGTCCACCGCCATTATTGC	qRT-PCR of the housekeeping gene <i>sod</i> (SXYL_1303) and control of DNA contamination in RNA extracts

^aUnderlined regions represent restriction enzyme sequences.

^bPrimer containing overlapping end (in bold).

cultures were diluted to an OD_{600 nm} of 0.05 with fresh medium and incubated until OD_{600 nm} was approximately 1. One milliliter of each culture was collected for serial dilutions and determination of colony-forming units (CFU)/mL on TSA plates. The remaining culture was treated with 150 mM hydrogen peroxide (Sigma-Aldrich) and incubated for 1 h at 30°C. 4,000 U/mL of catalase (Sigma-Aldrich) was added to quench residual H₂O₂ as described (Barrière et al., 2002). Cells were serial-diluted and plated in duplicate on TSA for enumeration of CFU from surviving cells.

To evaluate the impact of saline and acid stresses, overnight cultures of *S. xylosus* strains were freshly diluted (1/100) in TSB and grown under aerobic conditions at 30°C until OD_{600 nm} was approximately 0.3. Strains were diluted in NaCl-supplemented TSB (10 and 20% NaCl) or diluted in TSB with adjusted pH (5.0 and 6.0) to an OD_{600 nm} of 0.1 and incubated in 100-well microtiter plates with shaking at 30°C in a Bioscreen C plate reader, where

turbidity was monitored every 30 min for 20 hours. Assays were performed with two independent cultures for each strain.

Total RNA Extraction and Reverse Transcription

Staphylococcus xylosus strains were grown in TSB under aerobic conditions for 6 h and 24 h. Cell pellets were immediately frozen in liquid nitrogen to stabilize the bacterial RNA and stored at -80°C. For RNA extraction, cell pellets were thawed on ice and resuspended in 500 µL of cold Tris-EDTA buffer. Samples were transferred into tubes containing 600 mg zirconia-silica beads (0.1 mm diameter), 50 µL of sodium dodecyl sulfate (10%), 500 µL of acid phenol and 3.5 µL of β-mercaptoethanol. Cells were disrupted in a FastPrep™ machine (MP Biomedicals). After addition of 200 µL of chloroform and centrifugation, the aqueous phase containing RNA was purified with the Nucleospin

RNAII kit (Macherey Nagel) according to the manufacturer's instructions. A supplementary treatment was performed with Turbo DNase (Ambion) to remove residual DNA. Absence of contaminating DNA was checked by PCR targeting the *sod* gene (Table 2). Total RNA isolated was quantified using a Nanodrop 1000 (Thermo Fisher Scientific). RNA samples were stored at -80°C . RNA isolated from three independent biological replicates for each strain or condition (wild-type and its mutants at 6 and 24 h) was reverse-transcribed to cDNA with a SuperScript Reverse Transcriptase kit following the manufacturer's instructions (Invitrogen).

Evaluation of *nos-pdt* Co-transcription

To determine if the two adjacent genes, *nos* and *pdt*, were co-transcribed, cDNA from the mRNA species transcribed from C2a 24-h cultures was subject to PCR using a pair of primers targeting the *nos-pdt* junction region (Table 2). The conditions for the amplification were 5 min at 95°C , followed by 25 cycles of 30 s at 95°C , 30 s at 60°C and 120 s at 72°C and finally 5 min at 72°C . As controls, this amplification was also performed on C2a genomic template DNA and no template sample.

Quantitative Real-time PCR

Expression of genes of interest was carried out by quantitative real-time PCR (qRT-PCR) using iQTM SYBR[®] Green Supermix (Bio-Rad) and the MasterCycler RealPlex (Eppendorf). Thermal cycling consisted of 30 s at 95°C , followed by 40 cycles of 15 s at 95°C and 60 s at 60°C . The primers used are listed in Table 2. The relative fold change of gene expression, using measured *sod* housekeeping gene expression, was determined by the Livak ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) method (Livak and Schmittgen, 2001).

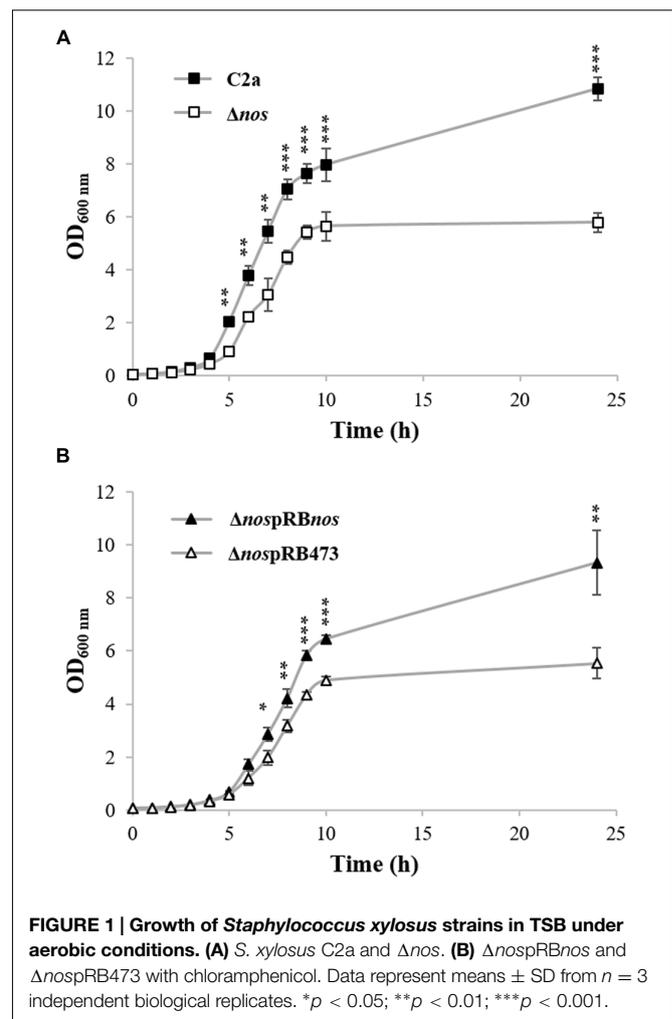
Statistics

The data were analyzed by using GraphPad Prism software (version 5.01). The significance of experimental differences in bacterial growth, formation of myoglobin derivatives, and colony pigment production were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) with Tukey's multiple comparison.

RESULTS

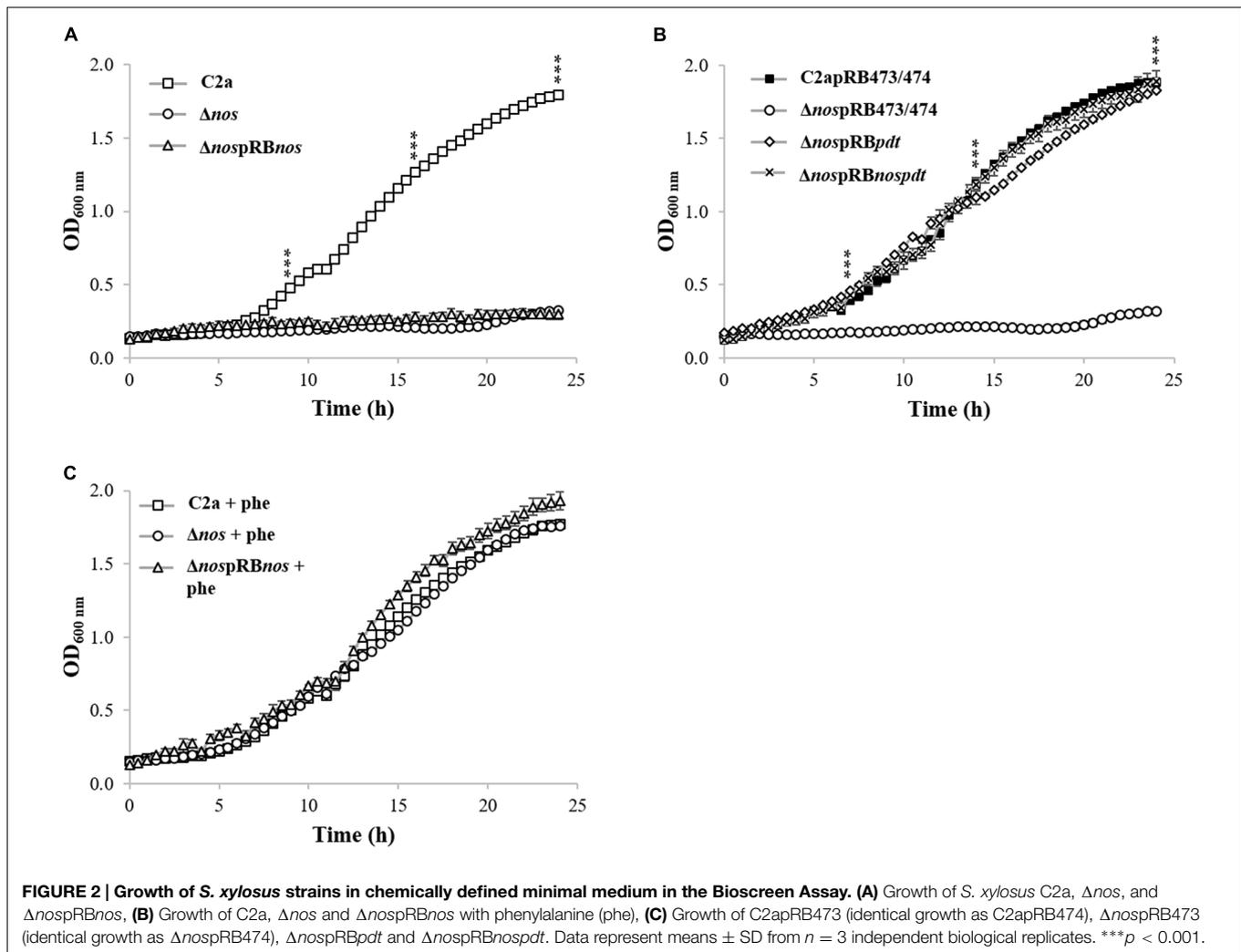
NOS Contributes to Growth under Aerobic Conditions

To define the role of NOS activity in *S. xylosum* C2a, a mutant strain (Δnos) was created by insertion of an erythromycin resistance gene cassette into the *nos* coding sequence. Deletion of the *nos* gene was confirmed by PCR analysis and sequencing (data not shown). When grown in TSB under aerobic conditions, the Δnos mutant displayed a slight growth defect compared with the wild type (Figure 1A). Complementation of the Δnos mutant with a plasmid expressing the *nos* gene (Δnos RB*nos*) showed restored growth (Figure 1B). The wild type and the Δnos and *nos* complemented mutants did not differ in growth in microtiter plates under microaerobic conditions (Supplementary Figure S1).



PDT But Not NOS Is Required for Growth in Minimal Medium

Growth was measured in minimal medium under microaerobic conditions for the wild-type C2a, the Δnos mutant and the *nos* complemented Δnos mutant (Figure 2A). The Δnos mutant was not able to grow in this minimal medium and growth was not restored by plasmid complementation with the *nos* gene (Figure 2A). Since the *nos* gene is in a cluster with the *pdt* gene, we tested the hypothesis that both genes were co-transcribed (Supplementary Figure S2). RT-PCR experiments were carried out using a primer annealing specifically with *nos* and a primer annealing specifically with *pdt* (Table 2). Amplification of a 1,421-bp fragment indicated a co-transcription of both *nos* and *pdt* (data not shown). We therefore speculated that the deletion of *nos* and the insertion of *ermB* had a polar effect on the downstream gene *pdt*, leading to a frameshift in the *pdt* open reading frame (ORF). The *pdt* gene encodes a prephenate dehydratase (EC4.2.1.51), which catalyzes the penultimate reaction in the phenylalanine biosynthesis. Supplementation with phenylalanine restored the growth of the Δnos and the *nos* complemented (Δnos RB*nos*) mutants



(Figure 2B), while no restoration of growth was observed with other amino acids such as tryptophan or tyrosine, which, like phenylalanine, are derived from chorismate (data not shown). Moreover, complementation of the Δnos mutant with *pdt* ($\Delta nosprBpdt$) or with the *nos-pdt* operon ($\Delta nosprBnospdt$) restored growth to the wild-type C2a level (Figure 2C).

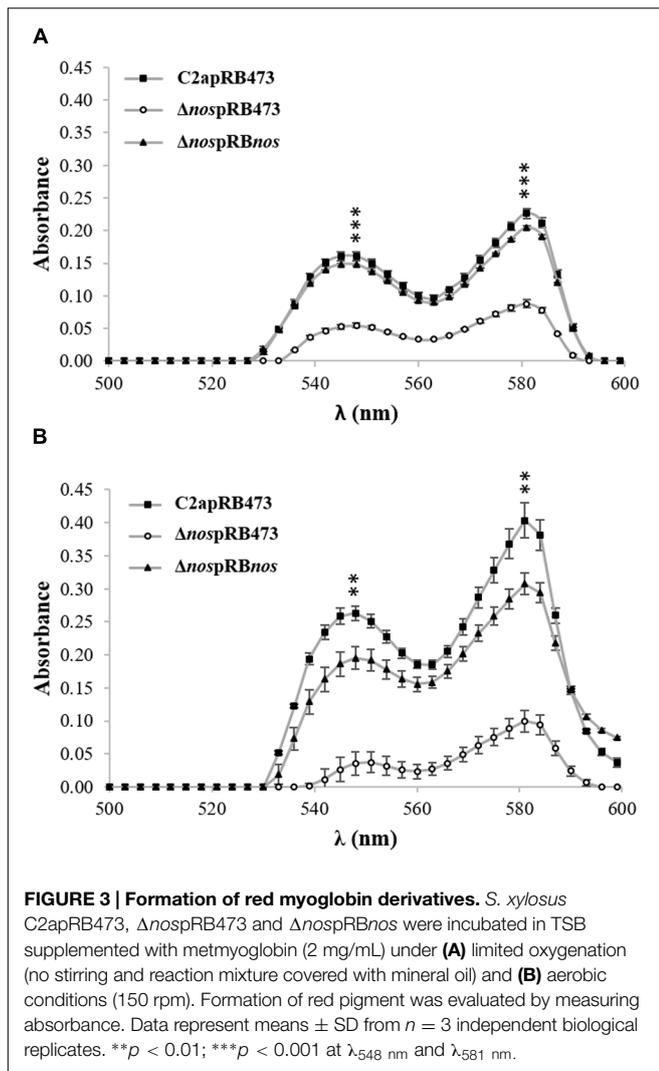
NOS Contributes to NO Production

The formation of the red myoglobin derivatives occurred for *S. xylosoy* C2a under limited oxygenation (Figure 3A) and aerobic conditions (Figure 3B), where different forms of myoglobin came from the conversion of metmyoglobin (brown) to some red derivatives, such as oxymyoglobin and nitrosomyoglobin. The red pigment content was sharply decreased, but not completely abolished, in the Δnos mutant compared with the wild type, and was restored to the wild-type level in the *nos* complemented Δnos mutant under both conditions (Figure 3). Under limited oxygenation after 24 h of incubation, the cellular population was close to initial level, 8 log CFU/mL, for C2a (7.8 ± 0.04), Δnos mutant (7.6 ± 0.40) and *nos* complemented Δnos mutant (7.2 ± 0.01). Under aerobic

conditions, the red pigment level was higher (Figure 3B) and the cellular population reached 9 log CFU/mL for C2a (9.1 ± 0.04), Δnos mutant (9.2 ± 0.20) and Δnos complemented mutant (9.2 ± 0.10).

To estimate the production of nitrosomyoglobin, the nitrosoheme of culture supernatants from *S. xylosoy* C2a and its mutants was extracted and measured (Figure 4). Under limited oxygenation (Figure 4A), where the pH of cultures was about 6.0, the nitrosoheme formation of the Δnos mutant was reduced ($A_{540nm} = 0.060 \pm 1.1E-03$) compared with the wild type ($A_{540nm} = 0.090 \pm 7.1E-04$) and the *nos* complemented Δnos mutant ($A_{540nm} = 0.090 \pm 1.1E-03$). Under aerobic conditions (Figure 4B), where the pH of the cultures was about 8.0, maximum absorption shifted, as described (Yu et al., 2016), to λ_{580nm} instead of λ_{540nm} . In these conditions, no nitrosoheme was formed for the Δnos mutant ($A_{580nm} < 0.005$) compared with the wild type ($A_{580nm} = 0.060 \pm 2.8E-03$) and the *nos* complemented Δnos mutant ($A_{580nm} = 0.080 \pm 1.4E-03$).

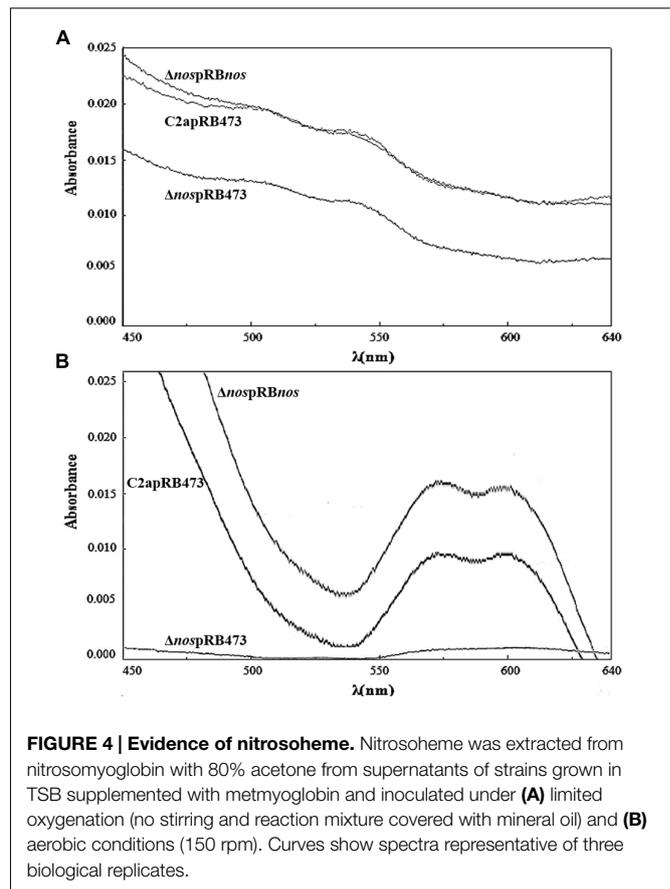
The Δnos mutant and the *pdt* complemented Δnos mutant had the same activity, while for the *nospdt* complemented Δnos mutant the formation of red myoglobin derivatives was restored



to the wild-type level (data not shown). These results clearly demonstrated the contribution of NOS and not PDT to the production of NO in *S. xylosoy* C2a.

NOS Affects Colony Pigmentation

When grown on TSA plates, the Δnos mutant displayed enhanced pigmentation relative to the wild type. This pigmentation returned to wild-type level upon complementation with the *nos* and *nos-pdt* genes, but not with the *pdt* gene alone (Figure 5A). Pigments of the wild type and the Δnos and Δnos RBnos mutants were extracted and absorbance at 460 nm was measured. Production of carotenoid pigment in the Δnos mutant was significantly higher than in the wild type, and returned to the wild-type level in the *nos* complemented mutant (Figure 5B). These results clearly demonstrated that solely NOS was involved in the pigmentation phenotype. This difference in carotenoid pigment production between the wild type and the Δnos mutant was, however, not observed with the bacterial pellets after liquid cultures in TSB, even after prolonged growth for several days (data not shown).

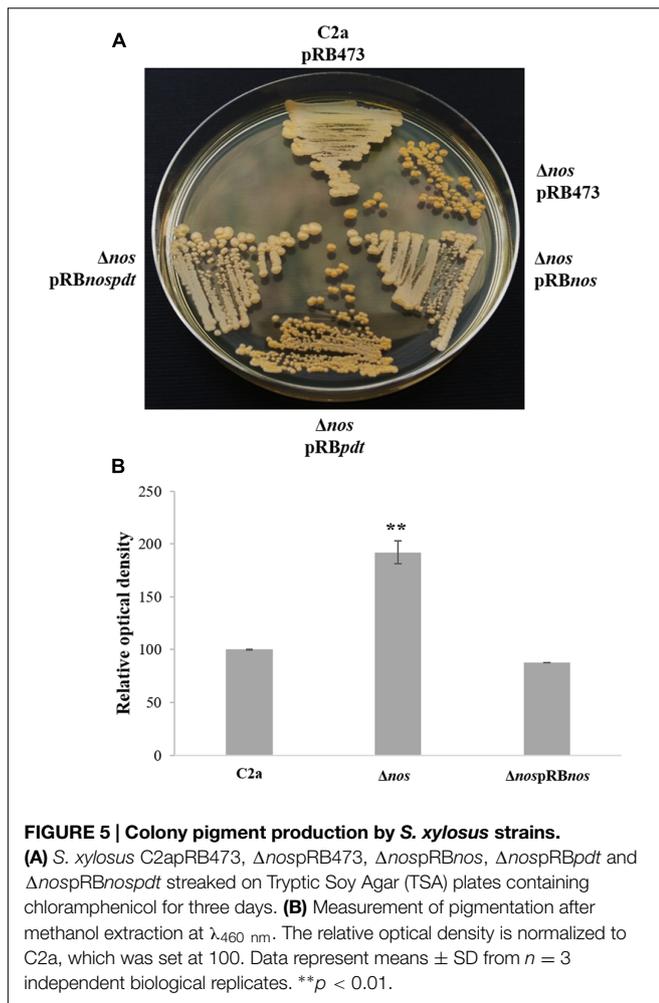


NOS Protects Specifically against Peroxide Stress

Stress challenge assays with 150 mM H_2O_2 were performed on the wild-type C2a and the Δnos and *nos* complemented Δnos mutants to investigate a possible oxidative stress-sensitive phenotype in the Δnos mutant. After 1-h treatment, the Δnos mutant presented a significant reduction in cell viability (5 log) compared with the wild type (Figure 6). The phenotype was restored to the wild-type level in the *nos* complemented mutant (Figure 6). To evaluate the specificity of NOS in protecting against oxidative stress, stress challenge assays in saline and acid conditions were performed on the wild type and the Δnos and *nos* complemented Δnos mutants (Supplementary Figure S3). As the salt concentration increased (Supplementary Figure S3A) or the pH decreased (Supplementary Figure S3B), bacterial growth was affected and decreased for all strains with no significant differences between strains. These results demonstrated that NOS was not required to overcome those stresses.

NOS Modulates Catalase Gene Expression

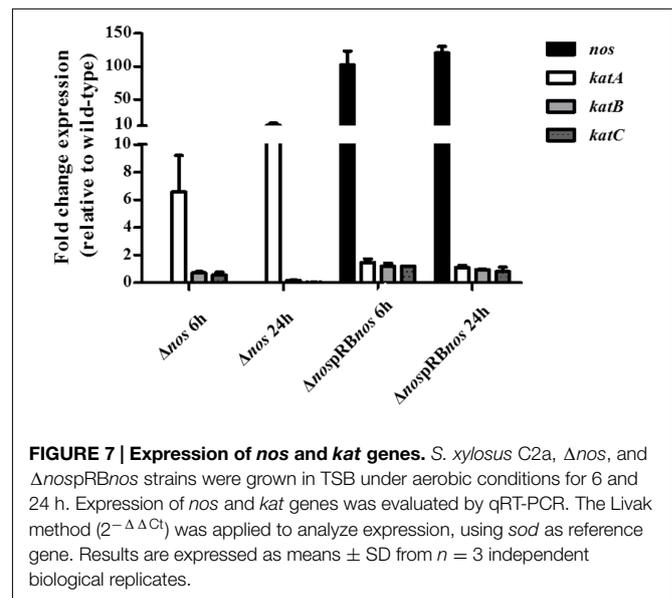
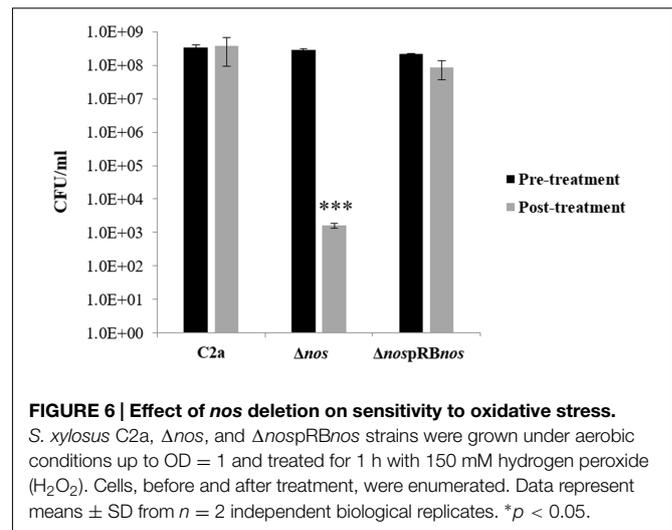
To determine whether increased H_2O_2 -sensitive phenotype and defects in growth under aerobic conditions of the Δnos mutant were due to differential expression of catalase genes, we evaluated expression of the *katA*, *katB*, and *katC* genes by qRT-PCR.



The *kata* gene was overexpressed 6- and 10-fold at 6 h and 24 h, respectively in the Δnos mutant related to the wild type (Figure 7). Expression of the two genes *katB* and *katC* was not modified in the Δnos mutant at 6 h and was sharply downregulated at 24 h by comparison with the wild type (Figure 7). In the *nos* complemented mutant, only the *nos* gene was highly overexpressed at the two times of incubation, while the expression of the three catalase genes was not modified by comparison with the wild type. However, there was no difference in survival between the wild type and the *nos* complemented Δnos mutant when treated with 200 mM H_2O_2 (4 log reduction) and 250 mM (6 log reduction).

DISCUSSION

Staphylococcus xylosum is commonly used as a starter culture for fermented meat products, mainly because it reduces nitrate to nitrite, which undergoes chemical reactions leading to NO, which is responsible for color development (Talon and Leroy, 2006). As the safety of nitrite as a food additive is questioned, we studied the ability of *S. xylosum* to produce NO via a



pathway catalyzed by NOS. To demonstrate the production of NO by *S. xylosum*, we used the property of NO to form a NO complex of Fe(II) myoglobin, called nitrosomyoglobin. In previous studies *S. xylosum* FAX-1 and *S. xylosum* A1 were able to convert metmyoglobin to nitrosomyoglobin *in vitro* and in raw meat batter (Morita et al., 1998; Li et al., 2013, 2016). However, the mechanism of such NO production was not established. Here we demonstrate that NOS activity of *S. xylosum* led to production of NO. Under limited oxygenation, the Δnos mutant remained able to form nitrosoheme (about 35-40% related to the wild-type level). The Δnos mutant was unable to produce NO under aerobic conditions. The loss of NOS activity in *S. aureus* UAMS-1 mutant led to NO production of 65% as evaluated using fluorescent stain DAF-FM diacetate after growth on agar plates (Sapp et al., 2014), while the deletion of *nos* in *S. aureus* UAMS1182 completely abolished NO production after growth under aerobic conditions (van Sorge et al., 2013). These results revealed that

some *Staphylococcus* strains are able to produce NO by other pathways under limited oxygenation. NO production can be achieved *via* molybdoenzymes, which are recognized for their ability to catalyze reduction of nitrite to NO radical (Maia and Moura, 2015). The molybdenum-containing respiratory nitrate reductase is believed to be an important source of NO (Maia and Moura, 2015). *S. xylosus* C2a has a nitrate reductase that was previously shown to be expressed and active under static conditions (Talon et al., 1999). The involvement of NOS under aerobic conditions seems relevant to the oxygen requirement of NOS activity (Crane et al., 2010). The potential for NOS activity has been investigated in 86 strains belonging to 17 CNS species (Sánchez-Mainar et al., 2014). Only one strain of *S. haemolyticus* showed NOS activity, based on its ability to produce L-citrulline in a meat-simulating medium supplemented with arginine under aerobic conditions (Sánchez-Mainar et al., 2014).

The deletion of *nos* in *S. xylosus* C2a slightly affected growth in complex medium under aerobic but not under microaerobic conditions. This *nos* deletion also increased H₂O₂ susceptibility. Such results are in accordance with previous studies showing that NO production through NOS activity protects *Bacillus* and *S. aureus* against oxidative stress generated by H₂O₂ exposure (Gusarov and Nudler, 2005; Shatalin et al., 2008; van Sorge et al., 2013). In *B. subtilis*, exogenous or endogenous NO protected cells from oxidative stress by boosting the activity of KatA, the major catalase (Gusarov and Nudler, 2005). Also, while *sodA* expression increased sharply in wild-type cells of *B. subtilis* during exponential growth, it was abolished in the Δnos mutant (Gusarov et al., 2009). In *S. xylosus* C2a Δnos mutant, the loss of NOS activity resulted in modulation of the expression of genes encoding catalases with upregulation of *katA* and downregulation of *katB* and *katC*. We showed in a previous study that *S. xylosus* responded to nitrosative stress generated by nitrite in a meat model, notably by the upregulation of *katB* and *katC* under the probable control of the repressor PerR and the downregulation of *katA*, which was not under PerR control (Vermassen et al., 2014). In this study, the limited amount of endogenous NO produced by the Δnos mutant may not derepress PerR, contributing to the downregulation of *katB* and *katC*. In contrast to *B. subtilis*, expression of the gene *sodA* was not modified in the *S. xylosus* Δnos mutant (*sod* was used as housekeeping gene in our study).

The *S. xylosus* C2a Δnos mutant displayed higher colony pigmentation than the wild-type strain after prolonged cultivation on agar medium, as observed for the *S. aureus* Δnos strain UAMS-1 (Sapp et al., 2014). *S. aureus* produced the intermediary yellow carotenoid 4,4'-diaponeurosporene, which, after prolonged cultivation, is converted to the yellow-orange end-product staphyloxanthin (Wieland et al., 1994). The yellow pigment in *S. xylosus* is likely to be a carotenoid pigment with peak absorbance at 460 nm. The carotenoid pigment of *S. aureus* protects against reactive oxygen species, so a non-pigmented mutant is more susceptible to oxidative killing (Clauditz et al., 2006). The increased colony pigmentation of the *S. xylosus* C2a Δnos mutant could be a mechanism to cope with oxidative stress in conditions of extended incubation only on agar medium, as no pigmentation was observed in liquid medium.

The *S. aureus nos* gene is co-transcribed with the *pdt* gene encoding a prephenate dehydratase, which catalyzes the penultimate reaction in phenylalanine biosynthesis (Sapp et al., 2014). This genetic arrangement is present in all publically available staphylococcal genome sequences and seems to be unique to the *Staphylococcus* genus (Sapp et al., 2014). As anticipated, co-transcription of the *nos-pdt* cluster was also demonstrated in *S. xylosus*. However, the role of the NOS and PDT enzymes of *S. xylosus* C2a did not appear to be interlinked. PDT was essential for *S. xylosus* growth only in the absence of phenylalanine, while NOS was not required to sustain phenylalanine biosynthesis.

CONCLUSION

Our results demonstrate NOS-dependent NO production in a coagulase-negative *Staphylococcus*. This endogenous NO production contributed to growth under aerobic conditions and to the cytoprotective effect against oxidative stress. *S. xylosus* is a species usually used as a starter culture in meat products. Therefore, NOS-dependent NO production in *S. xylosus* needs to be further characterized in meat products and optimized as a potential alternative to nitrate and nitrite in these products.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

SL and RT conceived the study. GR, SL and RT designed the experiments and wrote the manuscript. GR performed the laboratory experiments. GR, VZ, PD, TS, SL and RT analyzed data. All the authors contributed to preparing the final version of the manuscript, read and approved the final manuscript.

ACKNOWLEDGMENTS

GR is a Ph.D. Research Fellow funded by ANRT, CIFRE 2013/1490. We would like to thank Philippe Gatellier, INRA, for helpful discussions about nitrosoheme pigment, and Jean-Paul Chacornac and Carine Andant for technical assistance. The authors are grateful to David Marsh for correcting our English.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2017.00598/full#supplementary-material>

FIGURE S1 | Growth of *Staphylococcus xylosus* strains in the Bioscreen Assay. *S. xylosus* C2a, Δnos , and $\Delta nospRBnos$ in TSB. Data represent means \pm SD from $n = 3$ independent biological replicates.

FIGURE S2 | Genetic cluster *nos-pdt* of *S. xylosus* C2a. The cluster of the two genes *nos-pdt* is depicted with primers used for PCR co-transcription.

FIGURE S3 | Impact of stresses on growth under microaerobic conditions of *S. xylosus* strains. (A) Impact of salt and (B) impact of acid stresses. Data represent means \pm SD from $n = 3$ independent biological replicates.

REFERENCES

- Alderton, W. K., Cooper, C. E., and Knowles, R. G. (2001). Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem. J.* 357(Pt 3), 593–615. doi: 10.1042/bj3570593
- Barrière, C., Brückner, R., Centeno, D., and Talon, R. (2002). Characterisation of the *katA* gene encoding a catalase and evidence for at least a second catalase activity in *Staphylococcus xylosum*, bacteria used in food fermentation. *FEMS Microbiol. Lett.* 216, 277–283. doi: 10.1016/S0378-1097(02)01030-3
- Brückner, R. (1992). A series of shuttle vectors for *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*. *Gene* 122, 187–192. doi: 10.1016/0378-1119(92)90048-T
- Brückner, R. (1997). Gene replacement in *Staphylococcus carnosus* and *Staphylococcus xylosum*. *FEMS Microbiol. Lett.* 151, 1–8. doi: 10.1016/S0378-1097(97)00116-X
- Clauditz, A., Resch, A., Wieland, K. P., Peschel, A., and Götz, F. (2006). Staphyloxanthin plays a role in the fitness of *Staphylococcus aureus* and its ability to cope with oxidative stress. *Infect. Immun.* 74, 4950–4953. doi: 10.1128/IAI.00204-06
- Code of Federal Regulations (2016). Title 21 – Food and Drugs, Chapter I – Food and Drug Administration, Department of Health and Human Services, Subchapter B – Food for Human Consumption, Part 172 – Food Additives Permitted for Direct Addition to Food for Human Consumption, Subpart B – Food Preservatives. Silver Spring, MD: U.S. Food and Drug Administration.
- Commission Regulation [EU] (2011). No 1129/2011 of November 2011 amending Annex II to Regulation (EC) No 1333/2008 of the European Parliament and of the Council by establishing a Union list of food additives. *Off. J. Eur. Union* L295, 1–177.
- Crane, B. R., Sudhamsu, J., and Patel, B. A. (2010). Bacterial nitric oxide synthases. *Annu. Rev. Biochem.* 79, 445–470. doi: 10.1146/annurev-biochem-062608-103436
- Fiegler, H., and Brückner, R. (1997). Identification of the serine acetyltransferase gene of *Staphylococcus xylosum*. *FEMS Microbiol. Lett.* 148, 181–187. doi: 10.1111/j.1574-6968.1997.tb10286.x
- Götterup, J., Olsen, K., Knöchel, S., Tjener, K., Stahnke, L. H., and Møller, J. K. (2007). Relationship between nitrate/nitrite reductase activities in meat associated staphylococci and nitrosomyoglobin formation in a cured meat model system. *Int. J. Food Microbiol.* 120, 303–310. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2007.08.034
- Götterup, J., Olsen, K., Knöchel, S., Tjener, K., Stahnke, L. H., and Møller, J. K. (2008). Colour formation in fermented sausages by meat-associated staphylococci with different nitrite- and nitrate-reductase activities. *Meat Sci.* 78, 492–501. doi: 10.1016/j.meatsci.2007.07.023
- Götz, F., Zabielski, J., Philipson, L., and Lindberg, M. (1983). DNA homology between the arsenate resistance plasmid pSX267 from *Staphylococcus xylosum* and the penicillinase plasmid p1258 from *Staphylococcus aureus*. *Plasmid* 9, 126–137. doi: 10.1016/0147-619X(83)90015-X
- Gündoğdu, A. K., Karahan, A. G., and Çakmakçı, M. L. (2006). Production of nitric oxide (NO) by lactic acid bacteria isolated from fermented products. *Eur. Food Res. Technol.* 223, 35–38. doi: 10.1007/s00217-005-0097-8
- Gusarov, I., and Nudler, E. (2005). NO-mediated cytoprotection: instant adaptation to oxidative stress in bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 13855–13860. doi: 10.1073/pnas.0504307102
- Gusarov, I., Shatalin, K., Starodubtseva, M., and Nudler, E. (2009). Endogenous nitric oxide protects bacteria against a wide spectrum of antibiotics. *Science* 325, 1380–1384. doi: 10.1126/science.1175439
- Gusarov, I., Starodubtseva, M., Wang, Z. Q., McQuade, L., Lippard, S. J., Stuehr, D. J., et al. (2008). Bacterial nitric-oxide synthases operate without a dedicated redox partner. *J. Biol. Chem.* 283, 13140–13147. doi: 10.1074/jbc.M710178200
- Honikel, K. O. (2008). The use and control of nitrate and nitrite for the processing of meat products. *Meat Sci.* 78, 68–76. doi: 10.1016/j.meatsci.2007.05.030
- Kabir, M., Sudhamsu, J., Crane, B. R., Yeh, S. R., and Rousseau, D. L. (2008). Substrate-ligand interactions in *Geobacillus stearothermophilus* nitric oxide synthase. *Biochemistry* 47, 12389–12397. doi: 10.1021/bi801491e
- Kers, J. A., Wach, M. J., Krasnoff, S. B., Widom, J., Cameron, K. D., Bukhalid, R. A., et al. (2004). Nitration of a peptide phytotoxin by bacterial nitric oxide synthase. *Nature* 429, 79–82. doi: 10.1038/nature02504nature02504
- Li, P., Kong, B., Chen, Q., Zheng, D., and Liu, N. (2013). Formation and identification of nitrosomyoglobin by *Staphylococcus xylosum* in raw meat batters: a potential solution for nitrite substitution in meat products. *Meat Sci.* 93, 67–72. doi: 10.1016/j.meatsci.2012.08.003
- Li, P. J., Luo, H. T., Kong, B. H., Liu, Q., and Chen, C. G. (2016). Formation of red myoglobin derivatives and inhibition of spoilage bacteria in raw meat batters by lactic acid bacteria and *Staphylococcus xylosum*. *LWT Food Sci. Technol.* 68, 251–257. doi: 10.1016/j.lwt.2015.12.035
- Livak, K. J., and Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25, 402–408. doi: 10.1006/meth.2001.1262
- Maia, L. B., and Moura, J. J. (2015). Nitrite reduction by molybdoenzymes: a new class of nitric oxide-forming nitrite reductases. *J. Biol. Inorg. Chem.* 20, 403–433. doi: 10.1007/s00775-014-1234-2
- 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. doi: 10.1155/2010/489892
- Morikawa, K., Maruyama, A., Inose, Y., Higashide, M., Hayashi, H., and Ohta, T. (2001). Overexpression of sigma factor, sigma(B), urges *Staphylococcus aureus* to thicken the cell wall and to resist beta-lactams. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 288, 385–389. doi: 10.1006/bbrc.2001.5774
- Morita, H., Sakata, R., and Nagata, Y. (1998). Nitric oxide complex of iron(II) myoglobin converted from metmyoglobin by *Staphylococcus xylosum*. *J. Food Sci.* 63, 352–355. doi: 10.1111/j.1365-2621.1998.tb15740.x
- Patel, B. A., Moreau, M., Widom, J., Chen, H., Yin, L., Hua, Y., et al. (2009). Endogenous nitric oxide regulates the recovery of the radiation-resistant bacterium *Deinococcus radiodurans* from exposure to UV light. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 18183–18188. doi: 10.1073/pnas.0907262106
- Sánchez-Mainar, M., Weckx, S., and Leroy, F. (2014). Coagulase-negative staphylococci favor conversion of arginine into ornithine despite a widespread genetic potential for nitric oxide synthase activity. *Appl. Environ. Microbiol.* 80, 7741–7751. doi: 10.1128/AEM.02298-14
- Sapp, A. M., Mogen, A. B., Almand, E. A., Rivera, F. E., Shaw, L. N., Richardson, A. R., et al. (2014). Contribution of the *nos-pdt* operon to virulence phenotypes in methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus*. *PLoS ONE* 9:e108868. doi: 10.1371/journal.pone.0108868
- Shatalin, K., Gusarov, I., Avetissova, E., Shatalina, Y., McQuade, L. E., Lippard, S. J., et al. (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. doi: 10.1073/pnas.0710950105
- Talon, R., and Leroy, S. (2006). “Chapter 16—Latest developments in meat bacterial starters,” in *Advanced Technologies for Meat Processing*, eds L. M. L. Nollet and F. Toldra (New York, NY: CRC Press, Taylor and Francis group), 401–418.
- Talon, R., Walter, D., Chartier, S., Barrière, C., and Montel, M. C. (1999). Effect of nitrate and incubation conditions on the production of catalase and nitrate reductase by staphylococci. *Int. J. Food Microbiol.* 52, 47–56. doi: 10.1016/S0168-1605(99)00127-0
- Vaish, M., and Singh, V. K. (2013). Antioxidant functions of nitric oxide synthase in a methicillin sensitive *Staphylococcus aureus*. *Int. J. Microbiol.* 2013:312146. doi: 10.1155/2013/312146
- van Sorge, N. M., Beasley, F. C., Gusarov, I., Gonzalez, D. J., von Köckritz-Blickwede, M., Anik, S., et al. (2013). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacterial nitric-oxide synthase affects antibiotic sensitivity and skin abscess development. *J. Biol. Chem.* 288, 6417–6426. doi: 10.1074/jbc.M112.448738
- Vermassen, A., de la Foye, A., Loux, V., Talon, R., and Leroy, S. (2014). Transcriptomic analysis of *Staphylococcus xylosum* in the presence of nitrate and nitrite in meat reveals its response to nitrosative stress. *Front. Microbiol.* 5:691. doi: 10.3389/fmicb.2014.00691
- Wieland, B., Feil, C., Gloria-Maercker, E., Thumm, G., Lechner, M., Bravo, J. M., et al. (1994). Genetic and biochemical analyses of the biosynthesis of the yellow carotenoid 4,4'-diaponeurosporene of *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 176, 7719–7726. doi: 10.1128/jb.176.24.7719-7726.1994

Yu, C., Jiao, J., Ma, L., and Sun, W. (2016). Effect of pH on the stability and molecular structure of nitrosyl hemochromogen. *Food Chem.* 196, 503–508. doi: 10.1016/j.foodchem.2015.09.067

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2017 Ras, Zuliani, Derkx, Seibert, Leroy and Talon. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Figures supplémentaires Article 1:

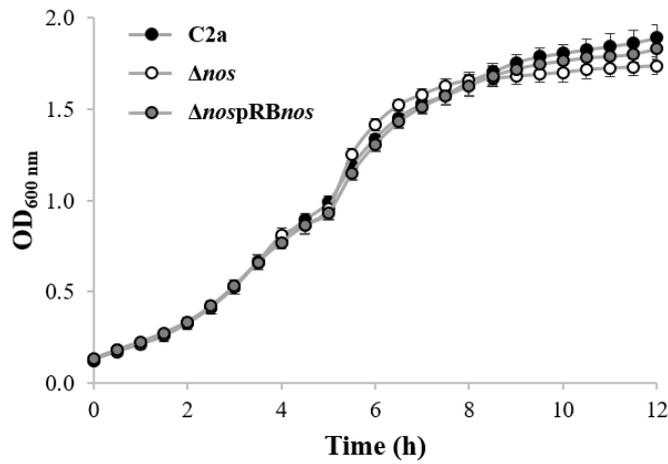


Figure S1. Growth of *S. xylosus* strains in the Bioscreen Assay. *S. xylosus* C2a, Δnos and $\Delta nospRBnos$ in TSB. Data represent means \pm S.D. from n=3 independent biological replicates.

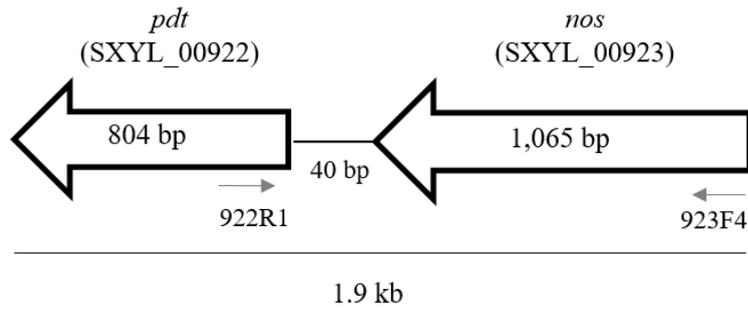


Figure S2. Genetic cluster *nos-pdt* of *S. xylosus* C2a. The cluster of the two genes *nos-pdt* is depicted with primers used for PCR co-transcription.

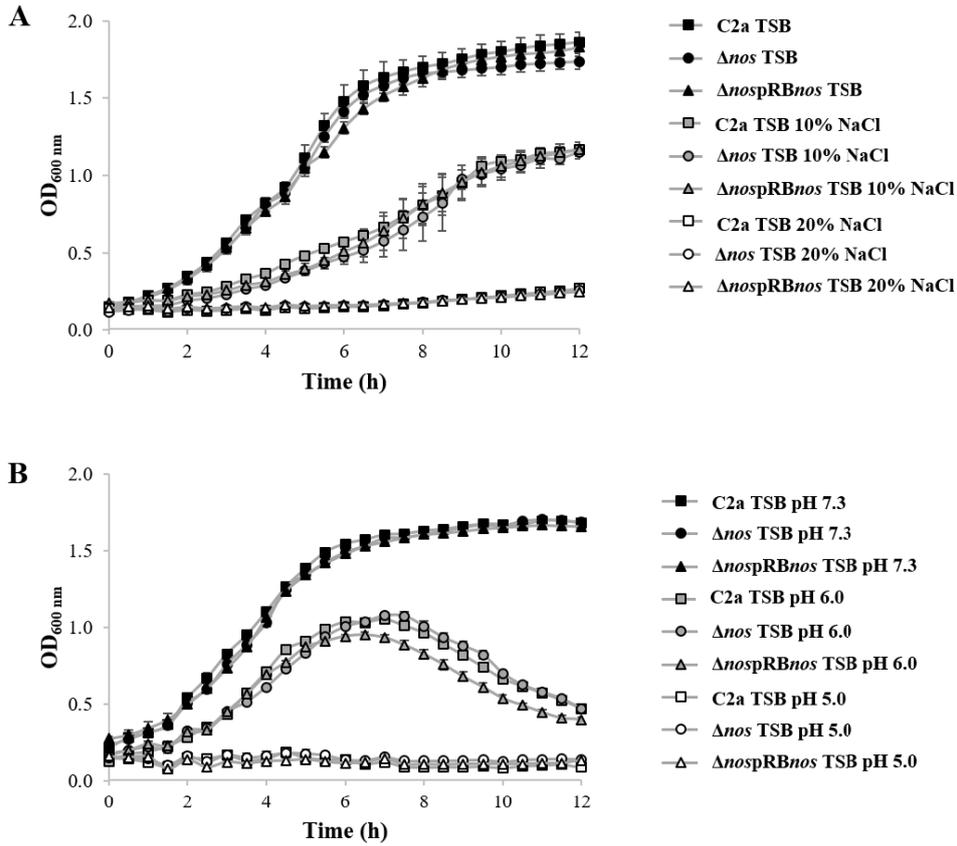


Figure S3. Impact of stresses on growth under microaerobic conditions of *S. xylosus* strains. (A) Impact of salt and (B) impact of acid stresses. Data represent means \pm S.D. from n=3 independent biological replicates.

**CONTRIBUTION DE L'OXYDE NITRIQUE
SYNTHASE DES STAPHYLOCOQUES A COAGULASE
NEGATIVE DANS LE DEVELOPPEMENT DE LA
COULEUR DES PRODUITS CARNES**

Contexte de l'étude

Une quarantaine d'espèces de SCN a été identifiée dont certaines comme *S. equorum*, *S. saprophyticus* et *S. xylosum* sont très présentes dans les produits carnés. Les espèces *S. xylosum* et *S. carnosus* sont couramment utilisées comme ferments pour la fabrication de saucissons. L'utilisation de ferments capables de générer du NO, molécule clé pour le développement de la couleur, pourrait être une alternative à l'addition de nitrate. Le NO peut être généré à partir de l'arginine *via* l'oxyde nitrique synthase (NOS). Le gène codant cette enzyme est présent chez différentes espèces de SCN. Nous avons en effet précédemment démontré la capacité de la souche *S. xylosum* C2a à synthétiser du NO par la NOS (article 1). Cependant, la capacité d'autres souches de *S. xylosum* mais aussi d'autres espèces de SCN fréquemment isolées ou de *S. carnosus* utilisée comme ferment à produire du NO, potentiellement par la NOS, n'était pas connue.

Dans cette étude, nous avons établi la phylogénie de la NOS au sein d'une collection de SCN isolés de viande et de produits carnés d'origines variées. Nous avons évalué le potentiel de ces souches dans le développement de la couleur rouge des produits carnés en utilisant le test basé sur la production des pigments, l'oxymyoglobine et la nitrosomyoglobine, à partir de la metmyoglobine, comme décrit dans l'article 1.

Résultats de l'étude

- Cinq espèces de SCN, *S. equorum*, *S. xylosum*, *S. saprophyticus*, *S. carnosus* et *S. warneri*, représentant un total de 113 souches ont été étudiées. Une amplification du gène *nos* par PCR a été réalisée afin d'évaluer la diversité de sa séquence. Des amorces PCR spécifiques du gène *nos* ont été développées pour chaque espèce afin d'amplifier un fragment couvrant la quasi-totalité du gène. Ainsi, un produit de taille attendue a été amplifié chez les 113 souches.
- Les produits PCR ont été séquencés. Tous correspondaient à la séquence du gène *nos*. Une analyse phylogénétique basée sur la séquence en acides aminés a été réalisée. L'arbre phylogénétique montre que les séquences NOS des souches d'une même espèce forment un groupe phylogénétique distinct des séquences NOS des autres espèces. Seule l'espèce *S. equorum* est divisée en deux sous-groupes. Le pourcentage de similarité intra-espèce de la séquence NOS varie de 98 à 99% tandis que le

pourcentage de similarité inter-espèce varie de 81 à 91%. Les séquences NOS des trois espèces *S. equorum*, *S. xylosus* et *S. saprophyticus* partagent entre elles de 87 à 91% de similarité. Elles partagent 81 à 85% de similarité avec celles de *S. carnosus*. Celles de *S. warneri* sont plus éloignées et plus proches de celles de *S. aureus*. Au niveau des sites actifs, le pourcentage de similarité intra-espèce est supérieur à 99% et le pourcentage de similarité inter-espèce varie de 87 à 98%, montrant que les sites actifs de cette enzyme sont très conservés. Les sites actifs des séquences NOS des trois espèces *S. equorum*, *S. xylosus* et *S. saprophyticus* partagent de 97 à 98% de similarité. La division en deux groupes phylogénétiques chez *S. equorum* est vraisemblablement due à la présence d'un résidu alanine ou sérine au niveau du site actif positionné à l'interface du dimère NOS. En effet, les souches du sous-groupe 1 présentent un résidu alanine à cette position alors que les souches du sous-groupe 2 présentent un résidu sérine. Les séquences du site actif des NOS des souches de *S. carnosus* se distinguent de celles des 4 autres espèces car elles ont 6 acides aminés substitués.

- A partir de ces résultats, 57 souches ont été sélectionnées sur la base de la diversité phylogénétique de NOS. Leur rôle dans le développement de la couleur a été évalué *via* leur capacité à former des pigments rouges, l'oxymyoglobine et la nitrosomyoglobine, à partir de la metmyoglobine dans deux conditions d'incubation, en aérobie ou en limitation d'oxygène. Après 24 heures d'incubation, les deux pics d'absorbance à 548 et 581 nm caractéristiques des deux pigments ont été détectés. Les valeurs de ces pics étant corrélées ($r^2 > 0.98$), nous avons utilisé les valeurs mesurées à 581 nm pour caractériser la formation de pigments rouges par les souches. Les valeurs médianes relatives à la formation de ces pigments sont supérieures pour toutes les espèces en condition aérobie comparée à la condition limitée en oxygène. En condition aérobie, 52 souches sur 57 sont capables de former des pigments rouges, 2 souches de *S. equorum* et 3 souches de *S. carnosus* n'en forment pas. Cependant, aucune différence significative n'a été mesurée entre les espèces due à une grande variabilité des souches dans la formation de ces pigments. En condition limitée en oxygène, les espèces *S. xylosus* et *S. saprophyticus* ont un potentiel de formation de ces pigments rouges significativement plus élevé que les trois autres espèces. De plus, la formation de ces pigments chez ces dernières est faible voire nulle. L'hétérogénéité observée dans la capacité des souches à former des pigments rouges n'était pas due à des différences de niveaux de populations.

- Pour distinguer entre oxy- et nitroso-myoglobine, nous avons extrait puis mesuré le nitrosohème contenu dans les surnageants de culture des souches incubées en aérobiose. En effet, nous avons démontré au cours de notre précédente étude que seule la NOS était responsable de la production de NO dans cette condition. Il est apparu que 100% des souches de *S. xylosus* produisaient du NO, avec relativement peu de diversité entre les souches de cette espèce. Aucune différence significative n'a été observée entre les quatre autres espèces et leur capacité de production de NO est souche-dépendante et très variable. Ainsi, 85% des souches de *S. saprophyticus*, 67% des souches de *S. warneri*, 65% des souches de *S. equorum* et 55% des souches de *S. carnosus* produisaient du NO dans ces conditions.
- Les résultats obtenus ont également montré que l'oxymyoglobine est le pigment majoritairement formé à partir de la metmyoglobine, particulièrement en condition aérobie, avec une forte hétérogénéité entre les espèces. La première étape requise pour la formation d'oxymyoglobine ou de nitrosomyoglobine consiste en une réduction du fer ferrique (Fe^{III}) de l'hème de la metmyoglobine en fer ferreux (Fe^{II}). Dans notre cas, la réduction du fer dépend du métabolisme des souches de staphylocoques, puisque le témoin, le milieu TSB non ensemencé supplémenté en metmyoglobine, est resté marron pendant toute l'incubation, quelles que soient les conditions d'oxygénation. La réduction du fer ferrique en fer ferreux pourrait être due à des conditions réductrices générées par les bactéries. Nous avons mesuré le potentiel d'oxydo-réduction jusqu'à 24h d'incubation dans les deux conditions d'oxygénation mais celui-ci n'a pas varié dans nos conditions (+ 0.5 mV à -3.5 mV). Cela montre que la metmyoglobine n'était pas incubée dans des conditions réductrices. De ce fait, des réductases pourraient être impliquées.

ARTICLE 2

Soumission à Food Microbiology, FM_2017_497

Manuscript Details

Manuscript number: FM_2017_497

Title: Contribution of nitric oxide synthase from coagulase-negative staphylococci to the development of red myoglobin derivatives

Article type: Research Paper

Abstract:

As part of the microbial community of meat or as starter cultures, coagulase-negative staphylococci (CNS) serve several essential technological purposes in meat products, such as color development through the reduction of nitrate to nitrite. As the safety of nitrite as an additive has been questioned, we explored the potential of CNS to develop red myoglobin derivatives such as oxymyoglobin and nitrosomyoglobin. Nitrosoheme was extracted to evaluate NO production. This production could be due to a nitric oxide synthase (NOS) activity. In all CNS strains, a nos gene was identified. The NOS sequences deduced were highly conserved within CNS. A phylogenetic tree based on the NOS sequences revealed that the strains within species were clustered. Ninety-one percent of the strains, whatever the species, were able to form red myoglobin derivatives in aerobic conditions, but a high variability was observed between strains within species. However, NO production was low as nitrosomyoglobin represented 9% to 16% of the red pigments according to the species. Formation of oxymyoglobin, especially under aerobic conditions, was substantial, but varied greatly within species. The mechanism involved in the formation of oxymyoglobin could rely on staphylococcal reductases and remains to be explored.

Keywords: Coagulase-negative staphylococci; Nitric oxide; Nitrosomyoglobin; Nitrosoheme; Oxymyoglobin

Corresponding Author: Sabine Leroy

Order of Authors: Geoffrey Ras, Xavier Bailly, Jean-Paul Chacornac, Véronique Zuliani, Patrick Derkx, Tim Seibert, Régine Talon, Sabine Leroy

Contribution of nitric oxide synthase from coagulase-negative staphylococci to the development of red myoglobin derivatives

Geoffrey Ras^{a,c}, Xavier Bailly^b, Jean-Paul Chacornac^a, Véronique Zuliani^c, Patrick Derkx^d, Tim M. Seibert^e, Régine Talon^a, Sabine Leroy^{a*}

^a Université Clermont Auvergne, INRA, MEDIS, Clermont-Ferrand, France, ^b EPIA, INRA, Saint-Genès-Champanelle, France, ^c CHR. HANSEN SAS, Saint Germain les Arpajon, France, ^d CHR. HANSEN A/S, Hørsholm, Denmark, ^e CHR. HANSEN GmbH, Pohlheim, Germany

*Address correspondence to Sabine Leroy: sabine.leroy@inra.fr

ABSTRACT

As part of the microbial community of meat or as starter cultures, coagulase-negative staphylococci (CNS) serve several essential technological purposes in meat products, such as color development through the reduction of nitrate to nitrite. As the safety of nitrite as an additive has been questioned, we explored the potential of CNS to develop red myoglobin derivatives such as oxymyoglobin and nitrosomyoglobin. Nitrosoheme was extracted to evaluate NO production. This production could be due to a nitric oxide synthase (NOS) activity. In all CNS strains, a *nos* gene was identified. The NOS sequences deduced were highly conserved within CNS. A phylogenetic tree based on the NOS sequences revealed that the strains within species were clustered. Ninety-one percent of the strains, whatever the species, were able to form red myoglobin derivatives in aerobic conditions, but a high variability was observed between strains within species. However, NO production was low as nitrosomyoglobin represented 9% to 16% of the red pigments according to the species. Formation of oxymyoglobin, especially under aerobic conditions, was substantial, but varied greatly within species. The mechanism involved in the formation of oxymyoglobin could rely on staphylococcal reductases and remains to be explored.

Keywords: Coagulase-negative staphylococci, Nitric oxide, Nitrosomyoglobin, Nitrosoheme, Oxymyoglobin

Highlights

Most coagulase-negative staphylococci (CNS) were able to form red myoglobin derivatives.

Nitric oxide synthase sequences were highly conserved within CNS.

Nitric oxide production by CNS strains was low.

Oxymyoglobin formation was substantial, but varied greatly within CNS.

1. Introduction

Coagulase-negative staphylococci (CNS) are food-associated saprophytes that are particularly common in foods of animal origin, such as dairy and meat products (Coton et al., 2010; Irlinger, 2008). CNS, as well as lactic acid bacteria (LAB), are predominant microorganisms in meat products and are of technological interest (Lücke, 2000). The diversity of *Staphylococcus* species in meat products, especially in traditional raw-fermented sausages or dried meats, is wide and related to the variety of products and manufacturing processes. Overall, however, the species *Staphylococcus xylosum*, *Staphylococcus equorum* and *Staphylococcus saprophyticus* are frequently dominant, and *Staphylococcus carnosus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus lentus*, *Staphylococcus pasteurii*, *Staphylococcus sciuri*, *Staphylococcus simulans*, *Staphylococcus succinus*, *Staphylococcus vitulinus*, and *Staphylococcus warneri* (non-exhaustive list) are commonly present (Blaiotta et al., 2004; Corbière Morot-Bizot et al., 2006; Coton et al., 2010; Iacumin et al., 2012; Leroy et al., 2010; Marty et al., 2012; Ratsimba et al., 2017). Among all these species, only two, *S. carnosus* and *S. xylosum*, are commonly used as meat starter cultures in order to improve the safety and stability of the products, and to enhance their sensory characteristics (Leroy et al., 2006; Leroy et al., 2016; Talon and Leroy, 2014). In particular, *S. carnosus* and *S. xylosum* improve the development and stability of the characteristic red color of fermented meat products. In these products, nitrate and/or nitrite is added as curing salt for the development of the color of these products, and *S. carnosus* and *S. xylosum* reduce nitrate to nitrite through their nitrate reductase activity (Talon et al., 1999). Nitrite is then chemically converted to nitric oxide (NO), which binds to the myoglobin ferrous heme-iron to form the stable red nitrosomyoglobin pigment (Gøtterup et al., 2007, 2008).

The use of curing salts is regulated by law, with specific indications in the USA (Code of Federal Regulations, 2016) and Europe (Commission Regulation [EU], 2011). Nevertheless, the safety of nitrite has been questioned. This additive can react with the secondary amine groups of muscle proteins and may give rise to unwanted and toxic N-nitroso compounds such

as nitrosamines in the gastrointestinal tract (De Mey et al., 2015; Honikel, 2008). The meat industry is therefore looking for alternatives to decrease nitrate and nitrite in the production of cured meat products.

S. xylosus converts metmyoglobin to nitrosomyoglobin in culture medium and in meat products without addition of nitrate or nitrite (Li et al., 2013; 2016; Morita et al., 1998). This NO production has been suggested to be linked to nitric oxide synthase (NOS) activity. Bacterial NOSs catalyze oxidation of arginine, which generates NO and citrulline using cellular reductase partners as electron donors (Crane et al., 2010; Gusarov et al., 2008). *Staphylococcus* NOS has been extensively studied in *S. aureus* (Bird et al., 2002; Chartier et al., 2006; van Sorge et al., 2013). Recently, we demonstrated NOS-dependent NO production in the culture medium of the *S. xylosus* C2a strain by characterization of the corresponding *nos* deletion mutant (Ras et al., 2017). The *nos*-encoding gene is present among all *Staphylococcus* genomes sequenced (Sapp et al., 2014) and has been identified from 30 *Staphylococcus* species, including 25 coagulase-negative species (UniProtKB database, release 2017_03). NOS activity has been investigated among different species of CNS, but was only revealed for one strain of *S. haemolyticus* (Sánchez Mainar and Leroy, 2015; Sánchez Mainar et al., 2014).

In this study, we explored the diversity of the *nos* gene in five species of CNS isolated from meat. We evaluated the potential of these species to develop a red coloration *via* their ability to convert metmyoglobin to red myoglobin derivatives such as oxymyoglobin and nitrosomyoglobin. Assessment of nitrosomyoglobin formation was investigated by evaluation of the nitrosoheme.

2. Materials and methods

2.1 Bacterial strains and growth conditions

A total of 113 strains of CNS, all isolated from meat, were used in this study. The *S. xylosus* C2a strain, for which the NOS-mediated NO production was demonstrated, was used as reference (Ras et al., 2017). The collection was composed of *S. carnosus* (16 strains), *S. xylosus* (30 strains), *S. saprophyticus* (27 strains), *S. equorum* (34 strains), and *S. warneri* (6 strains). Strains were routinely cultured in tryptic soy broth (TSB, Difco) under aerobic conditions (1:10 volume to flask ratio, 150 rotation per minute) at 30°C.

2.2 DNA extraction, primers, PCR and sequencing

Genomic DNA was prepared from overnight cultures. Briefly, cells were resuspended in Tris-EDTA-sucrose buffer containing 0.1 mg/mL lysostaphin (Sigma-Aldrich) and incubated for 30 min at 37°C. Cells were lysed with sodium dodecyl sulfate and treated with RNase A. Following extraction with phenol-chloroform-isoamyl alcohol (25/24/1) and chloroform, DNA was precipitated with ethanol and resuspended in Tris-EDTA buffer (pH 8.0). Amplification of *nos* was performed using primers designed for each species (Table 1) and GO Taq DNA polymerase (Promega). PCR was carried out using the following conditions: initial denaturation step at 94°C for 5 min, primer annealing at 55°C for *S. xylosus*, 54°C for *S. equorum* and *S. warneri* and 53°C for *S. carnosus* and *S. saprophyticus* for 30 sec, elongation step at 72°C for 1 min and denaturation at 94°C for 30 sec. Overall, 25 cycles were performed. A final elongation step at 72°C for 5 min was conducted. PCR products were visualized by 1% agarose gel electrophoresis with SafeView staining (Applied Biological Materials), and imaged on a Gel Doc 2000 (Bio-Rad). PCR products were purified using QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen). The sequencing of purified fragments was performed by GATC Biotech (Mulhouse, France). The generated sequences were edited with Chromas Lite (version 2.6, Technelysium Pty Ltd, South Brisbane, Queensland, Australia). The *nos* forward and reverse sequences of the 113 strains were assembled in contigs using online CAP3 (Huang and Madan, 1999).

2.3 Phylogenetic analysis

The nucleotide sequences of *nos* genes were converted into amino acid sequences and aligned with MACSE (Ranwez et al., 2011). A maximum likelihood-based phylogenetic tree was built with the online PHYML server (version 3.0) (Guindon et al., 2010). A model selection procedure based on the Akaike information criterion selected an LG amino acid substitution model and a Γ distribution to take into account variation of mutation rate among positions (Le and Gascuel, 2008). A near-neighbor interchange (NNI) branch swapping process was used during tree optimization. A thousand bootstrap replicates were obtained to assess the robustness of the inferred phylogenetic relationships. The amino acid residues making up the active site were determined on the basis of the analysis of Pant et al. (2002) using the *S. aureus* NOS as template. The data were submitted to WebLogo (weblogo.berkeley.edu/logo.cgi) to generate sequence profiles of the active site.

2.4 Metmyoglobin conversion and nitrosoheme formation

These assays were performed as described by Ras et al. (2017). Briefly, overnight cultures were inoculated at an OD_{600nm} of 0.5 in TSB supplemented with freshly prepared metmyoglobin solution (2 mg/mL). Cultures were incubated either under limited oxygen (covered with mineral oil and without stirring) or under aerobic conditions as described above. After 24 h of incubation at 30°C, culture supernatants were used to measure the absorbance spectrum between 500 and 600 nm (BioMate 3, Thermo Fisher Scientific). Then, to determine the production of nitrosomyoglobin in the culture supernatants, the nitrosoheme was extracted with acetone and absorbance was acquired between 450 and 640 nm (V-770 UV/visible, Jasco) as described by Yu et al. (2016). Experiments were carried out in three independent biological replicates.

2.5 Statistical analysis

The data were analyzed by using GraphPad Prism software (version 5.01). The formation of red myoglobin derivatives, of nitrosoheme and of cellular populations was analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) with Tukey's multiple comparisons. $p < 0.05$ was considered significant and $p < 0.001$ was considered highly significant.

2.6 Nucleotide sequence accession number

The *nos* sequences from CNS species used in this study have been deposited in the GenBank database under the accession numbers MF186940-MF187052.

3. Results

3.1 NOS phylogenetic analysis

PCR screening was used to assess the presence of *nos* among 113 CNS strains belonging to *S. equorum*, *S. xylosum*, *S. saprophyticus*, *S. carnosus*, and *S. warneri*. This screening, based on the species-specific primers designed (Table 1), revealed that a *nos*-encoding gene was amplified for all the strains from the 5 species, as expected.

The size of these PCR products varied from 910 to 1,051 bp and represented almost the entirety (85 to 99%) of the *nos* gene (Table 1). Subsequently, a phylogenetic analysis of NOS was performed (Fig. 1). NOS amino acid sequences from CNS shared 80 to 86% similarity with the NOS of *Staphylococcus aureus* MW2. They shared 54 to 56% and 64 to 66% similarity with NOS of *Deinococcus radiodurans* and *Bacillus subtilis*, respectively.

The phylogenetic tree revealed that the strains belonging to the same species were clustered with a high infraspecies NOS similarity (98 to 99%). Furthermore, the strains belonging to *S. equorum* were divided into two distinct groups (Fig. 1). Percentage similarity ranged from 81 to 91% between species. The NOS sequences from *S. equorum*, *S. xylosus*, including the C2a strain, and *S. saprophyticus* shared 87 to 91% similarity. They shared 81 to 84% similarity with *S. carnosus*. The *S. warneri* NOS sequences were closer to that of *S. aureus* (86% similarity).

The active sites of NOS represented by 62 amino acids were analyzed in the corresponding sequences of the five species of CNS (Fig. 2). Within species, there was more than 99% similarity in NOS active sites and 87 to 98% between species, showing that active sites were highly conserved among NOS of CNS. The active sites of NOS from *S. equorum*, *S. xylosus*, and *S. saprophyticus* shared 97 to 98% similarity. The subdivision within *S. equorum* was mainly due to a difference of one amino acid residue at the dimer interface: 55A in sub-group 1 versus 55S in sub-group 2 (Fig. 2). The active site of NOS from *S. carnosus* strains had 6 substituted amino acid residues (2L, 3T, 5S, 22I, 24T and 30V) compared with those of the four other species (Fig. 2).

3.2 Formation of red myoglobin derivatives under two oxygen conditions

To characterize the ability of CNS to form red pigments from metmyoglobin in aerobic and limited oxygen conditions, 50 % of the strains were selected to represent the genetic diversity among the NOS sequences. Thus, 17 strains belonging to *S. equorum* (9 strains from the first sub-group and 8 from the second sub-group), 15 from *S. xylosus*, including the C2a strain, 13 from *S. saprophyticus*, 9 from *S. carnosus*, and 3 from *S. warneri* were studied.

The absorbance spectrum of the red myoglobin derivatives was measured for all strains and two characteristic absorption peaks were detected at 548 and 581 nm, while the control samples, TSB-metmyoglobin without bacteria, maintained their brown color throughout the experiments. A typical absorbance spectrum for each species is presented in Fig. 3A. As the values at the two peaks were correlated ($r^2 > 0.98$ for each species), only the value corresponding to $\lambda_{581 \text{ nm}}$ was used to compare the formation of red pigments within the CNS.

The median values of red myoglobin derivatives were higher in aerobiosis than in limited oxygen conditions for all the species (Fig. 3, B, C). Under aerobiosis, 52 out of 57 strains, whatever the species, were able to form the red pigment, but high variability between strains was observed within species (Fig. 3B). Therefore, the formation of red myoglobin derivatives did not differ significantly between species. However, for *S. xylosus* and *S. saprophyticus*, the

median values of pigments formation were identical and there was little dispersion in the average values, whereas pigment formation was very heterogeneous for *S. equorum* and *S. carnosus* (Fig. 3B). For *S. equorum*, 2 strains were negative and, among the 9 strains of *S. carnosus*, 3 were negative, one showed very low ability to form red derivatives, while the remaining 5 strains showed high ability (Fig. 3B). This variability in the formation of pigments was not due to a difference in population, which, after 24 h incubation, ranged between 8.8 and 9.5 log (CFU/mL) and was not significantly different.

Under limited oxygenated condition, the species *S. equorum*, *S. warneri*, and *S. carnosus* produced little or no red myoglobin derivatives, while *S. xyloso* and *S. saprophyticus* had a significantly higher potential ($p < 0.001$) (Fig. 3C). In these assays, the final population remained close to the initial OD of 0.5 corresponding to 8 log (CFU/mL).

3.3. Assessment of NO production under aerobic conditions

A representative nitrosoheme spectrum of each species and the control spectrum after acetone extraction are presented in Fig. 4A. *S. xyloso* appeared to be the most efficient NO producer ($p < 0.05$), while no significant difference was noted between the four other species (Fig. 4B). Indeed, 100% of the *S. xyloso* strains were able to produce NO. Within the four other species, NO production was strain-dependent and highly variable. Thus, 85% of the strains from *S. saprophyticus*, 67% from *S. warneri*, 65% from *S. equorum*, and 55% from *S. carnosus* produced NO (Fig. 4B).

4. Discussion

Our results add to the data on the distribution of the *nos* gene in five species of CNS frequently isolated from meat (Coton et al., 2010; Leroy et al., 2010). We identified the *nos* gene in all 113 CNS belonging to *S. xyloso* and *S. carnosus* used as meat starter cultures, and to *S. equorum*, *S. saprophyticus*, and *S. warneri*, which are frequently isolated from fermented sausages. Sanchez-Mainar et al. (2014) identified the *nos* gene by PCR in 62 of 86 strains of CNS of different origins. Using different pairs of primers, these authors failed to identify *nos* in a few strains belonging to *S. equorum*, *S. warneri*, and *S. xyloso*.

We showed that the NOS sequence is highly conserved within CNS, with a percentage similarity ranging from 81 to 91% between species and especially well conserved among active sites, with 87 to 98% similarity between species. van Sorge et al. (2013) showed that

the *nos* sequences within MRSA strains were nearly identical and close to those of *S. saprophyticus* and *S. warneri* (68.5 to 72.0% identity).

The incubation of CNS with metmyoglobin (MbFe^{III} OH) in aerobic and limited oxygen conditions led to a red color with typical absorbance spectrum. This spectrum is characteristic of the red myoglobin derivatives nitrosomyoglobin (MbFe^{II}NO) and oxymyoglobin (MbFe^{II}O₂) (Gøtterup et al., 2007; Li et al., 2013; 2016). It is difficult to differentiate between these two derivatives because they exhibit absorbance bands at very similar wavelengths.

It is well established that bacterial NOS require oxygen to convert arginine into NO and citrulline (Crane et al., 2010). In a previous study we demonstrated that *S. xylosus* C2a was able to form nitrosomyoglobin in aerobic conditions, while its *nos*-deficient mutant was unable (Ras et al., 2017). We demonstrated also that nitrosomyoglobin was formed in limited oxygen but not only *via* NOS activity. To assess the role of NOS, we therefore, studied the formation of nitrosomyoglobin by diverse CNS strains only after incubation in aerobic conditions. All the strains of *S. xylosus*, 80% of the strains of *S. saprophyticus*, 65% of *S. equorum*, 67% of *S. warneri*, and 55% of *S. carnosus* were able to produce NO. In all cases, production of NO was low, as nitrosomyoglobin accounted for 16% of the red pigments for *S. xylosus*, 10% for *S. saprophyticus*, and 9% for *S. equorum*, *S. warneri*, and *S. carnosus*. The potential for nitrosomyoglobin formation among CNS, in the absence of added nitrate and nitrite, has been little explored, except for *S. xylosus* where Morita et al. (1998) and Li et al. (2013) demonstrated the ability of two strains, FAX-1 and A1, respectively, to form nitrosomyoglobin in metmyoglobin-MRS broth or in meat batter. Assay of NOS activity in a collection of CNS by measuring the conversion of arginine to citrulline in different aeration conditions showed that and only one strain of *Staphylococcus haemolyticus* displayed a NOS like activity (Sánchez Mainar et al., 2014).

Our results here show that the major pigment formed from metmyoglobin (MbFe^{III} OH) was oxymyoglobin (MbFe^{II}O₂), particularly in aerobic conditions, with high heterogeneity between strains for the five species studied. In limited aeration, only *S. xylosus* and *S. saprophyticus* were able to form the colored derivatives. To form MbFe^{II}O₂, the first step is reduction of ferric iron Fe^{III} to ferrous iron Fe^{II}, which has a high affinity for O₂ (or NO for MbFe^{II}NO) (Cooper, 1999). In our conditions, this reduction depended on CNS metabolism, as the control metmyoglobin-TSB incubated in aerobic or in limited oxygen conditions remained brown and did not show the typical spectrum of the red derivatives. Gøtterup et al. (2007) have already shown by electron spin resonance that *S. saprophyticus* incubated in MRS broth in the presence of metmyoglobin reduces MbFe^{III} to MbFe^{II}. Their hypothesis was

that the growth of the bacteria generated reductive conditions (Gøtterup et al., 2007). In our conditions, the redox potential measured by a redox meter (Pt4805-SC-DPAS-K8S/225, Mettler Toledo) both in aerobic and low oxygen cultures did not vary (+0.5 mV to -3.5 mV) after 24- h incubation, attesting to the non-reducing capacity of the CNS species studied (data not shown). On the other hand, bacteria have reductases that transfer electrons from NADPH through FAD and/or FMN (Ceccarelli et al., 2004; Schröder et al., 2003). A staphylococcal reductase could be involved in the transfer of electrons to the heme iron of metmyoglobin MbFe^{III} in our conditions. It has been suggested that membrane-bound ferric reductase activity reported for *S. aureus* is part of a membrane-bound electron transport chain that uses NADH, succinate, glycerol-3 phosphate, or L-lactate as donor to reduce ferric iron. This activity was assayed in aerobic and anaerobic conditions (Lascelles and Burke, 1978).

4. Conclusions

Our results highlight the potential of five CNS species to form two red myoglobin derivatives, nitrosomyoglobin and oxymyoglobin, from metmyoglobin. The potential of these bacteria to form nitrosomyoglobin potentially through the NOS pathway, was limited in our conditions. However, the potential for oxymyoglobin formation was high, especially under aerobic conditions, and originated from a yet-to-be discovered mechanism. The contribution of reductase could be relevant. However, the contribution of staphylococcal reductase to the formation of oxymyoglobin in meat remains to be explored.

ACKNOWLEDGEMENTS

GR is a Ph.D. Research Fellow funded by ANRT, CIFRE 2013/1490. We would like to thank Philippe Gatellier, INRA, for helpful discussions about myoglobin derivatives. The authors are grateful to David Marsh for correcting our English.

REFERENCES

- Bird, L.E., Ren, J., Zhang, J., Foxwell, N., Hawkins, A.R., Charles, I.G., Stammers, D.K., 2002. Crystal structure of SANOS, a bacterial nitric oxide synthase oxygenase protein from *Staphylococcus aureus*. *Structure* 10, 1687-1696.
- Blaiotta, G., Pennacchia, C., Villani, F., Ricciardi, A., Tofalo, R., Parente, E., 2004. Diversity and dynamics of communities of coagulase-negative staphylococci in traditional fermented sausages. *Journal of Applied Microbiology* 97, 271-284.
- Ceccarelli, E.A., Arakaki, A.K., Cortez, N., Carrillo, N., 2004. Functional plasticity and catalytic efficiency in plant and bacterial ferredoxin-NADP(H) reductases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* 1698, 155-165.

- Chartier, F.J., Blais, S.P., Couture, M., 2006. A weak Fe-O bond in the oxygenated complex of the nitric-oxide synthase of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Biological Chemistry* 281, 9953-9962.
- Code of Federal Regulations (2016). Title 21- Food and Drugs, Chapter I- Food and Drug administration, department of health and human services, Subchapter B- Food for human consumption, Part 172- Food additives permitted for direct addition to food for human consumption, Subpart B- Food preservatives.
- Commission Regulation [EU] (2011). N° 1129/2011 of November 2011 amending Annex II to Regulation (EC) N° 1333/2008 of the European Parliament and of the Council by establishing a Union list of food additives. *Official Journal of the European Union*. L295:1-177.
- Cooper, C.E., 1999. Nitric oxide and iron proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* 1411, 290-309.
- Corbière Morot-Bizot, S., Leroy, S., Talon, R., 2006. Staphylococcal community of a small unit manufacturing traditional dry fermented sausages. *International Journal of Food Microbiology* 108, 210-217.
- Coton, E., Desmots, M.H., Leroy, S., Coton, M., Jamet, E., Christieans, S., Donnio, P.Y., Lebert, I., Talon, R., 2010. Biodiversity of coagulase-negative Staphylococci in French cheeses, dry fermented sausages, processing environments and clinical samples. *Int. J. Food. Microbiol.* 137, 221-229.
- Crane, B.R., Sudhamsu, J., Patel, B.A., 2010. Bacterial nitric oxide synthases. *Annual Review of Biochemistry* 79, 445-470.
- De Mey, E., De Maere, H., Paelinck, H., Fraeye, I., 2015. Volatile N-nitrosamines in Meat Products: Potential Precursors, Influence of Processing and Mitigation Strategies. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 0.
- Gøtterup, J., Olsen, K., Knöchel, S., Tjener, K., Stahnke, L.H., Møller, J.K., 2007. Relationship between nitrate/nitrite reductase activities in meat associated staphylococci and nitrosylmyoglobin formation in a cured meat model system. *International Journal of Food Microbiology* 120, 303-310.
- Gøtterup, J., Olsen, K., Knöchel, S., Tjener, K., Stahnke, L.H., Møller, J.K., 2008. Colour formation in fermented sausages by meat-associated staphylococci with different nitrite- and nitrate-reductase activities. *Meat Sci.* 78, 492-501.
- Guindon, S., Dufayard, J.F., Lefort, V., Anisimova, M., Hordijk, W., Gascuel, O., 2010. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Systematic Biology* 59, 307-321.
- Gusarov, I., Starodubtseva, M., Wang, Z.Q., McQuade, L., Lippard, S.J., Stuehr, D.J., Nudler, E., 2008. Bacterial nitric-oxide synthases operate without a dedicated redox partner. *Journal of Biological Chemistry* 283, 13140-13147.
- Honikel, K.O., 2008. The use and control of nitrate and nitrite for the processing of meat products. *Meat Sci.* 78, 68-76.
- Huang, X., Madan, A., 1999. CAP3: A DNA sequence assembly program. *Genome Research* 9, 868-877.

- Iacumin, L., Manzano, M., Comi, G., 2012. Catalase-positive cocci in fermented sausage: Variability due to different pork breeds, breeding systems and sausage production technology. *Food Microbiology* 29, 178-186.
- Irlinger, F., 2008. Safety assessment of dairy microorganisms: coagulase-negative staphylococci. *International Journal of Food Microbiology* 126, 302-310.
- Lascelles, J., Burke, K.A., 1978. Reduction of ferric iron by L-lactate and DL-glycerol-3-phosphate in membrane preparations from *Staphylococcus aureus* and interactions with the nitrate reductase system. *Journal of Bacteriology* 134, 585-589.
- Le, S.Q., Gascuel, O., 2008. An improved general amino acid replacement matrix. *Molecular Biology and Evolution* 25, 1307-1320.
- Leroy, F., Verluyten, J., De Vuyst, L., 2006. Functional meat starter cultures for improved sausage fermentation. *International Journal of Food Microbiology* 106, 270-285.
- Leroy, S., Giammarinaro, P., Chacornac, J.P., Lebert, I., Talon, R., 2010. Biodiversity of indigenous staphylococci of naturally fermented dry sausages and manufacturing environments of small-scale processing units. *Food. Microbiol.* 27, 294-301.
- Leroy, S., Vermassen, A., Talon, R., 2016. *Staphylococcus*: Occurrence and Properties. In: B. CABALLERO, P.M. FINGLAS, F. TOLDRÁ (Eds.) *Encyclopedia of Food and Health*, Academic Press, Oxford, 2016, 140-145.
- Li, P., Kong, B., Chen, Q., Zheng, D., Liu, N., 2013. Formation and identification of nitrosylmyoglobin by *Staphylococcus xylosus* in raw meat batters: a potential solution for nitrite substitution in meat products. *Meat Sci.* 93, 67-72.
- Li, P.J., Luo, H.T., Kong, B.H., Liu, Q., Chen, C.G., 2016. Formation of red myoglobin derivatives and inhibition of spoilage bacteria in raw meat batters by lactic acid bacteria and *Staphylococcus xylosus*. *Lwt-Food Science and Technology* 68, 251-257.
- Lücke, F.K., 2000. Utilization of microbes to process and preserve meat. *Meat Sci* 56, 105-115.
- Marty, E., Buchs, J., Eugster-Meier, E., Lacroix, C., Meile, L., 2012. Identification of staphylococci and dominant lactic acid bacteria in spontaneously fermented Swiss meat products using PCR-RFLP. *Food Microbiology* 29, 157-166.
- Morita, H., Sakata, R., Nagata, Y., 1998. Nitric oxide complex of iron(II) myoglobin converted from metmyoglobin by *Staphylococcus xylosus*. *Journal of Food Science* 63, 352-355.
- Pant, K., Bilwes, A.M., Adak, S., Stuehr, D.J., Crane, B.R., 2002. Structure of a nitric oxide synthase heme protein from *Bacillus subtilis*. *Biochemistry* 41, 11071-11079.
- Ranwez, V., Harispe, S., Delsuc, F., Douzery, E.J., 2011. MACSE: Multiple Alignment of Coding SEquences accounting for frameshifts and stop codons. *PLoS One* 6, e22594.
- Ras, G., Zuliani, V., Derkx, P., Seibert, T.M., Leroy, S., Talon, R., 2017. Evidence for Nitric Oxide Synthase Activity in *Staphylococcus xylosus* Mediating Nitrosoheme Formation. *Frontiers in Microbiology* 8.
- Ratsimba, A., Leroy, S., Chacornac, J.P., Rakoto, D., Arnaud, E., Jeannoda, V., Talon, R., 2017. Staphylococcal ecosystem of kitoza, a traditional malagasy meat product. *International Journal of Food Microbiology* 246, 20-24.

Sánchez Mainar, M., Leroy, F., 2015. Process-driven bacterial community dynamics are key to cured meat colour formation by coagulase-negative staphylococci via nitrate reductase or nitric oxide synthase activities. *International Journal of Food Microbiology*.

Sánchez Mainar, M., Weckx, S., Leroy, F., 2014. Coagulase-negative Staphylococci favor conversion of arginine into ornithine despite a widespread genetic potential for nitric oxide synthase activity. *Applied and Environmental Microbiology* 80, 7741-7751.

Sapp, A.M., Mogen, A.B., Almand, E.A., Rivera, F.E., Shaw, L.N., Richardson, A.R., Rice, K.C., 2014. Contribution of the *nos-pdt* operon to virulence phenotypes in methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus*. *PLoS One* 9, e108868.

Schröder, I., Johnson, E., de Vries, S., 2003. Microbial ferric iron reductases. *FEMS Microbiology Reviews* 27, 427-447.

Talon, R., Leroy, S., 2014. Fermented Meat Products and the Role of Starter Cultures. In: Batt, C.A., Tortorello, M.L. (Eds.), *Encyclopedia of Food Microbiology*, vol 1., 870-874.

Talon, R., Walter, D., Chartier, S., Barriere, C., Montel, M.C., 1999. Effect of nitrate and incubation conditions on the production of catalase and nitrate reductase by staphylococci. *International Journal of Food Microbiology* 52, 47-56.

van Sorge, N.M., Beasley, F.C., Gusarov, I., Gonzalez, D.J., von Köckritz-Blickwede, M., Anik, S., Borkowski, A.W., Dorrestein, P.C., Nudler, E., Nizet, V., 2013. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacterial nitric-oxide synthase affects antibiotic sensitivity and skin abscess development. *Journal of Biological Chemistry* 288, 6417-6426.

Yu, C., Jiao, J., Ma, L., Sun, W., 2016. Effect of pH on the stability and molecular structure of nitrosyl hemochromogen. *Food Chemistry* 196, 503-508.

TABLE 1. Oligonucleotides designed to amplify the *nos* gene

Name	Sequence (5' to 3')	Fragment size	Targeted species
SXnosF4 SXnosR4	AAGCGAAATCCTTTATCGACAC TGAAATGGACAACCAGTAGCTT	1,051 bp *(1,065)	<i>S. xylosus</i> based on C2a sequence (LN554884)
SSnosF1 SSnosR1	CCAAAATGGCATGGAGAAAT TGGAATGGACAACCTGAGTCT	910 bp (1,065)	<i>S. saprophyticus</i> based on sequence ATCC15305 (NC_007350.1)
SQnosF1 SQnosR1	TCAAACAAATGGCACGTATGA AATGGAATGGACAACCCGTA	962 bp (1,065)	<i>S. equorum</i> based on KS1039 sequence (NZ_CP013114.1)
SWnosF1 SWnosR1	GCAACAACATTTATCCAAACGA GGAAAGGGCACTTTGTCTCA	1,048 bp (1,068)	<i>S. warneri</i> based on SG1 sequence (NC_020164.1)
SCnosF1 SCnosR1	AAATAAACGAAAGCGGGACA AAAAGGGCACCTTGTTTTT	968 bp (1,074)	<i>S. carnosus</i> based on TM300 sequence (NC_012121.1)

* Numbers in brackets indicate the total length of the gene of each species (bp)

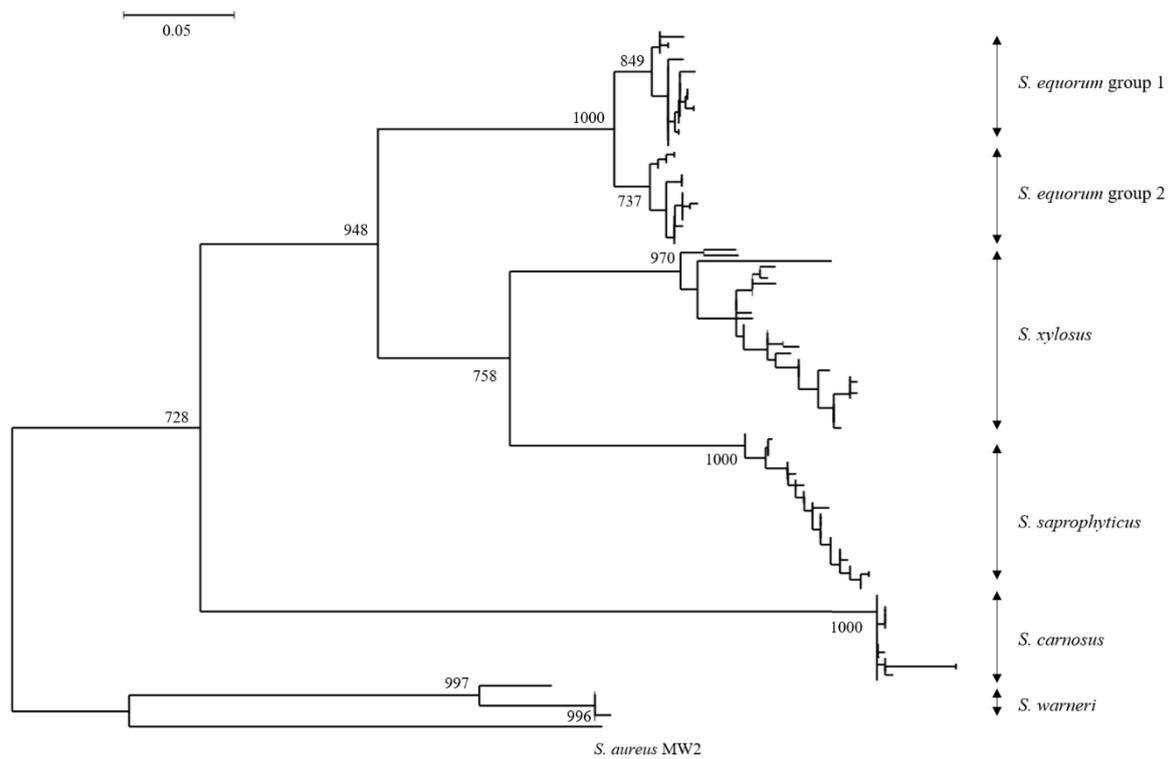


Figure 1. NOS phylogeny among five CNS species of the microbial community of meat. The phylogenetic tree was built based on computational analysis using alignments of NOS amino acid sequences from the CNS studied with available NOS sequences in NCBI from *S. xylosois* C2a (LN554884.1), *S. saprophyticus* ATCC 15305 (NC_007350.1), *S. warneri* SG1 (NC_020164.1), *S. carnosus* TM300 (NC_012121.1) and the genome of *S. equorum* KS1039 (NZ_CP013114.1). The phylogenetic tree was anchored with the NOS sequences of *S. aureus* MW2 (NC_003923.1), *Deinococcus radiodurans* R1 (NC_001263.1), and *Bacillus subtilis* 168 (NC_000964.3). *D. radiodurans* and *B. subtilis* NOS are not shown on the tree. Bootstrap values higher than 700 are indicated.

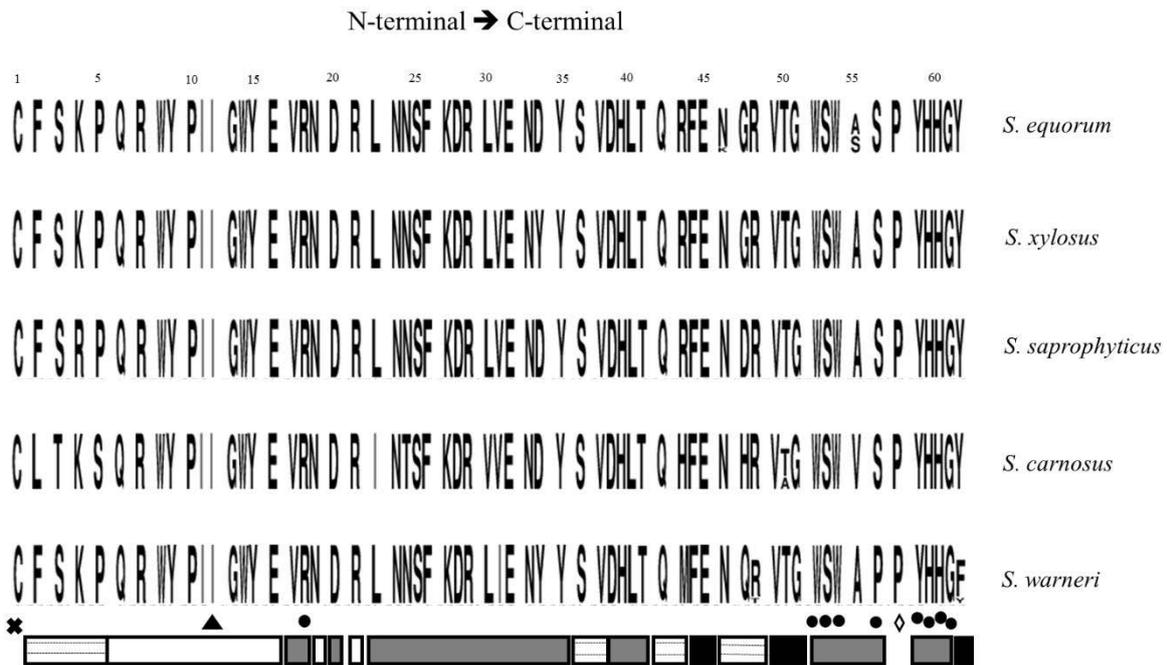


Figure 2. NOS-active sites from CNS. NOS-active sites were spotted on the corresponding sequences from CNS according to the active sites described for *Staphylococcus aureus* NOS (Pant *et al.* 2002). Symbols: (×) cysteine ligands for binding heme-iron, (▲) conserved isoleucine in bacterial NOS is found in all CNS NOS sequences, (●) residues involved in H4B-binding residues, (◇) conserved proline located at the center of the dimer interface of bacterial NOS. White boxes represent residues for L-arginine binding, and gray boxes represent dimer interface residues. The conserved residues in bacterial NOS around the exposed heme edge (white boxes with dashed lines) and affecting pterin binding (black boxes) are represented.

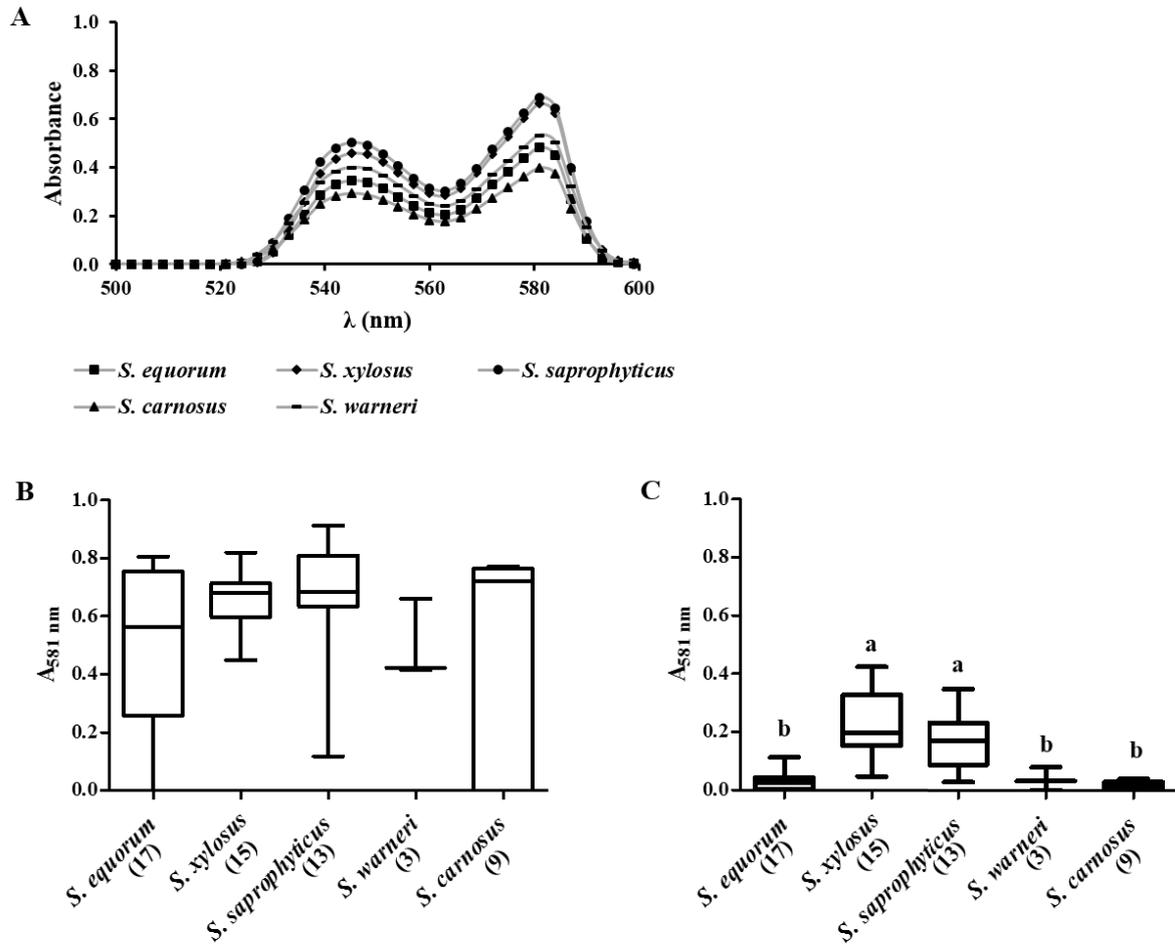


Figure 3. Formation of red myoglobin derivatives by CNS. A) Examples of spectra of red pigment assessed by measuring absorbance between 500 and 600 nm after incubation in aerobic conditions, B) Formation of red pigment under aerobic conditions, C) Formation of red pigment under limited oxygen. The data (B, C) represent the mean from three biological replicates at $\lambda_{581\text{nm}}$. The number of strains studied is indicated in brackets. The letters “a” and “b” denotes statistical differences ($p < 0.001$).

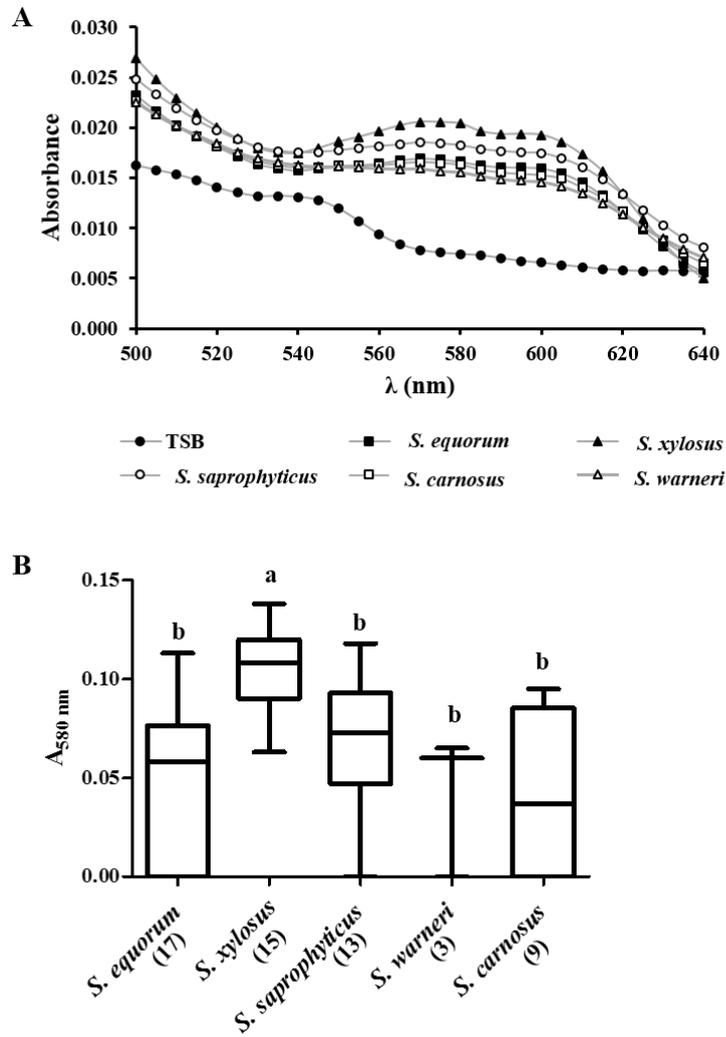


Figure 4. Evaluation of nitrosoheme formation by CNS. A) Typical nitrosoheme-spectrum for each species and the control spectrum, B) Nitrosoheme formation under aerobic conditions. The data represent the mean from three biological replicates at $\lambda_{580\text{nm}}$. The number of strains studied is indicated in brackets. The letters “a” and “b” denotes statistical differences ($p < 0.05$).

ETUDE PRELIMINAIRE :
EXPRESSION DE LA NOS DE
***STAPHYLOCOCCUS XYLOSUS* C2A CHEZ**
ESCHERICHIA COLI

Contexte de l'étude

Nous avons démontré la capacité de la souche *Staphylococcus xylosus* C2a à synthétiser du NO *via* son activité oxyde nitrique synthase (NOS) (article 1). Cependant, les conditions optimales de l'activité NOS de *S. xylosus* ne sont pas connues. En fait, aucune activité NOS n'a été caractérisée chez un staphylocoque à coagulase négative bien que le gène *nos* ait été identifié chez différentes espèces de staphylocoques. Cette activité a été uniquement caractérisée chez *S. aureus* par une approche biochimique de purification de l'enzyme (Bird *et al.* 2002, Hong *et al.* 2003).

Les NOS de différentes bactéries ont pu être caractérisées suite à leur expression hétérologue chez *Escherichia coli*. A noter que *E. coli* ne possède pas de gène *nos*. Les vecteurs d'expression pBAD et pET sont souvent utilisés pour le clonage et l'expression de protéines recombinantes chez *E. coli*. Ainsi, les gènes *nos* de *Bacillus subtilis* et de *Bacillus anthracis* ont été clonés dans le vecteur pBAD en vue de l'expression hétérologue de leur NOS (Gusarov *et al.* 2008). De la même façon, les gènes *nos* de *B. subtilis*, de *Deinococcus radiodurans* et de *Streptomyces turgidiscabies* ont été clonés dans un vecteur pET (Adak *et al.* 2002a, Adak *et al.* 2002b, Kers *et al.* 2004).

Nous avons ainsi envisagé de cloner le gène *nos* de la souche C2a dans un vecteur pBAD et de réaliser l'expression de la protéine recombinante correspondante chez une souche d'*E. coli* afin de pouvoir caractériser l'activité de la NOS de *S. xylosus*.

Matériels et Méthodes

Souches et conditions de culture

Les souches bactériennes et les plasmides utilisés au cours de cette étude sont présentés dans le Tableau 4.

Tableau 4. Liste des souches et des plasmides utilisés.

Souche ou plasmide	Caractéristique	Source ou référence
<i>Staphylococcus xylosus</i>		
C2a	Souche séquencée et ayant une activité NOS démontrée	LN554884 (Ras <i>et al.</i> 2017)
<i>Escherichia coli</i>		
TOP10	Souche utilisée pour la propagation des plasmides et l'expression hétérologue des protéiques	Invitrogen
Plasmides		
pBAD/His	Vecteur d'expression contenant une étiquette poly-histidine, Amp ^R	Invitrogen
pBAD- <i>nos</i>	pBAD/His contenant le gène <i>nos</i> de <i>S. xylosus</i> C2a	Cette étude

La souche *S. xylosus* C2a a été cultivée en bouillon Trypticase Soja (TSB, Difco) pendant 18 heures à 30°C sous agitation (150 rpm). La souche de *E. coli* TOP10 a été cultivée en milieu Luria-Bertani (LB, Difco) sous agitation (200 rpm) ou sur LB agar à 37°C. Lorsque nécessaire, la souche d'*E. coli* a été cultivée en présence d'ampicilline (100 µg/ml).

Le vecteur d'expression

La carte du vecteur d'expression pBAD/His est présentée Figure 25. Ce vecteur de 4.1 kb contient l'origine de répllication du plasmide pBR322 pour le contrôle du faible nombre de copie du vecteur d'expression chez *E. coli*. La présence du promoteur *araBAD*, situé 28 nucléotides avant le site de fixation du ribosome, permet l'initiation de la transcription. Ainsi, le gène à exprimer est sous la dépendance de ce promoteur inductible par l'arabinose. Le site de clonage multiple contient les sites de coupure de 9 enzymes de restriction. Un gène de résistance à l'ampicilline permet la sélection des bactéries transformées. Le codon d'initiation ATG est placé en amont d'une étiquette peptidique poly-histidine qui est donc placée en position N- de la protéine recombinante à exprimer. Après cette étiquette, un site de

reconnaissance d'une protéase, l'entérokinase (N-N-N-N-K), permet, si nécessaire, le clivage de l'étiquette histidine de la protéine recombinante. Entre l'étiquette histidine et ce site de clivage, un épitope permet la reconnaissance spécifique de la protéine recombinante par un anticorps approprié. La protéine AraC est un facteur de régulation de transcription. Sous forme de dimère, elle se fixe à proximité du promoteur et empêche la transcription. En présence d'arabinose, le dimère ne peut plus se former ce qui permet la fixation de l'ARN polymérase et donc l'initiation de la transcription.

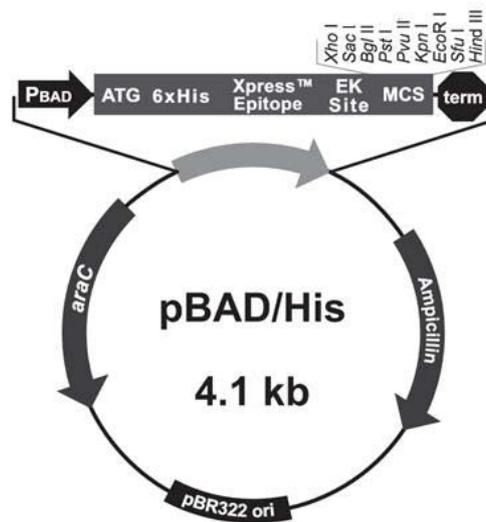


Figure 25. Cartographie du vecteur pBAD/His.

P_{BAD} : promoteur *araBAD* ; EK site : site de reconnaissance de l'entérokinase ; MCS : site de clonage multiple ; term : terminateur de transcription

Extraction de l'ADN

L'ADN génomique de la souche *S. xylosus* C2a a été extrait selon le protocole suivant : les cellules ont été reprises dans un tampon Tris-EDTA-saccharose contenant 0.1 mg/mL de lysostaphine (Sigma-Aldrich) et incubées 30 min à 37°C. Les cellules ont été lysées en tampon Tris-EDTA-SDS et traitées à la RNase A. L'ADN a été solubilisé par un traitement phénol-chloroforme et précipité à l'éthanol puis repris dans un tampon Tris-EDTA (pH 8.0). Les plasmides pBAD ont été préparés avec le kit NucleoSpin Plasmid QuickPure (Macherey-Nagel).

Clonage du gène nos et transformation

Nous avons choisi de cloner le gène *nos* au niveau des sites de restriction PstI et EcoRI du plasmide pBAD/His. Les oligonucléotides utilisés pour l’amplification du gène *nos* de *S. xylosus* C2a (LN554884) sont présentés Tableau 5. Le gène *nos* (incluant le codon de terminaison) a été amplifié par l’ADN polymérase Phusion High-Fidelity (New England Biolabs) avec le couple d’amorces SXnosF1_PstI/SXnosNHR1-EcoRI. Les conditions d’amplifications ont consisté en une dénaturation initiale de 5 min à 94°C suivies par 30 cycles de (30 sec à 94°C, 30 sec à 60°C et 1 min à 72°C) et une élongation finale de 7 min à 72°C. Le produit d’amplification a été déposé sur gel d’agarose (0.8%) puis visualisé après coloration au bromure d’éthidium sur un Gel Doc 2000 (Bio-Rad). Il a été purifié avec le kit QIAquick PCR Purification (Qiagen). Le produit d’amplification et le vecteur pBAD/His ont été digérés avec les enzymes de restrictions PstI et EcoRI (New England Biolabs). Après purification, une ligation a été réalisée avec la T4 DNA ligase (Roche).

La souche de *E. coli* TOP10 compétente a été transformée avec le vecteur pBAD-*nos*. La souche transformée a été sélectionnée sur boîte de LB agar contenant de l’ampicilline. Les plasmides de plusieurs transformants ont été extraits avec le kit NucleoSpin Plasmid QuickPure (Macherey-Nagel) et les constructions ont été vérifiées par PCR avec les couples d’amorces pBAD_F1/pBAD_R1 puis le séquençage des produits amplifiés.

Tableau 5. Oligonucléotides utilisés.

Nom	Séquence (5' vers 3') ^a	Utilisation
SXnosF1_PstI	AA <u>CTGCAGC</u> TTTAAAAGAAGCGAAATCCTT	Amplification de <i>nos</i> pour clonage dans pBAD/His
SXnosR1NH_EcoRI	CGGA <u>ATTCT</u> CAATGAAATGGACAACCAGTAGC	
pBAD_F1	ATGCCATAGCATT TTTTATCC	Amplification de part et d'autre du site de clonage de pBAD/His
pBAD_R1	CTGATTTAATCTGTATCAGG	

^aLes régions soulignées représentent les sites des enzymes de restriction

Expression de la protéine recombinante et extraction des protéines

La souche de *E. coli* TOP10 contenant le vecteur pBAD-*nos* a été cultivée en LB plus amplicilline sous agitation jusqu’à une DO_{600nm} de 0,5 puis une induction avec 0,2% d’arabinose a été réalisée pendant 3h à 37°C puis 16h à 20°C.

Les cellules ont été centrifugées (4°C) et lavées en tampon PBS puis reprises en tampon BisTris (50 mM, pH 7.2). L'extraction des protéines a été réalisée à partir de ce culot cellulaire après la lyse des cellules au FastPrep™ (MP Biomedicals) en présence de billes de verre. Le lysat obtenu a été centrifugé puis le surnageant contenant les protéines intracellulaires a été ultra centrifugé pendant 30 min à 100 000 g à 4°C.

Electrophorèse des protéines et détection immunologique

Les extraits protéiques ont été déposés sur un gel de polyacrylamide 15% (Biorad) en conditions dénaturantes (0.1% SDS) et migrés sous ampérage constant 25 mA. Les protéines ont soit été révélées après coloration au bleu de Coomassie soit transférées sur une membrane de nitrocellulose avec un iBlot™ 2 Dry Blotting System (Invitrogen). La membrane a été saturée en tampon PBS - 10% lait écrémé, 1h à température ambiante, puis incubée avec un anticorps anti-histidine marqué à la peroxydase de raifort (HRP), 1h à température ambiante. Après quatre lavages en tampon PBS - 0.1% Tween 20 - 1% lait écrémé, la membrane a été traitée avec le kit SuperSignal™ West Dura (ThermoFisher) et le signal a été détecté avec un capteur G:BOX iChemi (SynGene).

Recherche de l'activité NOS recombinante

L'activité NOS a été recherchée sur la base de l'oxydation du NOHA dépendante de l'H₂O₂ (Bird *et al.* 2002). Les protéines extraites ont été incubées dans un tampon Bis Tris (50 mM, pH 7.2) supplémenté soit en :

- 1) H₂O₂ (4 mM)
- 2) H₂O₂ (4 mM) + SOD (10 U/ml) + H₄B (ou H₄F) (20 µM)
- 3) H₂O₂ (4 mM) + SOD (10 U/ml) + H₄B (ou H₄F) (20 µM) + FAD (10 µM) + FMN (10 µM) + NADPH (1 mM)

La réaction a été initiée par l'ajout de 2 mM de NOHA dans les mélanges réactionnels. Ils ont été incubés à 30°C ou 37°C pendant 15 et 30 minutes. Un échantillon prélevé immédiatement après l'initiation de la réaction a servi de valeur initiale (T₀). Le nitrite produit a été dosé par dosage colorimétrique avec le kit « Nitrite/Nitrate Assay » (Sigma-Aldrich).

Résultats

La séquence complète du gène *nos* de *S. xylosus* a été cloné dans le plasmide pBAD/His ce qui a permis d'intégrer une étiquette poly-histidine (6xHis) en N-terminal. Un clone de la souche *E. coli* Top10 hébergeant pBAD-*nos* a été sélectionné après validation de la construction par PCR puis séquençage. La construction a modifié les propriétés de la protéine native. Ainsi, la protéine NOS recombinante est constituée de 392 acides aminés, correspondant à une masse moléculaire théorique de 45,2 kDa et à un pI de 6,12, au lieu de 354 acides aminés, correspondant à une masse moléculaire de 41,1 kDa et un pI de 6,17 pour la protéine native.

Après induction de l'expression de *nos* chez *E. coli*, les protéines intracellulaires ont été extraites et analysées par électrophorèse SDS-PAGE. Après une simple coloration, il n'a pas été possible de mettre en évidence la surproduction de la protéine recombinante (Figure 26). L'analyse par Western blot en utilisant un anticorps spécifique de l'étiquette poly-histidine a permis de révéler la présence de la NOS recombinante (Figure 26). La protéine NOS recombinante a une masse moléculaire apparente d'environ 40 kDa. L'extrait protéique préparé à partir d'un clone de *E. coli* Top10 contenant le plasmide pBAD/His sans insert a servi de contrôle négatif.

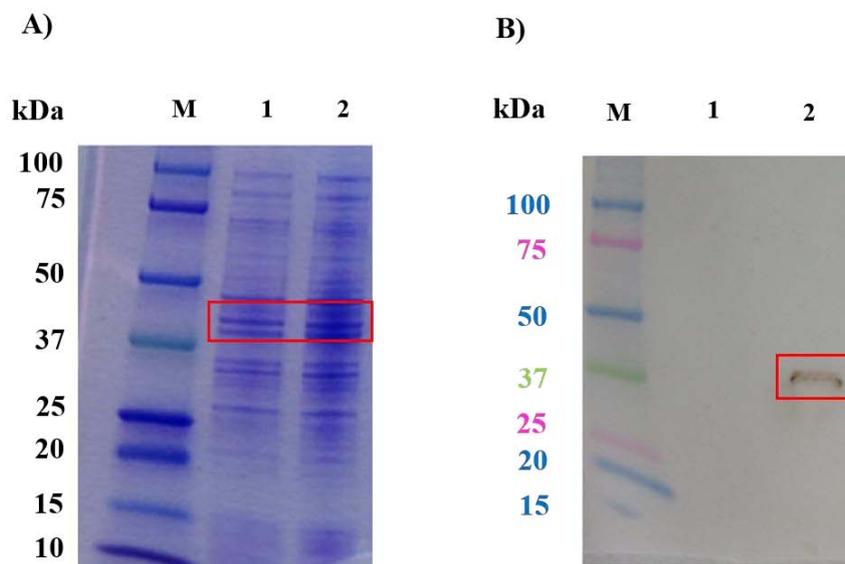


Figure 26. Détection de la protéine NOS recombinante par A) électrophorèse SDS-PAGE et B) Western blot révélatrice avec un anticorps anti-histidine. M : marqueur de masse moléculaire, 1 : extrait protéique de la souche *E. coli* contenant pBAD/His sans insert, 2 : extrait protéique de la souche *E. coli* contenant pBAD-*nos*.

Une activité NOS a été recherchée à partir des extraits protéiques. Les extraits protéiques contenant la NOS recombinante ont été incubés à 30 ou 37°C en présence de NOHA comme

substrat et d'H₂O₂, avec ou sans SOD et cofacteurs. L'activité enzymatique a été évaluée par dosage du nitrite produit, le nitrite étant considéré comme le produit terminal de l'oxydation du NO. Quelles que soient les conditions, les résultats de ce test ont été négatifs. Ainsi, aucune production de nitrite n'a pu être mise en évidence.

Ce résultat va dans le sens de l'absence d'une protéine NOS fonctionnelle ou d'une trop faible production de la protéine recombinante.

Discussion

Après expression hétérologue de la NOS de *S. xylosus*, nous n'avons pas pu mettre en évidence d'activité NOS. Les résultats que nous avons obtenus sont préliminaires et des expériences complémentaires devront être réalisées pour comprendre les raisons de cet échec et optimiser la production d'une NOS recombinante.

La première chose à vérifier est de déterminer si la surproduction de la NOS recombinante n'a pas entraîné la formation de corps d'inclusion formés par l'agrégation des protéines entre elles. Sous cette forme, la protéine NOS serait donc insoluble et seule une petite proportion de NOS aurait été identifiée dans la fraction cytoplasmique soluble. La formation de corps d'inclusion est multifactorielle et varie d'une protéine recombinante à une autre. Cependant, elle pourrait être due à la production trop rapide de la protéine recombinante chez *E. coli*, ce qui peut entraîner un mauvais repliement de la protéine permettant des interactions interprotéiques. De plus, plusieurs auteurs ont montré que les acides aminés en position N-terminal pouvaient avoir un effet drastique sur la solubilisation de la protéine NOS recombinante. Ainsi, les 22 premiers acides aminés de la NOS de *B. subtilis* ont dû être éliminés pour permettre à la protéine recombinante d'être soluble (Pant *et al.* 2002). De même, chez la NOS de *S. turgidiscabies*, les 40 premiers acides aminés ont dû être supprimés de la protéine recombinante (Kers *et al.* 2004). Par contre, il n'a pas été nécessaire de modifier la séquence de la NOS de *D. radiodurans* pour obtenir la protéine recombinante (Adak *et al.* 2002b).

Si la protéine recombinante est majoritairement sous forme soluble, il serait important de contrôler l'aptitude de la NOS à former un homodimère en caractérisant la protéine en conditions non dénaturantes. En effet, la NOS est uniquement active sous forme dimérique (Crane *et al.* 2010). De plus, des expériences supplémentaires doivent être menées afin de déterminer les conditions optimales de production de la protéine recombinante. Il pourrait être envisagé de modifier le temps et la température d'induction, et la concentration d'arabinose utilisée pour cette induction.

Après avoir optimisé la production de la protéine recombinante, les mesures de l'activité NOS pourraient également être modifiées. Seules deux températures d'incubation, 30 et 37°C, ont été testées. Nous avons montré que la NOS chez *S. xylosus* C2a était active à 30°C dans les conditions du test de conversion de la metmyoglobine (article 1). Chez *S. aureus*, l'activité de la NOS a été évaluée à 37°C après purification (Bird *et al.* 2002) alors qu'elle avait été montrée optimale à 47,5°C dans des extraits acellulaires (Choi *et al.* 1997). Chez *B. subtilis* et *D. radiodurans*, les activités NOS ont été évaluées à 25°C (Adak *et al.* 2002a, 2002b). Il pourrait donc être intéressant de tester l'activité de la NOS de *S. xylosus* à différentes températures. L'activité NOS a été évaluée en présence de NOHA, le substrat intermédiaire de l'enzyme, et d'H₂O₂ qui fournit l'oxygène et les électrons nécessaires à la réaction (Adak *et al.* 2002a, 2002b). C'est dans ces conditions que Kers *et al.* (2004) ont mesuré l'activité de la NOS recombinante de *S. turgidiscabies* dans des extraits protéiques de *E. coli*. D'autres auteurs ont évalué l'activité NOS de *S. aureus* en ajoutant en plus de l'enzyme SOD et un cofacteur ptéridine H₄B (ou H₄F) dans le milieu réactionnel (Bird *et al.* 2002). La SOD permet de limiter la production d'anion superoxyde qui entraîne une réaction d'auto-oxydation de la NOS (Stuehr *et al.* 2001) et le H₄B (ou H₄F) impliqué dans la stabilisation du dimère permet également un transfert d'électrons pour la catalyse enzymatique (Crane *et al.* 2010). De plus, des donneurs/accepteurs d'électrons NADPH, FAD et FMN peuvent être rajoutés pour favoriser l'activité du partenaire réductase de la NOS (Hong *et al.* 2003). Il a été montré que ce partenaire était non spécifique et que dans les extraits protéiques de *E. coli*, l'activité NOS de *B. subtilis* était fonctionnelle (Gusarov *et al.* 2008).

Enfin quand tous les paramètres seront optimisés, la protéine NOS recombinante pourra être purifiée sur colonne d'affinité grâce son étiquette poly-histidine. Si besoin, ce peptide pourra être éliminé après la purification par clivage avec l'entérokinase. L'activité NOS devra dans ce cas être évaluée en ajoutant une réductase de *E. coli* (Wang *et al.* 2007). Il pourrait être intéressant de tester la présence de calmoduline sur l'activité NOS de *S. xylosus*. En effet, Hong *et al.* (2003) et Adak *et al.* (2002b) ont montré que l'activité NOS de *S. aureus* et de *D. radiodurans*, respectivement, étaient stimulées en présence de calmoduline malgré l'absence de domaine d'accrochage.

DISCUSSION

Les staphylocoques à coagulase négative (SCN) sont fréquemment isolés d'aliments d'origine animale tels que le lait et la viande et leurs produits dérivés (Irlinger 2008, Coton *et al.* 2010). Diverses espèces de SCN sont présentes dans les produits carnés, particulièrement dans les saucissons et les viandes séchées (Leroy *et al.* 2010, Ratsimba *et al.* 2017). Certaines espèces comme *Staphylococcus equorum*, *Staphylococcus saprophyticus* et *Staphylococcus xylosus* sont dominantes, tandis que d'autres espèces telles que *Staphylococcus carnosus* et *Staphylococcus warneri* apparaissent plus minoritaires (Blaiotta *et al.* 2004, Corbière Morot-Bizot *et al.* 2006, Coton *et al.* 2010, Leroy *et al.* 2010, Iacumin *et al.* 2012, Marty *et al.* 2012). Les espèces *S. carnosus* et *S. xylosus* sont couramment utilisées comme ferments dans les produits carnés pour leur rôle dans le développement des propriétés sensorielles (Leroy *et al.* 2006, Talon and Leroy 2014, Leroy *et al.* 2016). Ces deux espèces contribuent notamment au développement de la couleur des produits carnés *via* leur activité nitrate réductase qui réduit le nitrate, ajouté dans ces produits, en nitrite.

Le nitrite est chimiquement réduit en monoxyde d'azote (NO) qui interagit avec le fer du groupement hème de la myoglobine pour former de la nitrosomyoglobine, le pigment stable de couleur rouge typique des produits de salaison (Honikel 2008, Skibsted 2011). Le NO peut aussi interagir avec les amines secondaires des protéines de la viande que ce soit au cours de sa transformation ou de sa digestion dans le tractus gastro-intestinal pour former des composés N-nitrosés tels que les nitrosamines, toxiques pour la santé (Honikel 2008). Plusieurs alternatives aux nitrates/nitrites ont été envisagées pour le développement de la couleur des produits carnés, notamment par l'utilisation d'extraits de plantes contenant naturellement du nitrate (jus de céleri) ou servant de colorants naturels (extraits de tomate ou paprika) (Deda *et al.* 2007, Sebranek and Bacus 2007, Krause *et al.* 2011, Bazan-Lugo *et al.* 2012). L'utilisation de bactéries capables de produire du NO pourrait constituer une alternative novatrice dans le développement de la couleur. Le potentiel de formation de nitrosomyoglobine, sans ajout de nitrate/nitrite, a été exploré chez quelques bactéries lactiques (Morita *et al.* 1997, Gündoğdu *et al.* 2006) et chez *S. xylosus* (Morita *et al.* 1998, Li *et al.* 2013, 2016). Cependant, le mécanisme de production de NO par ces bactéries restait méconnu. Il a été démontré que certaines bactéries pouvaient synthétiser du NO à partir de l'arginine *via* une oxyde nitrique synthase (NOS) (Crane *et al.* 2010). Aucun gène codant cette enzyme n'est présent dans le génome des bactéries lactiques alors qu'il est retrouvé dans le génome de tous les staphylocoques séquencés.

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à la diversité des séquences NOS parmi les espèces de SCN fréquemment isolées de viande ou de produits carnés (Coton *et al.* 2010,

Leroy *et al.* 2010). Nous avons ainsi choisi de cibler des souches appartenant aux espèces *S. carnosus*, *S. equorum*, *S. saprophyticus*, *S. warneri* et *S. xylosum*. Le gène *nos* a été identifié chez les 113 souches étudiées grâce au développement d'amorces spécifiques des séquences *nos* de chaque espèce et permettant d'amplifier la quasi-totalité du gène. Sanchez Mainar *et al.* (2014) avaient également mis en œuvre une approche par PCR pour identifier le gène *nos* chez 86 souches de SCN. Cependant, ces auteurs n'ont pu amplifier le gène *nos* que chez 73% des souches avec les 4 couples d'amorces qu'ils avaient déterminés. De ce fait, ce gène n'avait pas été identifié chez certaines souches appartenant aux espèces *S. equorum*, *S. warneri* et *S. xylosum* (Sánchez Mainar *et al.* 2014).

La séquence NOS est très conservée parmi les 5 espèces de SCN ciblées, présentant un pourcentage de similarité variant de 81 à 91 % entre les espèces. De plus, les sites actifs de l'enzyme, représentés par 62 acides aminés, sont très conservés entre les espèces et partagent de 87 à 98% de similarité tandis que le pourcentage de similarité de ces sites au sein d'une même espèce est supérieur à 99%. van Sorge *et al.* (2013) avaient montré que les séquences nucléotidiques du gène *nos* étaient quasi-identiques au sein des souches de *S. aureus* (MRSA) et étaient proches de celles de *S. warneri* et de *S. saprophyticus*.

Les staphylocoques appartiennent au phylum des Firmicutes et la NOS est très présente au sein de ce phylum (Sudhamsu and Crane 2009). Un arbre phylogénétique, établi à partir de toutes les séquences de NOS des staphylocoques et d'autres genres représentatifs des Firmicutes, disponibles dans la banque de données UniProtKB (version 2017_03), révèle que les NOS des staphylocoques sont sur une branche distincte de celles des autres genres (Figure 27). Elles ont cependant une proximité avec celle de *Macrococcus caseolyticus* qui appartient également à la famille des *Staphylococcaceae*. Les NOS des staphylocoques montrent 64 à 68 % de similarité avec les séquences NOS de *Bacillus subtilis*. Au sein des staphylocoques, et dans l'état actuel des connaissances, les séquences NOS des souches d'une même espèce sont regroupées, et les espèces se répartissent par groupe d'espèces identiques à ceux établis à partir des séquences d'ADN codant l'ARNr 16S (Figure 1). Parmi toutes les séquences NOS de procaryotes disponibles dans les alignements Pfam, 81% des séquences NOS appartiennent aux bactéries à Gram positif dont 90 % appartiennent au phylum des Firmicutes (Figure 13).

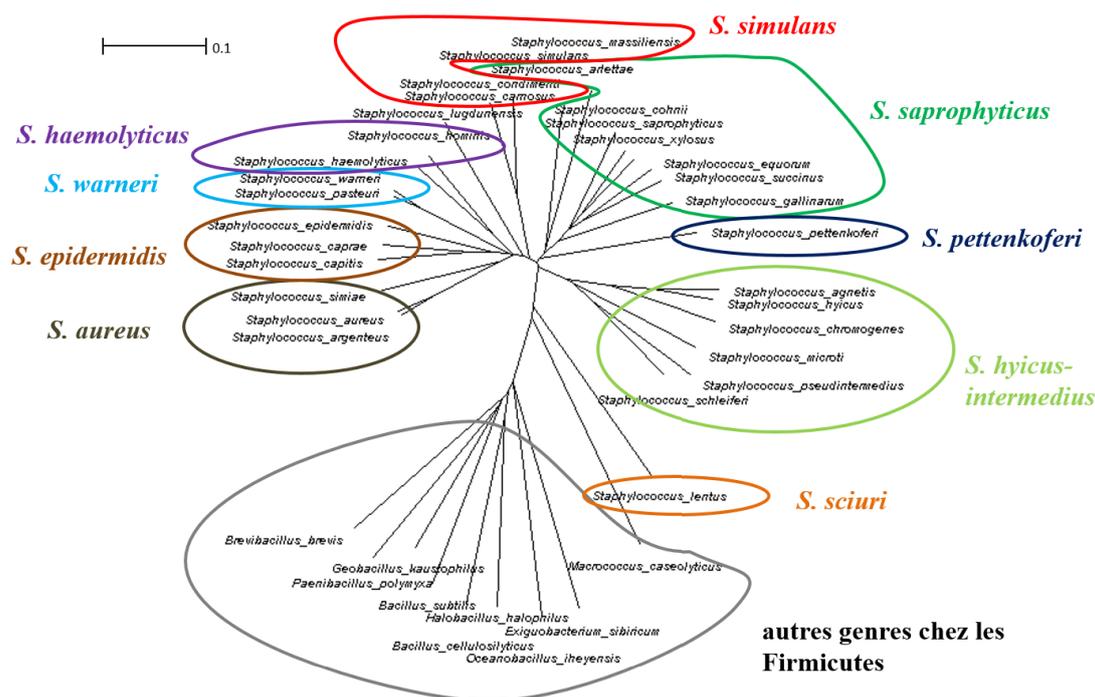


Figure 27. Arbre phylogénétique des NOS du genre *Staphylococcus*.

Les séquences NOS chez *Staphylococcus* et autres représentants de Firmicutes disponibles dans UniProtKB (2017_03) ont été alignées avec le logiciel Seaview (4.6). L'arbre phylogénétique a été construit sur un modèle de distance NJ avec le logiciel SplitsTree

Dans un deuxième temps, nous avons évalué la capacité d'une souche de *S. xylosus* à produire du NO par l'activité de sa NOS. En effet, si les NOS de *B. subtilis* et de *S. aureus* ont fait l'objet de plusieurs études, celles des SCN ne sont pas caractérisées. Seule une activité NOS a été révélée pour une souche de *S. haemolyticus* parmi une collection de souches de SCN appartenant à 17 espèces différentes dont les espèces utilisées comme ferment *S. carnosus* et *S. xylosus* (Sánchez Mainar *et al.* 2014). Pour déterminer l'activité NOS de *S. xylosus*, un mutant de délétion du gène *nos* (Δnos) a été construit chez la souche C2a dont le génome avait été entièrement séquencé (LN554884). Des souches complémentées ont également été construites.

Un test basé sur la conversion de la metmyoglobine en nitrosomyoglobine de couleur rouge a été mis en œuvre pour révéler la production de NO. Le spectre de la nitrosomyoglobine n'étant pas spécifique, le nitrosohème a été extrait. La formation de nitrosohème a été comparée entre la souche *S. xylosus* C2a, le mutant Δnos et le mutant complémenté par le gène *nos* après culture en condition limitée en oxygène ou en aérobiose. La formation de nitrosohème était totalement abolie en condition aérobie chez le mutant Δnos et restaurée chez

le mutant complétement. Ces résultats sont en accord avec la dépendance de l'activité NOS vis-à-vis de l'oxygène (Crane *et al.* 2010). En condition limitée en oxygène, la formation de nitrosohème par le mutant Δnos était réduite de 35 à 40% comparée à la souche C2a. De la même façon, chez *S. aureus*, la production de NO est dépendante des conditions d'oxygénation. Ainsi, un mutant Δnos de la souche UAMS1182 ne produisait plus de NO en condition aérobie (van Sorge *et al.* 2013). Tandis qu'après croissance sur milieu solide, un mutant Δnos de la souche UAMS-1 avait une capacité réduite de 35% à produire du NO (Sapp *et al.* 2014). Ces résultats montrent que les staphylocoques sont capables de produire du NO par une autre voie que celle de la NOS en condition limitée en oxygène. Les molybdoenzymes peuvent réduire le nitrite en NO (Maia and Moura 2015). Parmi elles, la nitrate réductase, dont l'activité majeure est la réduction du nitrate en nitrite, pourrait être à l'origine de production de NO par les bactéries (Maia and Moura 2015). *S. xylosus* a une activité nitrate réductase en condition limitée en oxygène (Talon *et al.* 1999). Cette activité pourrait expliquer la production résiduelle de NO chez le mutant Δnos dans cette condition.

Dans la littérature, la production de NO par les bactéries a été évaluée par différentes approches basées sur l'utilisation de sondes fluorescentes réagissant avec le NO, sur le dosage de nitrate/nitrite considérés comme les produits terminaux de l'oxydation du NO ou celui de la citrulline, un des métabolites.

L'utilisation de la sonde fluorescente CuFL avait permis de mettre en évidence une production de NO par les NOS de *S. aureus* UAMS1182 et de *Bacillus anthracis* (Shatalin *et al.* 2008, van Sorge *et al.* 2013). L'utilisation d'une autre sonde fluorescente, DAF-FM diacétate, avait permis de révéler la production de NO par la NOS de la souche *S. aureus* UAMS-1 (Sapp *et al.* 2014). Dans notre étude, nous avons testé ces deux sondes. Une forte fluorescence était observée chez la souche C2a mais également chez le mutant Δnos , quelle que soit la sonde utilisée. Nous avons observé un total manque de reproductibilité de cette approche dans le cadre de nos conditions expérimentales. De plus, la présence de NOHA, substrat intermédiaire de la réaction ou de cofacteurs entraînaient une forte autofluorescence de la sonde DAF-FM diacétate. L'ensemble de ces résultats nous laissent supposer que ces sondes fluorescentes ne sont pas spécifiques du NO.

Bird *et al.* (2002) ont dosé la production de NO via la formation de nitrite à partir du NOHA comme substrat en présence de la NOS purifiée de *S. aureus*. Kers *et al.* (2004) ont également mesuré une production de nitrite chez *E. coli* surexprimant la NOS de *Streptomyces turgidiscabies*. La production de nitrite a également été évaluée pour caractériser les mutants Δnos de *B. subtilis* et *B. anthracis* (Gusarov and Nudler 2005, Shatalin *et al.* 2008). Dans nos

conditions, nous n'avons pas pu mettre en évidence de production de nitrite chez la souche C2a et le mutant Δnos . De même, nous n'avons pas mis en évidence de production de nitrite chez la souche *S. aureus* ATCC 6538P dont l'activité NOS avait été mesurée à partir d'arginine tritiée (Choi *et al.* 1997). Nous avons pourtant respecté les conditions optimales décrites pour cette NOS (Hong *et al.* 2003).

Sanchez Mainar *et al.* (2014) ont choisi d'évaluer l'activité NOS de souches par le dosage de la citrulline produite à partir de l'arginine et seule une souche de *Staphylococcus haemolyticus* présentait une activité NOS. Dans nos conditions, nous n'avons pas pu mettre en évidence de production de citrulline chez la souche C2a et le mutant Δnos . Chez la souche C2a, l'arginine peut être catabolisée par l'arginase en urée et ornithine. Chez *Helicobacter pylori*, l'arginase inhibe la production de NO par des cellules eucaryotes par compétition vis-à-vis du substrat arginine (Gobert *et al.* 2001).

Comme nous l'avons vu chez *S. xyloso*, le mutant Δnos ne produit plus de NO en condition aérobie. La délétion du gène *nos* a également conduit à un léger déficit de croissance en condition aérobie tandis qu'aucune différence n'a été observée en condition microaérobie. De plus, cette délétion a augmenté la sensibilité de mutant face à un stress oxydant médié par l' H_2O_2 . Ce résultat est en accord avec les données de la littérature montrant le rôle protecteur du NO produit par la NOS contre le stress oxydant chez *B. subtilis*, *B. anthracis* ainsi que chez *S. aureus* (Gusarov and Nudler 2005, Shatalin *et al.* 2008, Vaish and Singh 2013, van Sorge *et al.* 2013, Sapp *et al.* 2014). Chez *B. subtilis*, le NO, produit par sa NOS ou exogène, protège la bactérie d'un stress oxydant en stimulant l'activité de KatA, sa catalase majeure (Gusarov and Nudler 2005). Trois catalases ont été identifiées chez la souche *S. xyloso* C2a, KatA, KatB et KatC (Barrière *et al.* 2002, Planchon *et al.* 2007, Planchon *et al.* 2009). Chez le mutant Δnos , la perte de l'activité NOS a conduit à une modulation de l'expression des gènes codant les catalases. Le gène *katA* était surexprimé chez ce mutant tandis que *katB* et *katC* étaient réprimés. Vermassen *et al.* (2014) ont montré que *S. xyloso* C2a surexprimait les gènes *katB* et *katC* en réponse à un stress nitrosant généré par du nitrite dans un modèle viande alors que *katA* était réprimé. PerR est un régulateur transcriptionnel de la famille du régulateur Fur (Horsburgh *et al.* 2001b). Il agit comme un répresseur de la transcription par fixation à des séquences régulatrices sur l'ADN appelées « Per box », situées en amont des gènes dont l'expression dépend de ce régulateur (Horsburgh *et al.* 2001a). Un mutant délété du gène codant PerR chez *S. aureus* présentait une surexpression du gène *katA* et sa résistance face à un stress oxydant à l' H_2O_2 était augmentée par rapport à la souche sauvage (Horsburgh

et al. 2001a). A noter que *S. aureus* ne possède qu'une seule catalase (KatA) (Gaupp *et al.* 2012). Chez *S. xylosus* C2a, des séquences « Per box » putatives ont été identifiées en amont des gènes *katB* et *katC*, ce qui suggère que l'expression de ces gènes est sous la dépendance de PerR, alors qu'il n'y a pas de séquence « Per box » en amont de *katA* (Vermassen *et al.* 2014). Il est donc probable que chez le mutant Δnos de la souche C2a ne produisant plus de NO, PerR ne soit pas dérèprimé et ainsi l'expression de *katB* et *katC* est réprimée. La surexpression de *katA* pourrait être due à un mécanisme de compensation pour palier la répression de *katB* et *katC*, mais ceci reste à démontrer. Chez *B. subtilis*, l'expression du gène *sodA* codant la superoxyde dismutase était fortement inhibée chez le mutant Δnos (Gusarov *et al.* 2009). Ce résultat contraste avec l'expression de *sod* du mutant Δnos de *S. xylosus* qui n'est pas modulée.

Le mutant Δnos présente une pigmentation accrue par rapport à la souche C2a après une culture de plusieurs jours sur milieu agar. Ce phénotype avait également été observé chez un mutant Δnos de *S. aureus* (Sapp *et al.* 2014). *S. aureus* produit du 4,4'-diaponeurosporene, un intermédiaire de la biosynthèse des caroténoïdes, qui est converti en staphyloxanthine, le produit final, de couleur jaune-orange (Wieland *et al.* 1994). Ce pigment chez *S. aureus* protégeait contre les espèces réactives de l'oxygène et un mutant non pigmenté était plus sensible au stress oxydant (Clauditz *et al.* 2006). Chez *S. xylosus* C2a, le pigment produit s'apparente à un caroténoïde. L'augmentation du niveau de pigmentation chez le mutant Δnos pourrait également constituer un mécanisme de résistance au stress oxydant. Les caroténoïdes sont riches en doubles liaisons leur permettant de détoxifier les espèces réactives de l'oxygène (El-Agamey *et al.* 2004, Gaupp *et al.* 2012).

Chez *S. aureus*, le gène *nos* est co-transcrit avec le gène *pdt*, qui code une préphénate déshydratase, une enzyme impliquée dans l'avant dernière étape de biosynthèse de la phénylalanine (Sapp *et al.* 2014). L'organisation génétique *nos-pdt* est présente dans tous les génomes de staphylocoques disponibles et apparaît comme spécifique aux staphylocoques (Sapp *et al.* 2014). Ainsi, chez *S. xylosus*, comme chez *S. aureus*, les gènes *nos* et *pdt* sont co-transcrits. Le mutant Δnos de la souche C2a n'est pas capable de croître en milieu minimum dépourvu d'acides aminés et ce phénotype n'est pas restauré par la complémentation avec le gène *nos*. Il est probable que la mutation du gène *nos* par délétion/insertion ait entraîné un effet polaire sur *pdt*. La complémentation du mutant Δnos avec le gène *pdt* a permis de restaurer sa croissance en milieu minimum. Une restauration de la croissance du mutant Δnos a également été obtenue après addition de phénylalanine dans le milieu. Il apparaît clairement que seul le gène *pdt* codant la préphénate déshydratase est impliqué dans la croissance en

absence de phénylalanine chez *S. xylosus*. Actuellement, le lien entre les enzymes NOS et PDT n'est pas connu alors que ces deux gènes sont organisés en opéron chez tous les staphylocoques. Chez *S. xylosus* C2a, ces deux gènes sont co-transcrits et leur expression ne varie pas quelles que soient les conditions de culture, milieu minimum ou complexe, le temps d'incubation et les conditions d'oxygénation. A noter que l'environnement génétique du gène *nos* chez les autres bactéries est très différent et variable d'une espèce à l'autre (Kunst *et al.* 1997, White *et al.* 1999, Sapp *et al.* 2014).

Comme nous avons pu le montrer le NO peut être mis en évidence du fait de son interaction avec le fer du groupement hème de la myoglobine conduisant à la formation de nitrosomyoglobine. Nous avons utilisé cette propriété pour évaluer la capacité d'autres souches de *S. xylosus* ainsi que des souches d'autres espèces de SCN à produire du NO. L'incubation des SCN avec la metmyoglobine a conduit à la formation de pigments rouges dont le spectre d'absorbance était caractéristique de l'oxymyoglobine et de la nitrosomyoglobine (Gøtterup *et al.* 2007, Li *et al.* 2013, 2016). En effet, ces pigments présentent des pics d'absorptions à des longueurs d'ondes proches, ce qui rend leur distinction difficile (Gøtterup *et al.* 2007). De ce fait, la formation de nitrosomyoglobine a été évaluée après extraction et mesure du nitrosohème. Nous avons montré que la formation de nitrosohème par *S. xylosus* C2a en condition aérobie est due à l'activité de sa NOS. Toutes les autres souches de *S. xylosus* testées ainsi que 80% des souches de *S. saprophyticus*, 67% des souches de *S. warneri*, 65% des souches de *S. equorum* et 55% des souches de *S. carnosus* sont capables de produire du NO en aérobiose. Dans tous les cas, la formation de nitrosomyoglobine était faible et représentait au maximum 16% des pigments rouges observés chez *S. xylosus*, 10% chez *S. saprophyticus* et 9% chez les trois autres espèces. Nos résultats ont révélé que l'oxymyoglobine était le pigment majoritairement formé à partir de la metmyoglobine, particulièrement en condition aérobie où une grande hétérogénéité de formation de ce pigment a été constatée au sein des souches des cinq espèces de SCN. En condition limitée en oxygène, seuls *S. xylosus* et *S. saprophyticus* sont capables de former les pigments rouges.

La première étape nécessaire à la formation d'oxymyoglobine ($\text{MbFe}^{\text{II}}\text{O}_2$) ou de nitrosomyoglobine ($\text{MbFe}^{\text{II}}\text{NO}$) consiste en une réduction du fer ferrique (Fe^{III}) de l'hème de la metmyoglobine ($\text{MbFe}^{\text{III}}\text{OH}$) en fer ferreux (Fe^{II}) qui a une forte affinité pour l'oxygène et le NO (Cooper 1999). Dans nos conditions, cette réduction dépend du métabolisme des bactéries étant donné que le témoin metmyoglobine non ensemencé n'évolue pas.

Gøtterup *et al.* (2007) ont montré, par résonance paramagnétique électronique, que *S. saprophyticus* en présence de metmyoglobine était capable de réduire le Fe^{III} en Fe^{II} . L'hypothèse émise était que la croissance de la bactérie générerait des conditions réductrices (Gøtterup *et al.* 2007). Nos conditions réactionnelles n'étaient pas réductrices puisque le potentiel d'oxydo-réduction des cultures de SCN n'a pas varié au cours des incubations. Les bactéries possèdent des réductases qui transfèrent les électrons du NADPH par l'intermédiaire des FAD et/ou FMN (Schröder *et al.* 2003, Ceccarelli *et al.* 2004). Dans nos conditions, l'activité réductase des SCN pourrait être à l'origine de la réduction du fer ferrique (Fe^{III}) de l'hème de la metmyoglobine en fer ferreux (Fe^{II}) (Figure 28).

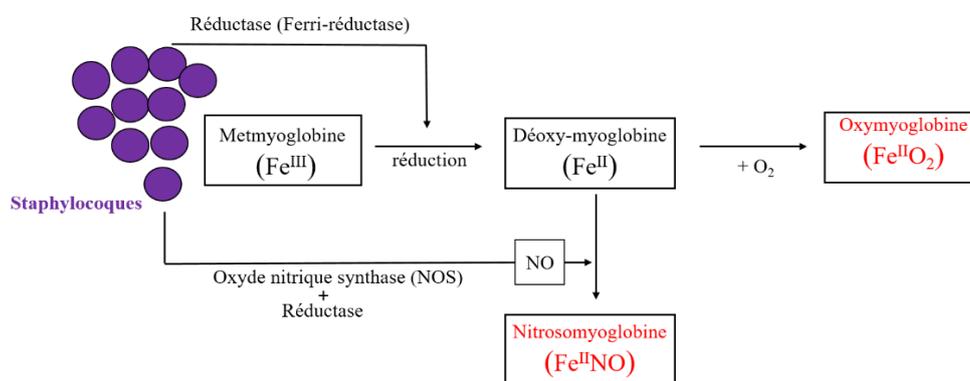


Figure 28. Modèle d'interaction des staphylocoques avec la metmyoglobine.

Une activité ferri-réductase membranaire a été identifiée chez *S. aureus* chez qui il a été suggéré que cette activité faisait partie d'une chaîne de transport d'électrons qui utilise soit du NADH, du succinate, du glycérol-3-phosphate ou du L-lactate comme donneur d'électron pour réduire le fer ferrique. Cette activité a été mise en évidence en condition aérobie et anaérobie (Lascelles and Burke 1978). Par ailleurs, l'activité de la NOS requiert un partenaire réductase non spécifique (Gusarov *et al.* 2008). L'ensemble de nos résultats suggère un rôle clé des réductases dans la formation de pigments rouges à partir de la metmyoglobine.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

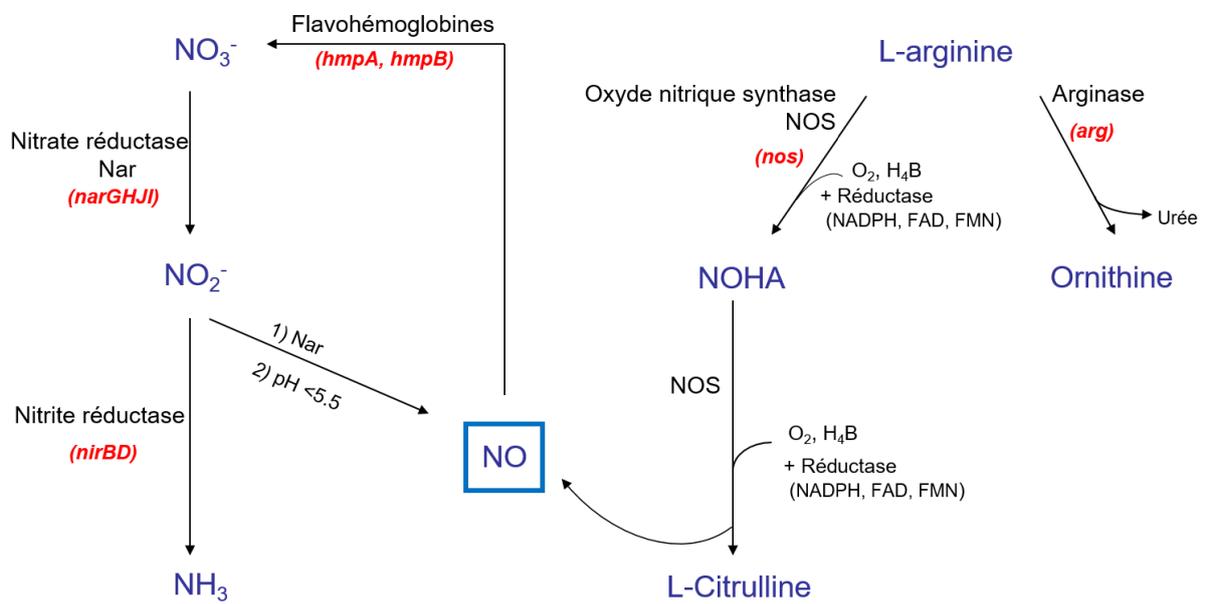


Figure 29 : Potentiel de la souche *S. xylosus* C2a dans le catabolisme du nitrate et de l'arginine en lien avec la synthèse de NO.

Au cours de ce travail, nous avons démontré l'implication de la NOS dans la production de NO chez la souche *S. xylosus* C2a. De plus, toutes les autres souches de *S. xylosus* que nous avons caractérisées sont capables de produire du NO, tandis que cette production est variable chez les quatre autres espèces de SCN. L'espèce *S. xylosus* est celle qui a le plus fort potentiel à produire du NO. Cependant, cette production est globalement faible. En effet, la formation de nitrosomyoglobine par *S. xylosus* ne représente que 16% des pigments rouges formés. Par conséquent, il serait intéressant de définir les conditions optimales de production et d'activité de la NOS de *S. xylosus*. En particulier, il sera nécessaire pour atteindre cet objectif de purifier l'enzyme à partir de son expression hétérologue chez *E. coli*. De plus, l'identification du partenaire réductase de la NOS de *S. xylosus* pourrait permettre d'optimiser l'activité de l'enzyme.

L'arginine, substrat de la NOS peut être catabolisé par d'autres voies. Chez la souche *S. xylosus* C2a, ce substrat peut être dégradé par l'arginase (Figure 29). Il est donc possible que la NOS et l'arginase entre en compétition pour l'arginine. La construction d'un mutant délété du gène codant l'arginase permettrait de tester cette hypothèse.

En outre, le NO est une molécule toxique à forte dose. *S. xylosus* C2a possède deux gènes, *hmpA* et *hmpB*, codant deux enzymes capables potentiellement de détoxifier le NO. Ces enzymes sont des flavohémoglobines qui catalysent la transformation du NO en nitrate (Figure 29). Des mutants délétés de ces gènes permettraient de déterminer l'implication de ces Hmp dans le catabolisme du NO.

La production de NO en condition aérobie dépend uniquement de l'activité NOS chez *S. xylosus* C2a. En condition de faible oxygénation, la production de NO ne dépend pas seulement de la NOS, et pourrait résulter d'une autre activité enzymatique telle qu'une molybdoenzyme. La nitrate réductase est une molybdoenzyme qui pourrait synthétiser du NO par réduction du nitrite en condition de faible concentration de nitrate (Figure 29). Cependant, le rôle premier de la nitrate réductase est de réduire le nitrate en nitrite. Lorsque la quantité de nitrate devient limitante, le nitrite est réduit en ammoniacque par une nitrite réductase (Figure 29). La construction d'un mutant délété de l'opéron *nar* permettrait d'évaluer la contribution de la nitrate réductase dans la synthèse de NO. De plus un mutant délété de l'opéron *nir* permettrait d'établir s'il existe une compétition entre les enzymes nitrate et nitrite réductases pour le catabolisme du nitrite.

Nous avons également montré chez cinq espèces de SCN que l'oxymyoglobine est le pigment majoritairement formé, particulièrement en condition aérobie. La réduction du fer ferrique de

l'hème de la metmyoglobine en fer ferreux est une étape cruciale pour la formation de pigments rouges. Elle implique l'action de réductases. Les bactéries possèdent des réductases dépendantes du NAD(P)H de type flavine-réductases ou ferri-réductases. Afin d'identifier la (les) réductase(s) impliquée(s) chez *S. xylosus*, une première approche par RT-qPCR pourrait être envisagée sur quelques gènes cibles après culture en condition aérobie en présence de metmyoglobine. Si une réductase d'intérêt est identifiée, la purification de cette enzyme à partir de son expression hétérologue chez *E. coli* pourrait être envisagée.

La mise en évidence de la production de NO par une bactérie est comme nous l'avons vu un vrai défi en raison de la grande réactivité de ce radical. Si nous avons réussi à mettre en évidence une production de NO par les staphylocoques, de nombreuses interrogations restent en suspens et ouvrent la voie à de nombreuses perspectives de recherche.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Adak, S., K. S. Aulak and D. J. Stuehr (2002a). "Direct evidence for nitric oxide production by a nitric-oxide synthase-like protein from *Bacillus subtilis*." *J. Biol. Chem.* 277(18): 16167-16171.
- Adak, S., A. M. Bilwes, K. Panda, D. Hosfield, K. S. Aulak, J. F. McDonald, J. A. Tainer, E. D. Getzoff, B. R. Crane and D. J. Stuehr (2002b). "Cloning, expression, and characterization of a nitric oxide synthase protein from *Deinococcus radiodurans*." *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 99(1): 107-112.
- Agapie, T., S. Suseno, J. J. Woodward, S. Stoll, R. D. Britt and M. A. Marletta (2009). "NO formation by a catalytically self-sufficient bacterial nitric oxide synthase from *Sorangium cellulosum*." *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 106(38): 16221-16226.
- Ahmo Almand, E. (2010). "Characterization of the *Staphylococcus aureus* nitric oxide synthase gene and its role in biofilm development " Unpublished.
- Alderton, W. K., C. E. Cooper and R. G. Knowles (2001). "Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition." *Biochem. J.* 357: 593-615.
- Anihouvi, V. B., E. Sakyi-Dawson, G. S. Ayernor and J. D. Hounhouigan (2007). "Microbiological changes in naturally fermented cassava fish (*Pseudolithus sp.*) for lanhouin production." *Int. J. Food Microbiol.* 116(2): 287-291.
- Aristoy, M. C. and F. Toldrá (1998). "Concentration of free amino acids and dipeptides in porcine skeletal muscles with different oxidative patterns." *Meat Sci.* 50(3): 327-332.
- Arkoudelos, J. S. and G. J. Nychas (1995). "Comparative studies of the growth of *Staphylococcus carnosus* with or without glucose." *Lett. Appl. Microbiol.* 20(1): 19-24.
- Aro, J. M. A., P. Nyam-Osor, K. Tsuji, K. Shimada, M. Fukushima and M. Sekikawa (2010). "The effect of starter cultures on proteolytic changes and amino acid content in fermented sausages." *Food Chemistry* 119(1): 279-285.
- Aymerich, T., B. Martín, M. Garriga and M. Hugas (2003). "Microbial quality and direct PCR identification of lactic acid bacteria and nonpathogenic Staphylococci from artisanal low-acid sausages." *Appl. Environ. Microbiol.* 69(8): 4583-4594.
- Baba, T., K. Kuwahara-Arai, I. Uchiyama, F. Takeuchi, T. Ito and K. Hiramatsu (2009). "Complete genome sequence of *Macroccoccus caseolyticus* strain JCSCS5402, [corrected] reflecting the ancestral genome of the human-pathogenic staphylococci." *J. Bacteriol.* 191(4): 1180-1190.
- Barraud, N., D. J. Hassett, S. H. Hwang, S. A. Rice, S. Kjelleberg and J. S. Webb (2006). "Involvement of nitric oxide in biofilm dispersal of *Pseudomonas aeruginosa*." *J. Bacteriol.* 188(21): 7344-7353.
- Barraud, N., M. J. Kelso, S. A. Rice and S. Kjelleberg (2015). "Nitric oxide: a key mediator of biofilm dispersal with applications in infectious diseases." *Curr. Pharm. Des.* 21(1): 31-42.
- Barraud, N., D. Schleheck, J. Klebensberger, J. S. Webb, D. J. Hassett, S. A. Rice and S. Kjelleberg (2009). "Nitric oxide signaling in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms mediates phosphodiesterase activity, decreased cyclic di-GMP levels, and enhanced dispersal." *J. Bacteriol.* 191(23): 7333-7342.
- Barrière, C., R. Brückner, D. Centeno and R. Talon (2002). "Characterisation of the *kata* gene encoding a catalase and evidence for at least a second catalase activity in *Staphylococcus xylosus*, bacteria used in food fermentation." *FEMS Microbiol. Lett.* 216(2): 277-283.
- Barrière, C., R. Brückner and R. Talon (2001a). "Characterization of the single superoxide dismutase of *Staphylococcus xylosus*." *Appl. Environ. Microbiol.* 67(9): 4096-4104.
- Barrière, C., D. Centeno, A. Lebert, S. Leroy-Sétrin, J. L. Berdague and R. Talon (2001b). "Roles of superoxide dismutase and catalase of *Staphylococcus xylosus* in the inhibition of linoleic acid oxidation." *FEMS Microbiol. Lett.* 201(2): 181-185.
- Barrière, C., S. Leroy-Sétrin and R. Talon (2001c). "Characterization of catalase and superoxide dismutase in *Staphylococcus carnosus* 833 strain." *J. Appl. Microbiol.* 91(3): 514-519.

- Bassias, J. and R. Brückner (1998). "Regulation of Lactose Utilization Genes in *Staphylococcus xylosum*." J. Bacteriol. 180(9): 2273-2279.
- Batlle, N., M.-C. Aristoy and F. Toldrá (2000). "Early Postmortem Detection of Exudative Pork Meat Based on Nucleotide Content." J. Food Sci. 65: 413-416.
- Batlle, N., M.-C. Aristoy and F. Toldrá (2001). "ATP Metabolites During Aging of Exudative and Nonexudative Pork Meats." J. Food Sci. 66: 68-71
- Bazan-Lugo, E., I. Garcia-Martinez, R. H. Alfaro-Rodriguez and A. Totosaus (2012). "Color compensation in nitrite-reduced meat batters incorporating paprika or tomato paste." J. Sci. Food Agric. 92(8): 1627-1632.
- Beaumont, H. J., N. G. Hommes, L. A. Sayavedra-Soto, D. J. Arp, D. M. Arciero, A. B. Hooper, H. V. Westerhoff and R. J. van Spanning (2002). "Nitrite reductase of *Nitrosomonas europaea* is not essential for production of gaseous nitrogen oxides and confers tolerance to nitrite." J. Bacteriol. 184(9): 2557-2560.
- Beaumont, H. J., S. I. Lens, W. N. Reijnders, H. V. Westerhoff and R. J. van Spanning (2004). "Expression of nitrite reductase in *Nitrosomonas europaea* involves NsrR, a novel nitrite-sensitive transcription repressor." Mol. Microbiol. 54(1): 148-158.
- Becker, K., C. Heilmann and G. Peters (2014). "Coagulase-negative staphylococci." Clin. Microbiol. Rev. 27(4): 870-926.
- Berka, V., H. C. Yeh, D. Gao, F. Kiran and A. L. Tsai (2004). "Redox function of tetrahydrobiopterin and effect of L-arginine on oxygen binding in endothelial nitric oxide synthase." Biochemistry 43(41): 13137-13148.
- Bird, L. E., J. Ren, J. Zhang, N. Foxwell, A. R. Hawkins, I. G. Charles and D. K. Stammers (2002). "Crystal structure of SANOS, a bacterial nitric oxide synthase oxygenase protein from *Staphylococcus aureus*." Structure 10(12): 1687-1696.
- Blaiotta, G., V. Fusco, D. Ercolini, O. Pepe and S. Coppola (2010). "Diversity of *Staphylococcus* species strains based on partial kat (catalase) gene sequences and design of a PCR-restriction fragment length polymorphism assay for identification and differentiation of coagulase-positive species (*S. aureus*, *S. delphini*, *S. hyicus*, *S. intermedius*, *S. pseudintermedius*, and *S. schleiferi* subsp. *coagulans*)." J. Clin. Microbiol. 48(1): 192-201.
- Blaiotta, G., C. Pennacchia, F. Villani, A. Ricciardi, R. Tofalo and E. Parente (2004). "Diversity and dynamics of communities of coagulase-negative staphylococci in traditional fermented sausages." J. Appl. Microbiol. 97(2): 271-284.
- Blasco, F., J. Pommier, V. Augier, M. Chippaux and G. Giordano (1992). "Involvement of the *narJ* or *narW* gene product in the formation of active nitrate reductase in *Escherichia coli*." Mol. Microbiol. 6(2): 221-230.
- Brennan, N. M., A. C. Ward, T. P. Beresford, P. F. Fox, M. Goodfellow and T. M. Cogan (2002). "Biodiversity of the bacterial flora on the surface of a smear cheese." Appl. Environ. Microbiol. 68(2): 820-830.
- Brod, F. C., M. R. Pelisser, J. B. Bertoldo, J. Vernal, C. Bloch, Jr., H. Terenzi and A. C. Arisi (2010). "Heterologous Expression and Purification of a Heat-Tolerant *Staphylococcus xylosum* Lipase." Mol. Biotechnol. 44(2): 110-119.
- Brückner, R. and R. Rosenstein (2006). "Carbohydrate catabolism: pathways and regulation - Chapter 34." In: Gram-Positive Pathogens, 2nd Edition Eds Vincent A. Fischetti *et al.*; 427-433.
- Brückner, R., E. Wagner and F. Götz (1993). "Characterization of a sucrase gene from *Staphylococcus xylosum*." J. Bacteriol. 175(3): 851-857.
- Bryan, N. S. and M. B. Grisham (2007). "Methods to detect nitric oxide and its metabolites in biological samples." Free Radic. Biol. Med. 43(5): 645-657.

- Buddha, M. R., K. M. Keery and B. R. Crane (2004a). "An unusual tryptophanyl tRNA synthetase interacts with nitric oxide synthase in *Deinococcus radiodurans*." Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 101(45): 15881-15886.
- Buddha, M. R., T. Tao, R. J. Parry and B. R. Crane (2004b). "Regioselective nitration of tryptophan by a complex between bacterial nitric-oxide synthase and tryptophanyl-tRNA synthetase." J. Biol. Chem. 279(48): 49567-49570.
- Cantera, J. J. and L. Y. Stein (2007). "Role of nitrite reductase in the ammonia-oxidizing pathway of *Nitrosomonas europaea*." Arch. Microbiol. 188(4): 349-354.
- Casaburi, A., G. Blaiotta, G. Mauriello, O. Pepe and F. Villani (2005). "Technological activities of *Staphylococcus carnosus* and *Staphylococcus simulans* strains isolated from fermented sausages." Meat Sci. 71(4): 643-650.
- Casaes Nunes, R. S., C. Pires de Souza, K. S. Pereira, E. M. Del Aguila and V. M. Flosi Paschoalin (2016). "Identification and molecular phylogeny of coagulase-negative staphylococci isolates from Minas Frescal cheese in southeastern Brazil: Superantigenic toxin production and antibiotic resistance." J. Dairy Sci. 99(4): 2641-2653.
- Ceccarelli, E. A., A. K. Arakaki, N. Cortez and N. Carrillo (2004). "Functional plasticity and catalytic efficiency in plant and bacterial ferredoxin-NADP(H) reductases." Biochim. Biophys. Acta 1698(2): 155-165.
- Chaillou, S., M. C. Champomier-Vergès, M. Cornet, A. M. Crutz-Le Coq, A. M. Dudez, V. Martin, S. Beaufils, E. Darbon-Rongère, R. Bossy, V. Loux and M. Zagorec (2005). "The complete genome sequence of the meat-borne lactic acid bacterium *Lactobacillus sakei* 23K." Nat. Biotechnol. 23(12): 1527-1533.
- Chaillou, S., A. Chaulot-Talmon, H. Caekebeke, M. Cardinal, S. Christieans, C. Denis, M. H. Desmonts, X. Dousset, C. Feurer, E. Hamon, J. J. Joffraud, S. La Carbona, F. Leroi, S. Leroy, S. Lorre, S. Macé, M. F. Pilet, H. Prévost, M. Rivollier, D. Roux, R. Talon, M. Zagorec and M. C. Champomier-Verges (2015). "Origin and ecological selection of core and food-specific bacterial communities associated with meat and seafood spoilage." ISME J 9(5): 1105-1118.
- Chartier, F. J. and M. Couture (2004). "Stability of the heme environment of the nitric oxide synthase from *Staphylococcus aureus* in the absence of pterin cofactor." Biophys. J. 87(3): 1939-1950.
- Chasco, J., G. Lizaso and M. J. Beriain (1996). "Cured colour development during sausage processing." Meat Sci. 44(3): 203-211.
- Chen, Y., Y. Chai, J. H. Guo and R. Losick (2012). "Evidence for cyclic Di-GMP-mediated signaling in *Bacillus subtilis*." J. Bacteriol. 194(18): 5080-5090.
- Choi, W. S., M. S. Chang, J. W. Han, S. Y. Hong and H. W. Lee (1997). "Identification of nitric oxide synthase in *Staphylococcus aureus*." Biochem. Biophys. Res. Commun. 237(3): 554-558.
- Choi, W. S., D. W. Seo, M. S. Chang, J. W. Han, S. Y. Hong, W. K. Paik and H. W. Lee (1998). "Methylesters of L-arginine and N-nitro-L-arginine induce nitric oxide synthase in *Staphylococcus aureus*." Biochem. Biophys. Res. Commun. 246(2): 431-435.
- Christiansen, I. and W. Hengstenberg (1999). "Staphylococcal phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system--two highly similar glucose permeases in *Staphylococcus carnosus* with different glucoside specificity: protein engineering *in vivo*?" Microbiology 145 : 2881-2889.
- Clauditz, A., A. Resch, K. P. Wieland, A. Peschel and F. Götz (2006). "Staphyloxanthin plays a role in the fitness of *Staphylococcus aureus* and its ability to cope with oxidative stress." Infect. Immun. 74(8): 4950-4953.
- Cocconcelli, P. S. (2007). "Starter Cultures: Bacteria." In: Toldrá, F. (Ed.), Handbook of Fermented Meat and Poultry. Blackwell Publishing, Ltd., Iowa, United States, : 137-145.

- Cocolin, L., K. Rantsiou, L. Iacumin, R. Urso, C. Cantoni and G. Comi (2004). "Study of the ecology of fresh sausages and characterization of populations of lactic acid bacteria by molecular methods." *Appl. Environ. Microbiol.* 70(4): 1883-1894.
- Commission Regulation [EU] (2011). N° 1129/2011 of November 2011 amending Annex II to Regulation (EC) N° 1333/2008 of the European Parliament and of the Council by establishing a Union list of food additives. *Official Journal of the European Union.* L295:1-177.
- Cooper, C. E. (1999). "Nitric oxide and iron proteins." *Biochim. Biophys. Acta* 1411(2-3): 290-309.
- Corbière Morot-Bizot, S., S. Leroy and R. Talon (2006). "Staphylococcal community of a small unit manufacturing traditional dry fermented sausages." *Int. J. Food Microbiol.* 108(2): 210-217.
- Cordero, M. R. and J. M. Zumalacárregui (2000). "Characterization of micrococcaceae isolated from salt used for Spanish dry-cured ham." *Lett. Appl. Microbiol.* 31(4): 303-306.
- Cosgrove, K., G. Coutts, I. M. Jonsson, A. Tarkowski, J. F. Kokai-Kun, J. J. Mond and S. J. Foster (2007). "Catalase (KatA) and alkyl hydroperoxide reductase (AhpC) have compensatory roles in peroxide stress resistance and are required for survival, persistence, and nasal colonization in *Staphylococcus aureus*." *J. Bacteriol.* 189(3): 1025-1035.
- Coton, E., M. H. Desmonts, S. Leroy, M. Coton, E. Jamet, S. Christieans, P. Y. Donnio, I. Lebert and R. Talon (2010). "Biodiversity of coagulase-negative Staphylococci in French cheeses, dry fermented sausages, processing environments and clinical samples." *Int. J. Food. Microbiol.* 137(2-3): 221-229.
- Coyne, M. S., A. Arunakumari, H. S. Pankratz and J. M. Tiedje (1990). "Localization of the cytochrome cd1 and copper nitrite reductases in denitrifying bacteria." *J. Bacteriol.* 172(5): 2558-2562.
- Crack, J. C., M. R. Stapleton, J. Green, A. J. Thomson and N. E. Le Brun (2013). "Mechanism of [4Fe-4S](Cys)₄ cluster nitrosylation is conserved among NO-responsive regulators." *J. Biol. Chem.* 288(16): 11492-11502.
- Cramm, R., A. Büsch and K. Strube (2006). "NO-dependent transcriptional activation of gene expression in *Ralstonia eutropha* H16." *Biochem. Soc. Trans.* 34: 182-184.
- Crane, B. R., J. Sudhamsu and B. A. Patel (2010). "Bacterial nitric oxide synthases." *Annu. Rev. Biochem.* 79: 445-470.
- Cruz-Ramos, H., J. Crack, G. Wu, M. N. Hughes, C. Scott, A. J. Thomson, J. Green and R. K. Poole (2002). "NO sensing by FNR: regulation of the *Escherichia coli* NO-detoxifying flavohaemoglobin, Hmp." *EMBO J.* 21(13): 3235-3244.
- Deda, M. S., J. G. Bloukas and G. A. Fista (2007). "Effect of tomato paste and nitrite level on processing and quality characteristics of frankfurters." *Meat Sci.* 76(3): 501-508.
- del Giudice, J., Y. Cam, I. Damiani, F. Fung-Chat, E. Meilhoc, C. Bruand, R. Brouquisse, A. Puppo and A. Boscari (2011). "Nitric oxide is required for an optimal establishment of the *Medicago truncatula*-*Sinorhizobium meliloti* symbiosis." *New Phytol.* 191(2): 405-417.
- Directive 2006/52/EC of the European Parliament and of the Council of 5 July 2006 amending Directive 95/2/EC on food additives other than colours and sweeteners and Directive 94/35/EC on sweeteners for use in foodstuffs. *Official Journal of the European Union.* L 204/10
- Drosinos, E. H., M. Mataragas, N. Xiraphi, G. Moschonas, F. Gaitis and J. Metaxopoulos (2005). "Characterization of the microbial flora from a traditional Greek fermented sausage." *Meat Sci.* 69(2): 307-317.
- Dugat-Bony, E., L. Garnier, J. Denonfoux, S. Ferreira, A. S. Sarthou, P. Bonnarme and F. Irlinger (2016). "Highlighting the microbial diversity of 12 French cheese varieties." *Int. J. Food Microbiol.* 238: 265-273.
- Eisermann, R., R. Fischer, U. Kessler, A. Neubauer and W. Hengstenberg (1991). "Staphylococcal phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system. Purification and protein sequencing of

- the *Staphylococcus carnosus* histidine-containing protein, and cloning and DNA sequencing of the ptsH gene." Eur. J. Biochem. 197(1): 9-14.
- El-Agamey, A., G. M. Lowe, D. J. McGarvey, A. Mortensen, D. M. Phillip, T. G. Truscott and A. J. Young (2004). "Carotenoid radical chemistry and antioxidant/pro-oxidant properties." Arch. Biochem. Biophys. 430(1): 37-48.
- Engelvin, G., G. Feron, C. Perrin, D. Mollé and R. Talon (2000). "Identification of beta-oxidation and thioesterase activities in *Staphylococcus carnosus* 833 strain." FEMS Microbiol. Lett. 190(1): 115-120.
- Fadda, S., A. Lebert, S. Leroy-Sétrin and R. Talon (2002). "Decarboxylase activity involved in methyl ketone production by *Staphylococcus carnosus* 833, a strain used in sausage fermentation." FEMS Microbiol. Lett. 210(2): 209-214.
- Fast, B., P. Lindgren and F. Götz (1996). "Cloning, sequencing, and characterization of a gene (*narT*) encoding a transport protein involved in dissimilatory nitrate reduction in *Staphylococcus carnosus*." Arch. Microbiol. 166(6): 361-367.
- Fedtke, I., A. Kamps, B. Krismer and F. Götz (2002). "The nitrate reductase and nitrite reductase operons and the *narT* gene of *Staphylococcus carnosus* are positively controlled by the novel two-component system NreBC." J. Bacteriol. 184(23): 6624-6634.
- Fiegler, H., J. Bassias, I. Jankovic and R. Brückner (1999). "Identification of a gene in *Staphylococcus xylosus* encoding a novel glucose uptake protein." J. Bacteriol. 181(16): 4929-4936.
- Figuerola, XF., M.A. Lillo, P.S. Gaete, M.A. Riquelme, J.C. Sáez (2013). "Diffusion of nitric oxide across cell membranes of the vascular wall requires specific connexin-based channels." Neuropharmacology. 75: 471-478.
- Flores, M. and A. Olivares (2015). "Flavor." In: Toldrá, F. (Ed.), Handbook of Fermented Meat and Poultry, 2nd ed. John Wiley & Sons, Ltd., Chichester, UK, :217-226.
- Fonseca, S., A. Cachaldora, M. Gómez, I. Franco and J. Carballo (2013). "Monitoring the bacterial population dynamics during the ripening of Galician chorizo, a traditional dry fermented Spanish sausage." Food. Microbiol. 33(1): 77-84.
- Gaupp, R., N. Ledala and G. A. Somerville (2012). "Staphylococcal response to oxidative stress." Front. Cell. Infect. Microbiol. 2: 33.
- Gering, M. and R. Brückner (1996). "Transcriptional regulation of the sucrase gene of *Staphylococcus xylosus* by the repressor ScrR." J. Bacteriol. 178(2): 462-469.
- Ghosh, S., D. Wolan, S. Adak, B. R. Crane, N. S. Kwon, J. A. Tainer, E. D. Getzoff and D. J. Stuehr (1999). "Mutational analysis of the tetrahydrobiopterin-binding site in inducible nitric-oxide synthase." J. Biol. Chem. 274(34): 24100-24112.
- Gilberthorpe, N. J. and R. K. Poole (2008). "Nitric oxide homeostasis in *Salmonella typhimurium*: roles of respiratory nitrate reductase and flavohemoglobin." J. Biol. Chem. 283(17): 11146-11154.
- Giuffrè, A., V. B. Borisov, D. Mastronicola, P. Sarti and E. Forte (2012). "Cytochrome bd oxidase and nitric oxide: from reaction mechanisms to bacterial physiology." FEBS Lett. 586(5): 622-629.
- Gobert, A. P., D. J. McGee, M. Akhtar, G. L. Mendz, J. C. Newton, Y. Cheng, H. L. Mobley and K. T. Wilson (2001). "*Helicobacter pylori* arginase inhibits nitric oxide production by eukaryotic cells: a strategy for bacterial survival." Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 98(24): 13844-13849.
- Gorren, A. C. and B. Mayer (2007). "Nitric-oxide synthase: a cytochrome P450 family foster child." Biochim. Biophys. Acta. 1770(3): 432-445.
- Gøtterup, J., K. Olsen, S. Knöchel, K. Tjener, L. H. Stahnke and J. K. Møller (2007). "Relationship between nitrate/nitrite reductase activities in meat associated staphylococci and nitrosylmyoglobin formation in a cured meat model system." Int. J. Food Microbiol. 120(3): 303-310.

- Gøtterup, J., K. Olsen, S. Knöchel, K. Tjener, L. H. Stahnke and J. K. Møller (2008). "Colour formation in fermented sausages by meat-associated staphylococci with different nitrite- and nitrate-reductase activities." *Meat Sci.* 78(4): 492-501.
- Götz, F., T. Bannerman and K.-H. Schleifer (2006). "The Genera *Staphylococcus* and *Macrococcus*." *Prokaryotes* 4: 5-75.
- Green, J., M. D. Rolfe and L. J. Smith (2014). "Transcriptional regulation of bacterial virulence gene expression by molecular oxygen and nitric oxide." *Virulence* 5(8): 794-809.
- Gündoğdu, A. K., A. G. Karahan and M. L. Çakmakçı (2006). "Production of nitric oxide (NO) by lactic acid bacteria isolated from fermented products." *Eur. Food Res. Technol.* 223(1): 35-38.
- Gusarov, I. and E. Nudler (2005). "NO-mediated cytoprotection: instant adaptation to oxidative stress in bacteria." *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 102(39): 13855-13860.
- Gusarov, I., K. Shatalin, M. Starodubtseva and E. Nudler (2009). "Endogenous nitric oxide protects bacteria against a wide spectrum of antibiotics." *Science* 325(5946): 1380-1384.
- Gusarov, I., M. Starodubtseva, Z. Q. Wang, L. McQuade, S. J. Lippard, D. J. Stuehr and E. Nudler (2008). "Bacterial nitric-oxide synthases operate without a dedicated redox partner." *J. Biol. Chem.* 283(19): 13140-13147.
- Ha, D. G. and G. A. O'Toole (2015). "c-di-GMP and its Effects on Biofilm Formation and Dispersion: a *Pseudomonas Aeruginosa* Review." *Microbiol. Spectr.* 3(2): MB-0003-2014.
- Hall, J. W. and Y. Ji (2013). "Sensing and Adapting to Anaerobic Conditions by *Staphylococcus aureus*." *Adv. Appl. Microbiol.* 84: 1-25.
- Hammes, W. P. (2012). "Metabolism of nitrate in fermented meats: the characteristic feature of a specific group of fermented foods." *Food. Microbiol.* 29(2): 151-156.
- Hartmann, S., G. Wolf and W. P. Hammes (1995). "Reduction of nitrite by *Staphylococcus carnosus* and *Staphylococcus piscifermentans*." *Systematic and Applied Microbiology* 18(3): 323-328.
- Healy, F. G., M. Wach, S. B. Krasnoff, D. M. Gibson and R. Loria (2000). "The *txtAB* genes of the plant pathogen *Streptomyces acidiscabies* encode a peptide synthetase required for phytotoxin thaxtomin A production and pathogenicity." *Mol. Microbiol.* 38(4): 794-804.
- Hengge, R. (2009). "Principles of c-di-GMP signalling in bacteria." *Nat. Rev. Microbiol.* 7(4): 263-273.
- Hogenhout, S. A. and R. Loria (2008). "Virulence mechanisms of Gram-positive plant pathogenic bacteria." *Curr. Opin. Plant Biol.* 11(4): 449-456.
- Holden, J. K., D. Dejam, M. C. Lewis, H. Huang, S. Kang, Q. Jing, F. Xue, R. B. Silverman and T. L. Poulos (2015). "Inhibitor Bound Crystal Structures of Bacterial Nitric Oxide Synthase." *Biochemistry* 54(26): 4075-4082.
- Holden, J. K., S. Kang, F. C. Beasley, M. A. Cinelli, H. Li, S. G. Roy, D. Dejam, A. L. Edinger, V. Nizet, R. B. Silverman and T. L. Poulos (2015b). "Nitric Oxide Synthase as a Target for Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*." *Chem. Biol.* 22(6): 785-792.
- Holden, J. K., S. Kang, S. A. Hollingsworth, H. Li, N. Lim, S. Chen, H. Huang, F. Xue, W. Tang, R. B. Silverman and T. L. Poulos (2015a). "Structure-based design of bacterial nitric oxide synthase inhibitors." *J. Med. Chem.* 58(2): 994-1004.
- Holden, J. K., M. C. Lewis, M. A. Cinelli, Z. Abdullatif, A. V. Pensa, R. B. Silverman and T. L. Poulos (2016). "Targeting Bacterial Nitric Oxide Synthase with Aminoquinoline-Based Inhibitors." *Biochemistry* 55(39): 5587-5594.
- Holden, J. K., H. Li, Q. Jing, S. Kang, J. Richo, R. B. Silverman and T. L. Poulos (2013). "Structural and biological studies on bacterial nitric oxide synthase inhibitors." *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 110(45): 18127-18131.

- Holden, J. K., N. Lim and T. L. Poulos (2014). "Identification of redox partners and development of a novel chimeric bacterial nitric oxide synthase for structure activity analyses." *J. Biol. Chem.* 289(42): 29437-29445.
- Hong, I. S., Y. K. Kim, W. S. Choi, D. W. Seo, J. W. Yoon, J. W. Han, H. Y. Lee and H. W. Lee (2003). "Purification and characterization of nitric oxide synthase from *Staphylococcus aureus*." *FEMS Microbiol. Lett.* 222(2): 177-182.
- Honikel, K. O. (2008). "The use and control of nitrate and nitrite for the processing of meat products." *Meat Sci.* 78(1-2): 68-76.
- Horsburgh, M. J., M. O. Clements, H. Crossley, E. Ingham and S. J. Foster (2001a). "PerR controls oxidative stress resistance and iron storage proteins and is required for virulence in *Staphylococcus aureus*." *Infect. Immun.* 69(6): 3744-3754.
- Horsburgh, M. J., E. Ingham and S. J. Foster (2001b). "In *Staphylococcus aureus*, fur is an interactive regulator with PerR, contributes to virulence, and is necessary for oxidative stress resistance through positive regulation of catalase and iron homeostasis." *J. Bacteriol.* 183(2): 468-475.
- Hughes, M. C., J. P. Kerry, E. K. Arendt, P. M. Kenneally, P. L. McSweeney and E. E. O'Neill (2002). "Characterization of proteolysis during the ripening of semi-dry fermented sausages." *Meat Sci.* 62(2): 205-216.
- Iacumin, L., L. Cocolin, C. Cantoni and G. Comi (2007). "Preliminary analysis of the lipase gene (gehM) expression of *Staphylococcus xylosus* *in vitro* and during fermentation of naturally fermented sausages (*in situ*)." *J. Food Prot.* 70(11): 2665-2669.
- Iacumin, L., M. Manzano and G. Comi (2012). "Catalase-positive cocci in fermented sausage: Variability due to different pork breeds, breeding systems and sausage production technology." *Food Microbiol.* 29(2): 178-186.
- Ignarro, L. J., J. M. Fukuto, J. M. Griscavage, N. E. Rogers and R. E. Byrns (1993). "Oxidation of nitric oxide in aqueous solution to nitrite but not nitrate: comparison with enzymatically formed nitric oxide from L-arginine." *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90(17): 8103-8107.
- Irlinger, F. (2008). "Safety assessment of dairy microorganisms: coagulase-negative staphylococci." *Int. J. Food Microbiol.* 126(3): 302-310.
- Irlinger, F., S. Layec, S. Hélinck and E. Dugat-Bony (2015). "Cheese rind microbial communities: diversity, composition and origin." *FEMS Microbiol. Lett.* 362(2): 1-11.
- Irlinger, F., A. Morvan, N. El Solh and J. L. Bergere (1997). "Taxonomic Characterization of Coagulase-Negative Staphylococci in Ripening Flora from Traditional French Cheeses." *Systematic and Applied Microbiology* 20: 319-328.
- Jang, S. and J. A. Imlay (2007). "Micromolar intracellular hydrogen peroxide disrupts metabolism by damaging iron-sulfur enzymes." *J. Biol. Chem.* 282(2): 929-937.
- Jankovic, I. and R. Brückner (2002). "Carbon catabolite repression by the catabolite control protein CcpA in *Staphylococcus xylosus*." *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 4(3): 309-314.
- Jankovic, I. and R. Brückner (2007). "Carbon catabolite repression of sucrose utilization in *Staphylococcus xylosus*: catabolite control protein CcpA ensures glucose preference and autoregulatory limitation of sucrose utilization." *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 12(1-2): 114-120.
- Jankovic, I., O. Egeter and R. Bruckner (2001). "Analysis of catabolite control protein A-dependent repression in *Staphylococcus xylosus* by a genomic reporter gene system." *J. Bacteriol.* 183(2): 580-586.
- Janssens, M., A. Van der Mijnsbrugge, M. Sánchez Mainar, T. Balzarini, L. De Vuyst and F. Leroy (2014). "The use of nucleosides and arginine as alternative energy sources by coagulase-negative staphylococci in view of meat fermentation." *Food Microbiol.* 39: 53-60.

- Jeong, D. W., S. Han and J. H. Lee (2014a). "Safety and technological characterization of *Staphylococcus equorum* isolates from jeotgal, a Korean high-salt-fermented seafood, for starter development." *Int. J. Food. Microbiol.* 188: 108-115.
- Jeong, D. W., H. R. Kim, G. Jung, S. Han, C. T. Kim and J. H. Lee (2014b). "Bacterial community migration in the ripening of doenjang, a traditional Korean fermented soybean food." *J. Microbiol. Biotechnol.* 24(5): 648-660.
- Jones-Carson, J., J. Laughlin, M. A. Hamad, A. L. Stewart, M. I. Voskuil and A. Vázquez-Torres (2008). "Inactivation of [Fe-S] metalloproteins mediates nitric oxide-dependent killing of *Burkholderia mallei*." *PLoS One* 3(4): e1976.
- Kartal, B., M. M. Kuypers, G. Lavik, J. Schalk, H. J. Op den Camp, M. S. Jetten and M. Strous (2007). "Anammox bacteria disguised as denitrifiers: nitrate reduction to dinitrogen gas *via* nitrite and ammonium." *Environ. Microbiol.* 9(3): 635-642.
- Kenneally, P. M., G. Schwarz, N. G. Fransen and E. K. Arendt (1998). "Lipolytic starter culture effects on production of free fatty acids in fermented sausages." *J. Food Sci.* 63(3): 538-543.
- Kers, J. A., M. J. Wach, S. B. Krasnoff, J. Widom, K. D. Cameron, R. A. Bukhalid, D. M. Gibson, B. R. Crane and R. Loria (2004). "Nitration of a peptide phytotoxin by bacterial nitric oxide synthase." *Nature* 429(6987): 79-82.
- Kinkel, T. L., S. Ramos-Montañez, J. M. Pando, D. V. Tadeo, E. N. Strom, S. J. Libby and F. C. Fang (2016). "An essential role for bacterial nitric oxide synthase in *Staphylococcus aureus* electron transfer and colonization." *Nat. Microbiol.* 2: 16224.
- Kloos, W. E. and K.-H. Schleifer (1986). "Genus IV. *Staphylococcus*." In *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Edited by P.H.A. Sneath, N.S. Mari, M.E. Sharpe & J. G. Holt. Baltimore, Md.: Williams & Wilkins.: 1013-1035.
- Kloos, W. E., K.-H. Schleifer and F. Götz (1991). "The genus *Staphylococcus*". In *The Prokaryotes. A Handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification, Applications*. 1369-1420.
- Knezevic, I., S. Bachem, A. Sickmann, H. E. Meyer, J. Stülke and W. Hengstenberg (2000). "Regulation of the glucose-specific phosphotransferase system (PTS) of *Staphylococcus carnosus* by the antiterminator protein GlcT." *Microbiology* 146: 2333-2342.
- Knowles, R. G., M. Palacios, R. M. Palmer and S. Moncada (1989). "Formation of nitric oxide from L-arginine in the central nervous system: a transduction mechanism for stimulation of the soluble guanylate cyclase." *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 86(13): 5159-5162.
- Kohanski, M. A., D. J. Dwyer, B. Hayete, C. A. Lawrence and J. J. Collins (2007). "A common mechanism of cellular death induced by bactericidal antibiotics." *Cell* 130(5): 797-810.
- Krause, B. L., J. G. Sebranek, R. E. Rust and A. Mendonca (2011). "Incubation of curing brines for the production of ready-to-eat, uncured, no-nitrite-or-nitrate-added, ground, cooked and sliced ham." *Meat Sci.* 89(4): 507-513.
- Kriegelstein, C. F., W. H. Cerwinka, F. S. Laroux, J. W. Salter, J. M. Russell, G. Schuermann, M. B. Grisham, C. R. Ross and D. N. Granger (2001). "Regulation of murine intestinal inflammation by reactive metabolites of oxygen and nitrogen: divergent roles of superoxide and nitric oxide." *J. Exp. Med.* 194(9): 1207-1218.
- Kunst, F., N. Ogasawara, I. Moszer, A. M. Albertini, G. Alloni, V. Azevedo, M. G. Bertero, P. Bessieres, A. Bolotin, S. Borchert, R. Borriss, L. Boursier, A. Brans, M. Braun, S. C. Brignell, S. Bron, S. Brouillet, C. V. Bruschi, B. Caldwell, V. Capuano, N. M. Carter, S. K. Choi, J. J. Cordani, I. F. Connerton, N. J. Cummings, R. A. Daniel, F. Denziot, K. M. Devine, A. Dusterhoft, S. D. Ehrlich, P. T. Emmerson, K. D. Entian, J. Errington, C. Fabret, E. Ferrari, D. Foulger, C. Fritz, M. Fujita, Y. Fujita, S. Fuma, A. Galizzi, N. Galleron, S. Y. Ghim, P. Glaser, A. Goffeau, E. J. Golightly, G. Grandi, G. Guisepi, B. J. Guy, K. Haga, J. Haiech, C. R. Harwood, A. Henaut, H. Hilbert, S.

- Holsappel, S. Hosono, M. F. Hullo, M. Itaya, L. Jones, B. Joris, D. Karamata, Y. Kasahara, M. Klaerr-Blanchard, C. Klein, Y. Kobayashi, P. Koetter, G. Koningstein, S. Krogh, M. Kumano, K. Kurita, A. Lapidus, S. Lardinois, J. Lauber, V. Lazarevic, S. M. Lee, A. Levine, H. Liu, S. Masuda, C. Mauel, C. Medigue, N. Medina, R. P. Mellado, M. Mizuno, D. Moestl, S. Nakai, M. Noback, D. Noone, M. O'Reilly, K. Ogawa, A. Ogiwara, B. Oudega, S. H. Park, V. Parro, T. M. Pohl, D. Portelle, S. Porwollik, A. M. Prescott, E. Presecan, P. Pujic, B. Purnelle, G. Rapoport, M. Rey, S. Reynolds, M. Rieger, C. Rivolta, E. Rocha, B. Roche, M. Rose, Y. Sadaie, T. Sato, E. Scanlan, S. Schleich, R. Schroeter, F. Scoffone, J. Sekiguchi, A. Sekowska, S. J. Seror, P. Serror, B. S. Shin, B. Soldo, A. Sorokin, E. Tacconi, T. Takagi, H. Takahashi, K. Takemaru, M. Takeuchi, A. Tamakoshi, T. Tanaka, P. Terpstra, A. Togoni, V. Tosato, S. Uchiyama, M. Vandebol, F. Vannier, A. Vassarotti, A. Viari, R. Wambutt, H. Wedler, T. Weitzenegger, P. Winters, A. Wipat, H. Yamamoto, K. Yamane, K. Yasumoto, K. Yata, K. Yoshida, H. F. Yoshikawa, E. Zumstein, H. Yoshikawa and A. Danchin (1997). "The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*." *Nature* 390(6657): 249-256.
- Kuroda, M., T. Ohta, I. Uchiyama, T. Baba, H. Yuzawa, I. Kobayashi, L. Cui, A. Oguchi, K. Aoki, Y. Nagai, J. Lian, T. Ito, M. Kanamori, H. Matsumaru, A. Maruyama, H. Murakami, A. Hosoyama, Y. Mizutani-Ui, N. K. Takahashi, T. Sawano, R. Inoue, C. Kaito, K. Sekimizu, H. Hirakawa, S. Kuhara, S. Goto, J. Yabuzaki, M. Kanehisa, A. Yamashita, K. Oshima, K. Furuya, C. Yoshino, T. Shiba, M. Hattori, N. Ogasawara, H. Hayashi and K. Hiramatsu (2001). "Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*." *Lancet* 357(9264): 1225-1240.
- Kuroda, M., A. Yamashita, H. Hirakawa, M. Kumano, K. Morikawa, M. Higashide, A. Maruyama, Y. Inose, K. Matoba, H. Toh, S. Kuhara, M. Hattori and T. Ohta (2005). "Whole genome sequence of *Staphylococcus saprophyticus* reveals the pathogenesis of uncomplicated urinary tract infection." *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102(37): 13272-13277.
- Lancaster, J. R., Jr. (2015). "Nitric oxide: a brief overview of chemical and physical properties relevant to therapeutic applications." *Future Sci. OA* 1(1): FSO59.
- Laratta, W. P. and J. P. Shapleigh (2003). "Site-directed mutagenesis of NnrR: a transcriptional regulator of nitrite and nitric oxide reductase in *Rhodobacter sphaeroides*." *FEMS Microbiol. Lett.* 229(2): 173-178.
- Lascelles, J. and K. A. Burke (1978). "Reduction of ferric iron by L-lactate and DL-glycerol-3-phosphate in membrane preparations from *Staphylococcus aureus* and interactions with the nitrate reductase system." *J. Bacteriol.* 134(2): 585-589.
- Le Loir, Y., F. Baron and M. Gautier (2003). "*Staphylococcus aureus* and food poisoning." *Genet. Mol. Res.* 2(1): 63-76.
- Le Loir, Y. and M. Gautier (2009). "*Staphylococcus aureus*." In *Monographies de microbiologie*. Ed. Lavoisier.
- Leroy, F., J. Verluyten and L. De Vuyst (2006). "Functional meat starter cultures for improved sausage fermentation." *Int. J. Food Microbiol.* 106(3): 270-285.
- Leroy, S., P. Giammarinaro, J. P. Chacornac, I. Lebert and R. Talon (2010). "Biodiversity of indigenous staphylococci of naturally fermented dry sausages and manufacturing environments of small-scale processing units." *Food. Microbiol.* 27(2): 294-301.
- Leroy, S., A. Vermassen and R. Talon (2016). "*Staphylococcus*: Occurrence and Properties." In: B. Caballero, P.M. Finglas, F. Toldrá (Eds.) *Encyclopedia of Food and Health*, Academic Press, Oxford, 2016, 140-145.
- Lewis, R. S. and W. M. Deen (1994). "Kinetics of the reaction of nitric oxide with oxygen in aqueous solutions." *Chem. Res. Toxicol.* 7(4): 568-574.
- Li, H. and T. L. Poulos (2005). "Structure-function studies on nitric oxide synthases." *J. Inorg. Biochem.* 99(1): 293-305.

- Li, H., K. Witte, M. August, I. Brausch, U. Godtel-Armbrust, A. Habermeier, E. I. Closs, M. Oelze, T. Munzel and U. Forstermann (2006). "Reversal of endothelial nitric oxide synthase uncoupling and up-regulation of endothelial nitric oxide synthase expression lowers blood pressure in hypertensive rats." *J. Am. Coll. Cardiol.* 47(12): 2536-2544.
- Li, P., B. Kong, Q. Chen, D. Zheng and N. Liu (2013). "Formation and identification of nitrosylmyoglobin by *Staphylococcus xylosus* in raw meat batters: a potential solution for nitrite substitution in meat products." *Meat Sci.* 93(1): 67-72.
- Li, P. J., H. T. Luo, B. H. Kong, Q. Liu and C. G. Chen (2016). "Formation of red myoglobin derivatives and inhibition of spoilage bacteria in raw meat batters by lactic acid bacteria and *Staphylococcus xylosus*." *Lwt-Food Science and Technology* 68: 251-257.
- Lim, M. H., B. A. Wong, W. H. Pitcock, Jr., D. Mokshagundam, M. H. Baik and S. J. Lippard (2006). "Direct nitric oxide detection in aqueous solution by copper(II) fluorescein complexes." *J. Am. Chem. Soc.* 128(44): 14364-14373.
- Maia, L. B. and J. J. Moura (2015). "Nitrite reduction by molybdoenzymes: a new class of nitric oxide-forming nitrite reductases." *J. Biol. Inorg. Chem* 20(2): 403-433.
- Makhlin, J., T. Kofman, I. Borovok, C. Kohler, S. Engelmann, G. Cohen and Y. Aharonowitz (2007). "*Staphylococcus aureus* ArcR controls expression of the arginine deiminase operon." *J. Bacteriol.* 189(16): 5976-5986.
- Marletta, M. A. (1993). "Nitric oxide synthase structure and mechanism." *J. Biol. Chem.* 268(17): 12231-12234.
- Marty, E., J. Buchs, E. Eugster-Meier, C. Lacroix and L. Meile (2012). "Identification of staphylococci and dominant lactic acid bacteria in spontaneously fermented Swiss meat products using PCR-RFLP." *Food Microbiol.* 29(2): 157-166.
- Masson, F., L. Hinrichsen, R. Talon and M. C. Montel (1999). "Factors influencing leucine catabolism by a strain of *Staphylococcus carnosus*." *Int. J. Food Microbiol.* 49(3): 173-178.
- Mauriello, G., A. Casaburi, G. Blaiotta and F. Villani (2004). "Isolation and technological properties of coagulase negative staphylococci from fermented sausages of Southern Italy." *Meat Sci.* 67(1): 149-158.
- Midha, S., R. Mishra, M. A. Aziz, M. Sharma, A. Mishra, P. Khandelwal and R. Bhatnagar (2005). "Cloning, expression, and characterization of recombinant nitric oxide synthase-like protein from *Bacillus anthracis*." *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 336(1): 346-356.
- Miralles, M. C., J. Flores and G. Perez-Martinez (1996). "Biochemical tests for the selection of *Staphylococcus* strains as potential meat starter cultures." *Food Microbiol.* 13(3): 227-236.
- Molina-Favero, C., C. M. Creus, M. Simontacchi, S. Puntarulo and L. Lamattina (2008). "Aerobic nitric oxide production by *Azospirillum brasilense* Sp245 and its influence on root architecture in tomato." *Mol. Plant-Microbe Interact.* 21(7): 1001-1009.
- Møller, J. K., S. Jongberg and L. H. Skibsted (2015). "Color." In: Toldrá, F. (Ed.), *Handbook of Fermented Meat and Poultry*, second ed. John Wiley & Sons, Ltd., Chichester, UK, : 195-205.
- Montel, M. C., J. Reitz, R. Talon, J. L. Berdagué and S. Rousset-Akrim (1996). "Biochemical activities of *Micrococcaceae* and their effects on the aromatic profiles and odours of a dry sausage model." *Food Microbiol.* 13(6): 489-499.
- Montgomery, H. J., A. L. Dupont, H. E. Leivo and J. G. Guillemette (2010). "Cloning, Expression, and Purification of a Nitric Oxide Synthase-Like Protein from *Bacillus cereus*." *Biochem. Res. Int.* 2010: 489892.
- Moreno-Vivián, C., P. Cabello, M. Martínez-Luque, R. Blasco and F. Castillo (1999). "Prokaryotic nitrate reduction: molecular properties and functional distinction among bacterial nitrate reductases." *J. Bacteriol.* 181(21): 6573-6584.

- Morita, H., R. Sakata and Y. Nagata (1998). "Nitric oxide complex of iron(II) myoglobin converted from metmyoglobin by *Staphylococcus xylosus*." J. Food Sci. 63(2): 352-355.
- Morita, H., H. Yoshikawa, R. Sakata, Y. Nagata and H. Tanaka (1997). "Synthesis of nitric oxide from the two equivalent guanidino nitrogens of L-arginine by *Lactobacillus fermentum*." J. Bacteriol. 179(24): 7812-7815.
- Morozkina, E. V. and R. A. Zvyagil'skaya (2007). "Nitrate reductases: structure, functions, and effect of stress factors." Biochemistry (Mosc) 72(10): 1151-1160.
- Morrissey, P. A., P. J. Sheehy, K. Galvin, J. P. Kerry and D. J. Buckley (1998). "Lipid stability in meat and meat products." Meat Sci. 49S1: S73-86.
- Mosbah, H., A. Sayari, H. Mejdoub, H. Dhouib and Y. Gargouri (2005). "Biochemical and molecular characterization of *Staphylococcus xylosus* lipase." Biochim. Biophys. Acta. 1723(1-3): 282-291.
- Müllner, M., O. Hammel, B. Mienert, S. Schlag, E. Bill and G. Uden (2008). "A PAS domain with an oxygen labile [4Fe-4S](2+) cluster in the oxygen sensor kinase NreB of *Staphylococcus carnosus*." Biochemistry 47(52): 13921-13932.
- Myers, K. S., H. Yan, I. M. Ong, D. Chung, K. Liang, F. Tran, S. Keleş, R. Landick and P. J. Kiley (2013). "Genome-scale analysis of *Escherichia coli* FNR reveals complex features of transcription factor binding." PLoS Genet. 9(6): e1003565.
- Neubauer, H. and F. Götz (1996). "Physiology and interaction of nitrate and nitrite reduction in *Staphylococcus carnosus*." J. Bacteriol. 178(7): 2005-2009.
- Neubauer, H., I. Pantel and F. Götz (1999). "Molecular characterization of the nitrite-reducing system of *Staphylococcus carnosus*." J. Bacteriol. 181(5): 1481-1488.
- Niemann, V., M. Koch-Singenstreu, A. Neu, S. Nilkens, F. Götz, G. Uden and T. Stehle (2014). "The NreA protein functions as a nitrate receptor in the staphylococcal nitrate regulation system." J. Mol. Biol. 426(7): 1539-1553.
- Nilkens, S., M. Koch-Singenstreu, V. Niemann, F. Götz, T. Stehle and G. Uden (2014). "Nitrate/oxygen co-sensing by an NreA/NreB sensor complex of *Staphylococcus carnosus*." Mol. Microbiol. 91(2): 381-393.
- Olesen, P. T., A. S. Meyer and L. H. Stahnke (2004a). "Generation of flavour compounds in fermented sausages-the influence of curing ingredients, *Staphylococcus* starter culture and ripening time." Meat Sci. 66(3): 675-687.
- Ordway, G. A. and D. J. Garry (2004). "Myoglobin: an essential hemoprotein in striated muscle." J. Exp. Biol. 207: 3441-3446.
- Palacios, M., R. G. Knowles, R. M. Palmer and S. Moncada (1989). "Nitric oxide from L-arginine stimulates the soluble guanylate cyclase in adrenal glands." Biochem. Biophys. Res. Commun. 165(2): 802-809.
- Panda, K., S. Adak, K. S. Aulak, J. Santolini, J. F. McDonald and D. J. Stuehr (2003). "Distinct influence of N-terminal elements on neuronal nitric-oxide synthase structure and catalysis." J. Biol. Chem. 278(39): 37122-37131.
- Pant, K., A. M. Bilwes, S. Adak, D. J. Stuehr and B. R. Crane (2002). "Structure of a nitric oxide synthase heme protein from *Bacillus subtilis*." Biochemistry 41(37): 11071-11079.
- Pant, K. and B. R. Crane (2005). "Structure of a loose dimer: an intermediate in nitric oxide synthase assembly." J. Mol. Biol. 352(4): 932-940.
- Pantel, I., P. E. Lindgren, H. Neubauer and F. Götz (1998). "Identification and characterization of the *Staphylococcus carnosus* nitrate reductase operon." Mol. Gen. Genet. 259(1): 105-114.
- Park, J. E., J. E. Seo, J. Y. Lee and H. Kwon (2015). "Distribution of Seven N-Nitrosamines in Food." Toxicol. Res. 31(3): 279-288.

- Patel, B. A., M. Moreau, J. Widom, H. Chen, L. Yin, Y. Hua and B. R. Crane (2009). "Endogenous nitric oxide regulates the recovery of the radiation-resistant bacterium *Deinococcus radiodurans* from exposure to UV light." *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 106(43): 18183-18188.
- Pegg, R. B. and K. O. Honikel (2015). "Principles of Curing." In: Toldrá, F. (Ed.), *Handbook of Fermented Meat and Poultry*, second ed. John Wiley & Sons, Ltd., Chichester, UK, : 19-30.
- Pilet, E., W. Nitschke, U. Liebl and M. H. Vos (2007). "Accommodation of NO in the active site of mammalian and bacterial cytochrome c oxidase aa3." *Biochim. Biophys. Acta.* 1767(5): 387-392.
- Pisacane, V., M. L. Callegari, E. Puglisi, G. Dallolio and A. Rebecchi (2015). "Microbial analyses of traditional Italian salami reveal microorganisms transfer from the natural casing to the meat matrix." *Int. J. Food Microbiol.* 207: 57-65.
- Planchon, S., C. Chambon, M. Desvaux, I. Chafsey, S. Leroy, R. Talon and M. Hebraud (2007). "Proteomic analysis of cell envelope from *Staphylococcus xylosus* C2a, a coagulase-negative *staphylococcus*." *J. Proteome Res.* 6(9): 3566-3580.
- Planchon, S., M. Desvaux, I. Chafsey, C. Chambon, S. Leroy, M. Hebraud and R. Talon (2009). "Comparative subproteome analyses of planktonic and sessile *Staphylococcus xylosus* C2a: new insight in cell physiology of a coagulase-negative *Staphylococcus* in biofilm." *J. Proteome Res.* 8(4): 1797-1809.
- Plate, L. and M. A. Marletta (2012). "Nitric oxide modulates bacterial biofilm formation through a multicomponent cyclic-di-GMP signaling network." *Mol. Cell.* 46(4): 449-460.
- Poška, J., A. Rebecchi, V. Pisacane, L. Morelli and E. Puglisi (2015). "Bacterial diversity in typical Italian salami at different ripening stages as revealed by high-throughput sequencing of 16S rRNA amplicons." *Food Microbiol.* 46: 342-356.
- Poolman, B., J. Knol, C. van der Does, P. J. Henderson, W. J. Liang, G. Leblanc, T. Pourcher and I. Mus-Veteau (1996). "Cation and sugar selectivity determinants in a novel family of transport proteins." *Mol. Microbiol.* 19(5): 911-922.
- Pothier, J. F., C. Prigent-Combaret, J. Haurat, Y. Moëgne-Looco and F. Wisniewski-Dyé (2008). "Duplication of plasmid-borne nitrite reductase gene *nirK* in the wheat-associated plant growth-promoting rhizobacterium *Azospirillum brasilense* Sp245." *Mol. Plant-Microbe Interact.* 21(6): 831-842.
- Potter, L., H. Angove, D. Richardson and J. Cole (2001). "Nitrate reduction in the periplasm of gram-negative bacteria." *Adv. Microb. Physiol.* 45: 51-112.
- Priemé, A., G. Braker and J. M. Tiedje (2002). "Diversity of nitrite reductase (*nirK* and *nirS*) gene fragments in forested upland and wetland soils." *Appl. Environ. Microbiol.* 68(4): 1893-1900.
- Rafferty, S. P. (2011). "Nitric Oxide Synthases of Bacteria - and Other Unicellular Organisms." *The Open Nitric Oxide Journal* 3, (Suppl 1-M4): 25-32.
- Rantsiou, K., L. Iacumin, C. Cantoni, G. Comi and L. Coccolin (2005). "Ecology and characterization by molecular methods of *Staphylococcus* species isolated from fresh sausages." *Int. J. Food Microbiol.* 97(3): 277-284.
- Ras, G., V. Zuliani, P. Derkx, T. M. Seibert, S. Leroy and R. Talon (2017). "Evidence for Nitric Oxide Synthase Activity in *Staphylococcus xylosus* Mediating Nitrosoheme Formation." *Front. Microbiol.* 8(598).
- Ratsimba, A., S. Leroy, J. P. Chacornac, D. Rakoto, E. Arnaud, V. Jeannoda and R. Talon (2017). "Staphylococcal ecosystem of kitoza, a traditional malagasy meat product." *Int. J. Food Microbiol.* 246: 20-24.
- Ravyts, F., G. Vrancken, K. D'Hondt, C. Vasilopoulos, L. De Vuyst and F. Leroy (2009). "Kinetics of growth and 3-methyl-1-butanol production by meat-borne, coagulase-negative staphylococci in view of sausage fermentation." *Int. J. Food Microbiol.* 134(1-2): 89-95.

- Reece, S. Y., J. J. Woodward and M. A. Marletta (2009). "Synthesis of nitric oxide by the NOS-like protein from *Deinococcus radiodurans*: a direct role for tetrahydrofolate." *Biochemistry* 48(23): 5483-5491.
- Rimiaux, T., G. Vrancken, B. Vuylsteke, L. De Vuyst and F. Leroy (2011). "The pentose moiety of adenosine and inosine is an important energy source for the fermented-meat starter culture *Lactobacillus sakei* CTC 494." *Appl. Environ. Microbiol.* 77(18): 6539-6550.
- Rockel, P., F. Strube, A. Rockel, J. Wildt and W. M. Kaiser (2002). "Regulation of nitric oxide (NO) production by plant nitrate reductase *in vivo* and *in vitro*." *J. Exp. Bot.* 53(366): 103-110.
- Rodionov, D. A., I. L. Dubchak, A. P. Arkin, E. J. Alm and M. S. Gelfand (2005). "Dissimilatory metabolism of nitrogen oxides in bacteria: comparative reconstruction of transcriptional networks." *PLoS Comput. Biol.* 1(5): e55.
- Rodriguez-Crespo, I., P. Moenne-Loccoz, T. M. Loehr and P. R. Ortiz de Montellano (1997). "Endothelial nitric oxide synthase: modulations of the distal heme site produced by progressive N-terminal deletions." *Biochemistry* 36(28): 8530-8538.
- Rodríguez, M., F. Núñez, J. J. Córdoba, C. Sanabria, E. Bermúdez and M. A. Asensio (1994). "Characterization of *Staphylococcus* spp. and *Micrococcus* spp. isolated from Iberian ham throughout the ripening process." *Int. J. Food. Microbiol.* 24(1-2): 329-335.
- Rosenstein, R., C. Nerz, L. Biswas, A. Resch, G. Raddatz, S. C. Schuster and F. Gotz (2009). "Genome analysis of the meat starter culture bacterium *Staphylococcus carnosus* TM300." *Appl. Environ. Microbiol.* 75(3): 811-822.
- Röszer, T. (2012). Nitric Oxide is a Bioproduct in Prokaryotes. *The Biology of Subcellular Nitric Oxide*. Dordrecht, Springer Netherlands: 19-46.
- Rowley, G., D. Hensen, H. Felgate, A. Arkenberg, C. Appia-Ayme, K. Prior, C. Harrington, S. J. Field, J. N. Butt, E. Baggs and D. J. Richardson (2012). "Resolving the contributions of the membrane-bound and periplasmic nitrate reductase systems to nitric oxide and nitrous oxide production in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium." *Biochem.* 441(2): 755-762.
- Ruaro, A., C. Andrighetto, S. Torriani and A. Lombardi (2013). "Biodiversity and characterization of indigenous coagulase-negative staphylococci isolated from raw milk and cheese of North Italy." *Food Microbiol.* 34(1): 106-111.
- Sakinc, T., M. Woznowski, M. Ebsen and S. G. Gatermann (2005). "The surface-associated protein of *Staphylococcus saprophyticus* is a lipase." *Infect. Immun.* 73(10): 6419-6428.
- Salard-Arnaud, I., D. Stuehr, J. L. Boucher and D. Mansuy (2012). "Spectroscopic, catalytic and binding properties of *Bacillus subtilis* NO synthase-like protein: comparison with other bacterial and mammalian NO synthases." *J. Inorg. Biochem.* 106(1): 164-171.
- Salard, I., E. Mercey, E. Rekka, J. L. Boucher, P. Nioche, I. Mikula, P. Martasek, C. S. Raman and D. Mansuy (2006). "Analogies and surprising differences between recombinant nitric oxide synthase-like proteins from *Staphylococcus aureus* and *Bacillus anthracis* in their interactions with l-arginine analogs and iron ligands." *J. Inorg. Biochem.* 100(12): 2024-2033.
- Sánchez Mainar, M. and F. Leroy (2015). "Process-driven bacterial community dynamics are key to cured meat colour formation by coagulase-negative staphylococci via nitrate reductase or nitric oxide synthase activities." *Int. J. Food Microbiol.*
- Sánchez Mainar, M., D. A. Stavropoulou and F. Leroy (2016). "Exploring the metabolic heterogeneity of coagulase-negative staphylococci to improve the quality and safety of fermented meats: a review." *Int. J. Food Microbiol.*
- Sánchez Mainar, M., S. Weckx and F. Leroy (2014). "Coagulase-negative Staphylococci favor conversion of arginine into ornithine despite a widespread genetic potential for nitric oxide synthase activity." *Appl. Environ. Microbiol.* 80(24): 7741-7751.

- Santolini, J., S. Adak, C. M. Curran and D. J. Stuehr (2001). "A kinetic simulation model that describes catalysis and regulation in nitric-oxide synthase." *J. Biol. Chem.* 276(2): 1233-1243.
- Santolini, J., M. Roman, D. J. Stuehr and T. A. Mattioli (2006). "Resonance Raman study of *Bacillus subtilis* NO synthase-like protein: similarities and differences with mammalian NO synthases." *Biochemistry* 45(5): 1480-1489.
- Sapp, A. M., A. B. Mogen, E. A. Almand, F. E. Rivera, L. N. Shaw, A. R. Richardson and K. C. Rice (2014). "Contribution of the *nos-pdt* operon to virulence phenotypes in methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus*." *PLoS One* 9(9): e108868.
- Schleifer, K.-H. and J. A. Bell (2015). "*Staphylococcus*." *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*: 1-43.
- Schleifer, K. H. and U. Fischer (1982). "Description of a New Species of the Genus *Staphylococcus* - *Staphylococcus-carnosus*." *Int. J. Syst. Bacteriol.* 32(2): 153-156.
- Schlüchter, S., P. Eberhard, H. Kneubühler and R. Hadorn (2000). "Nitrate et nitrite dans les produits crus fermentés." *Viandes Prod. Carnés* 28 (1).
- Schreiber, F., M. Beutler, D. Enning, M. Lamprecht-Grandio, O. Zafra, J. E. González-Pastor and D. de Beer (2011). "The role of nitric-oxide-synthase-derived nitric oxide in multicellular traits of *Bacillus subtilis* 3610: biofilm formation, swarming, and dispersal." *BMC Microbiol.* 11: 111.
- Schröder, I., E. Johnson and S. de Vries (2003). "Microbial ferric iron reductases." *FEMS Microbiol. Rev.* 27(2-3): 427-447.
- Sebranek, J. G. and J. N. Bacus (2007). "Cured meat products without direct addition of nitrate or nitrite: what are the issues?" *Meat Sci.* 77(1): 136-147.
- Shadbolt, C., T. Ross and T. A. McMeekin (2001). "Differentiation of the effects of lethal pH and water activity: food safety implications." *Lett. Appl. Microbiol.* 32(2): 99-102.
- Shapleigh, J. P. (2006). "The Denitrifying Prokaryotes." *Prokaryotes: A Handbook on the Biology of Bacteria*, Vol 2, Third Edition: 769-792.
- Shatalin, K., I. Gusarov, E. Avetissova, Y. Shatalina, L. E. McQuade, S. J. Lippard and E. Nudler (2008). "*Bacillus anthracis*-derived nitric oxide is essential for pathogen virulence and survival in macrophages." *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 105(3): 1009-1013.
- Silverman, J. A., N. G. Perlmutter and H. M. Shapiro (2003). "Correlation of daptomycin bactericidal activity and membrane depolarization in *Staphylococcus aureus*." *Antimicrob. Agents Chemother.* 47(8): 2538-2544.
- Sindelar, J. J. and A. L. Milkowski (2011). "Sodium Nitrite in Processed Meat and Poultry Meats: A Review of Curing and Examining the Risk/Benefit of Its Use." *American Meat Science Association White Paper Series No. 3*: 1-14.
- Skibsted, L. H. (2011). "Nitric oxide and quality and safety of muscle based foods." *Nitric Oxide* 24(4): 176-183.
- Smith, B. C. and M. A. Marletta (2012). "Mechanisms of S-nitrosothiol formation and selectivity in nitric oxide signaling." *Curr. Opin. Chem. Biol.* 16(5-6): 498-506.
- Soares, J. C., M. R. Marques, F. K. Tavora, J. O. Pereira, F. X. Malcata and M. M. Pintado (2011). "Biodiversity and characterization of *Staphylococcus* species isolated from a small manufacturing dairy plant in Portugal." *Int. J. Food Microbiol.* 146(2): 123-129.
- Sørli, M., A. C. Gorren, S. Marchal, T. Shimizu, R. Lange, K. K. Andersson and B. Mayer (2003). "Single-turnover of nitric-oxide synthase in the presence of 4-amino-tetrahydrobiopterin: proposed role for tetrahydrobiopterin as a proton donor." *J. Biol. Chem.* 278(49): 48602-48610.
- Spencer, J. B., N. J. Stolowich, C. A. Roessner and A. I. Scott (1993). "The *Escherichia coli cysG* gene encodes the multifunctional protein, siroheme synthase." *FEBS Lett.* 335(1): 57-60.

- Stahnke, L. H. (1999). "Volatiles produced by *Staphylococcus xylosus* and *Staphylococcus carnosus* during growth in sausage minces - Part II. The influence of growth parameters." *Food Science and Technology-Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie* 32(6): 365-371.
- Starkenbug, S. R., D. J. Arp and P. J. Bottomley (2008). "Expression of a putative nitrite reductase and the reversible inhibition of nitrite-dependent respiration by nitric oxide in *Nitrobacter winogradskyi* Nb-255." *Environ. Microbiol.* 10(11): 3036-3042.
- Steenhoudt, O., V. Keijers, Y. Okon and J. Vanderleyden (2001). "Identification and characterization of a periplasmic nitrate reductase in *Azospirillum brasilense* Sp245." *Arch. Microbiol.* 175(5): 344-352.
- Stuehr, D., S. Pou and G. M. Rosen (2001). "Oxygen reduction by nitric-oxide synthases." *J. Biol. Chem.* 276(18): 14533-14536.
- Stuehr, D. J., J. Santolini, Z. Q. Wang, C. C. Wei and S. Adak (2004). "Update on mechanism and catalytic regulation in the NO synthases." *J. Biol. Chem.* 279(35): 36167-36170.
- Sudhamsu, J. and B. R. Crane (2006). "Structure and reactivity of a thermostable prokaryotic nitric-oxide synthase that forms a long-lived oxy-heme complex." *J. Biol. Chem.* 281(14): 9623-9632.
- Sudhamsu, J. and B. R. Crane (2009). "Bacterial nitric oxide synthases: what are they good for?" *Trends Microbiol.* 17(5): 212-218.
- Sun, F., Q. Ji, M. B. Jones, X. Deng, H. Liang, B. Frank, J. Telser, S. N. Peterson, T. Bae and C. He (2012). "AirSR, a [2Fe-2S] cluster-containing two-component system, mediates global oxygen sensing and redox signaling in *Staphylococcus aureus*." *J. Am. Chem. Soc.* 134(1): 305-314.
- Surdel, M. C., B. F. Dutter, G. A. Sulikowski and E. P. Skaar (2016). "Bacterial Nitric Oxide Synthase Is Required for the *Staphylococcus aureus* Response to Heme Stress." *ACS Infect. Dis.* 2(8): 572-578.
- Talon, R., S. Leroy-Sétrin and S. Fadda (2002). "Bacterial starters involved in the quality of fermented meat products - Chapter 10." In *Research Advances in Quality of Meat and Meat Products* Edited by F. Toldrá: Research Signpost: 175-191.
- Talon, R. and S. Leroy (2014). FERMENTED FOODS | Fermented Meat Products and the Role of Starter Cultures A2 - Batt, Carl A. *Encyclopedia of Food Microbiology (Second Edition)*. M. L. Tortorello. Oxford, Academic Press: 870-874.
- Talon, R., D. Walter, S. Chartier, C. Barriere and M. C. Montel (1999). "Effect of nitrate and incubation conditions on the production of catalase and nitrate reductase by staphylococci." *Int. J. Food Microbiol.* 52(1-2): 47-56.
- Tjener, K., L. H. Stahnke, L. Andersen and J. Martinussen (2004). "The pH-unrelated influence of salt, temperature and manganese on aroma formation by *Staphylococcus xylosus* and *Staphylococcus carnosus* in a fermented meat model system." *Int. J. Food Microbiol.* 97(1): 31-42.
- Toldrá, F. and M. Reig (2015). "The Biochemistry of Meat and Fat. ." In: Toldrá, F. (Ed.), *Handbook of Fermented Meat and Poultry*, second ed. John Wiley & Sons, Ltd., Chichester, UK, : 49-54.
- Vaish, M. and V. K. Singh (2013). "Antioxidant Functions of Nitric Oxide Synthase in a Methicillin Sensitive *Staphylococcus aureus*." *Int. J. Microbiol.* 2013: 312146.
- van der Star, W. R., M. J. van de Graaf, B. Kartal, C. Picioreanu, M. S. Jetten and M. C. van Loosdrecht (2008). "Response of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria to hydroxylamine." *Appl. Environ. Microbiol.* 74(14): 4417-4426.
- van Sorge, N. M., F. C. Beasley, I. Gusarov, D. J. Gonzalez, M. von Kockritz-Blickwede, S. Anik, A. W. Borkowski, P. C. Dorrestein, E. Nudler and V. Nizet (2013). "Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacterial nitric-oxide synthase affects antibiotic sensitivity and skin abscess development." *J. Biol. Chem.* 288(9): 6417-6426.

- Vermassen, A. (2014). "Adaptation de *Staphylococcus xylosus* à la matrice carnée, impact des composés nitrosés et utilisation des sources de fer". Sciences agricoles. Université Blaise Pascal-Clermont-Ferrand II, Français.
- Vermassen, A., A. de la Foye, V. Loux, R. Talon and S. Leroy (2014). "Transcriptomic analysis of *Staphylococcus xylosus* in the presence of nitrate and nitrite in meat reveals its response to nitrosative stress." *Front. Microbiol.* 5: 691.
- Vermassen, A., E. Dordet-Frisoni, A. de La Foye, P. Mischeau, V. Laroute, S. Leroy and R. Talon (2016a). "Adaptation of *Staphylococcus xylosus* to Nutrients and Osmotic Stress in a Salted Meat Model." *Front. Microbiol.* 7: 87.
- Vermassen, A., R. Talon and S. Leroy (2016b). "Ferritin, an iron source in meat for *Staphylococcus xylosus*?" *Int. J. Food Microbiol.* 225: 20-26.
- Vilar, I., M. C. García Fontán, B. Prieto, M. E. Tornadizo and J. Carballo (2000). "A survey on the microbiological changes during the manufacture of dry-cured lacon, a Spanish traditional meat product." *J. Appl. Microbiol.* 89(6): 1018-1026.
- Vine, C. E., S. K. Purewal and J. A. Cole (2011). "NsrR-dependent method for detecting nitric oxide accumulation in the *Escherichia coli* cytoplasm and enzymes involved in NO production." *FEMS Microbiol. Lett.* 325(2): 108-114.
- Vossen, E. and S. De Smet (2015). "Protein oxidation and protein nitration influenced by sodium nitrite in two different meat model systems." *J. Agric. Food Chem.* 63(9): 2550-2556.
- Wagner, E., S. Marcandier, O. Egeter, J. Deutscher, F. Götz and R. Brückner (1995). "Glucose kinase-dependent catabolite repression in *Staphylococcus xylosus*." *J. Bacteriol.* 177(21): 6144-6152.
- Wakeman, C. A., N. D. Hammer, D. L. Stauff, A. S. Attia, L. L. Anzaldi, S. I. Dikalov, M. W. Calcutt and E. P. Skaar (2012). "Menaquinone biosynthesis potentiates haem toxicity in *Staphylococcus aureus*." *Mol. Microbiol.* 86(6): 1376-1392.
- Wang, Z. Q., R. J. Lawson, M. R. Buddha, C. C. Wei, B. R. Crane, A. W. Munro and D. J. Stuehr (2007). "Bacterial flavodoxins support nitric oxide production by *Bacillus subtilis* nitric-oxide synthase." *J. Biol. Chem.* 282(4): 2196-2202.
- Wei, C. C., Z. Q. Wang, A. L. Meade, J. F. McDonald and D. J. Stuehr (2002). "Why do nitric oxide synthases use tetrahydrobiopterin?" *J. Inorg. Biochem.* 91(4): 618-624.
- White, O., J. A. Eisen, J. F. Heidelberg, E. K. Hickey, J. D. Peterson, R. J. Dodson, D. H. Haft, M. L. Gwinn, W. C. Nelson, D. L. Richardson, K. S. Moffat, H. Qin, L. Jiang, W. Pamphile, M. Crosby, M. Shen, J. J. Vamathevan, P. Lam, L. McDonald, T. Utterback, C. Zalewski, K. S. Makarova, L. Aravind, M. J. Daly, K. W. Minton, R. D. Fleischmann, K. A. Ketchum, K. E. Nelson, S. Salzberg, H. O. Smith, J. C. Venter and C. M. Fraser (1999). "Genome sequence of the radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans* R1." *Science* 286(5444): 1571-1577.
- Wieland, B., C. Feil, E. Gloria-Maercker, G. Thumm, M. Lechner, J. M. Bravo, K. Poralla and F. Götz (1994). "Genetic and biochemical analyses of the biosynthesis of the yellow carotenoid 4,4'-diaponeurosporene of *Staphylococcus aureus*." *J. Bacteriol.* 176(24): 7719-7726.
- Zafiriou, O. C., Q. S. Hanley and G. Snyder (1989). "Nitric oxide and nitrous oxide production and cycling during dissimilatory nitrite reduction by *Pseudomonas perfectomarina*." *J. Biol. Chem.* 264(10): 5694-5699.
- Zhang, S., M. M. Melzer, S. N. Sen, N. Çelebi-Ölçüm and T. H. Warren (2016). "A motif for reversible nitric oxide interactions in metalloenzymes." *Nat. Chem.* 8(7): 663-669.
- Zhang, Y. Q., S. X. Ren, H. L. Li, Y. X. Wang, G. Fu, J. Yang, Z. Q. Qin, Y. G. Miao, W. Y. Wang, R. S. Chen, Y. Shen, Z. Chen, Z. H. Yuan, G. P. Zhao, D. Qu, A. Danchin and Y. M. Wen (2003). "Genome-based analysis of virulence genes in a non-biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis* strain (ATCC 12228)." *Mol. Microbiol.* 49(6): 1577-1593.

COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES

COMMUNICATIONS ORALES

Ras G., Zuliani V., Derkx P., Seibert T.M., Chacornac J.P., Talon R., Leroy S. Une activité NO-synthase chez *Staphylococcus xylosus*. 13^{ème} Journée des Microbiologistes du pôle Clermontois, Clermont-Ferrand, Avril 2016. Communication orale G. Ras et résumé.

Ras G., Zuliani V., Derkx P., Seibert T.M., Chacornac J.P., Talon R., Leroy S. Production de monoxyde d'azote par *Staphylococcus xylosus* : contribution d'une NO-synthase. Journées de l'Ecole Doctorale Sciences de la Vie, Santé, Agronomie et Environnement, Clermont-Ferrand, Juin 2016. Communication orale G. Ras et résumé.

Ras G., Zuliani V., Derkx P., Seibert T.M., Talon R., Leroy S. Utilisation d'un ferment producteur de monoxyde d'azote comme alternative aux sels nitrités ? 16èmes Journées Sciences du Muscle et Technologies des Viandes, Paris, Novembre 2016. Communication orale G. Ras et résumé.

Ras G., Zuliani V., Derkx P., Seibert T.M., Talon R., Leroy S. Exploration of the production of nitric oxide by staphylococci: a potential solution for nitrite substitution in meat products. Innovation Seminar at CHR-HANSEN, Culture Interactions, Hørsholm, Denmark, November 2016. Communication orale G. Ras

COMMUNICATION AFFICHEE

Ras G., Zuliani V., Derkx P., Seibert T.M., Talon R., Leroy S. Contribution of the *Staphylococcus xylosus* nitric oxide synthase to the formation of the meat pigment nitrosomyoglobin. FoodMicro, 25th International ICFMH Conference, Dublin, Ireland, July 2016. Communication affichée G. Ras et résumé.

COMMUNICATIONS ORALES

Une activité NO-synthase chez *Staphylococcus xylosus*

Ras G.^{1,2}, Zuliani V.², Derkx P.³, Seibert T.M.⁴, Chacornac J.P.¹, Talon R.¹, Leroy S.¹.

¹MIC, INRA, Saint-Genès-Champanelle, France, ²CHR. HANSEN SAS, Saint-Germain-lès-Arpajon, France, ³CHR. HANSEN A/S, Hørsholm, Denmark, ⁴CHR. HANSEN GmbH, Pohlheim, Germany

Staphylococcus xylosus est une espèce couramment utilisée comme ferment dans les produits carnés transformés, notamment pour son rôle dans le développement de la couleur. Dans ces produits, il est d'usage de rajouter du nitrate et/ou du nitrite comme additifs. *S. xylosus* permet la réduction du nitrate en nitrite grâce à son activité nitrate réductase. Le NO provenant de la dégradation des nitrites a la capacité à se lier au groupement hème de la myoglobine pour former la nitrosomyoglobine, un composé stable et rouge, responsable de la couleur typique des salaisons. Le contexte actuel vise à réduire l'utilisation du nitrate et du nitrite afin de limiter le risque de formation des composés N-nitrosés tels que les nitrosamines. *In vitro*, *S. xylosus* est capable de convertir la metmyoglobine en nitrosomyoglobine sans ajout de nitrate ou nitrite. Le séquençage des génomes de différentes espèces de staphylocoque a révélé, dans tous ces génomes, la présence d'un gène codant une nitrique oxyde synthase (NOS), enzyme qui peut synthétiser du NO à partir de l'arginine. Si l'activité de la NOS de *S. aureus* a été bien caractérisée, aucune activité n'a jamais été montrée chez un staphylocoque à coagulase négative. Notre objectif a été d'évaluer le rôle de la NOS de *S. xylosus* dans la production de NO. Un mutant délété du gène *nos* a été construit chez la souche *S. xylosus* C2a. La capacité de ce mutant à convertir la metmyoglobine en nitrosomyoglobine est significativement plus faible que celle de la souche sauvage C2a ou du mutant complémenté. De plus, le mutant montre un déficit de croissance en condition aérobie et une plus forte sensibilité au stress oxydant.

Nous avons ainsi démontré pour la première fois la contribution directe de la NOS dans la formation de NO chez un staphylocoque à coagulase-négative d'intérêt agroalimentaire.

**13^{ème} Journée des Microbiologistes du pôle Clermontois,
Avril 2016, Clermont-Ferrand, France**

Production de monoxyde d'azote par *Staphylococcus xylosus* : contribution d'une NO-synthase

Ras G.^{1,2}, Zuliani V.², Derkx P.³, Seibert T.M.⁴, Chacornac J.P.¹, Talon R.¹, Leroy S.¹

¹MIC, INRA, Saint-Genès-Champanelle, France, ²CHR. HANSEN SAS, Saint-Germain-lès-Arpajon, France, ³CHR. HANSEN A/S, Hørsholm, Denmark, ⁴CHR. HANSEN GmbH, Pohlheim, Germany

Staphylococcus xylosus est une espèce couramment utilisée comme ferment dans les produits carnés transformés, notamment pour son rôle dans le développement de la couleur. Dans ces produits, il est d'usage de rajouter du nitrate et/ou du nitrite comme additifs. *S. xylosus* permet la réduction du nitrate en nitrite grâce à son activité nitrate réductase. Le NO provenant de la dégradation des nitrites a la capacité à se lier au groupement hème de la myoglobine pour former la nitrosomyoglobine, un composé stable et rouge, responsable de la couleur typique des salaisons. Le contexte actuel vise à réduire l'utilisation du nitrate et du nitrite afin de limiter le risque de formation des composés N-nitrosés tels que les nitrosamines. *In vitro*, *S. xylosus* est capable de convertir la metmyoglobine en nitrosomyoglobine sans ajout de nitrate ou nitrite. Le séquençage des génomes de différentes espèces de staphylocoque a révélé, dans tous ces génomes, la présence d'un gène codant une nitrique oxyde synthase (NOS), enzyme qui peut synthétiser du NO à partir de l'arginine. Si l'activité de la NOS de *S. aureus* a été bien caractérisée, aucune activité n'a jamais été montrée chez un staphylocoque à coagulase négative. Notre objectif a été d'évaluer le rôle de la NOS de *S. xylosus* dans la production de NO. Un mutant délété du gène *nos* a été construit chez la souche *S. xylosus* C2a. La capacité de ce mutant à convertir la metmyoglobine en nitrosomyoglobine est significativement plus faible que celle de la souche sauvage C2a ou du mutant complémenté. De plus, le mutant montre un déficit de croissance en condition aérobie et une plus forte sensibilité au stress oxydant.

Nous avons ainsi démontré pour la première fois la contribution directe de la NOS dans la formation de NO chez un staphylocoque à coagulase-négative d'intérêt agroalimentaire.

**Journées de l'Ecole Doctorale Sciences de la Vie, Santé, Agronomie et Environnement,
Juin 2016, Clermont-Ferrand, France**

Utilisation d'un ferment producteur de monoxyde d'azote comme alternative aux sels nitrites ?

Ras G.^{1,2}, Zuliani V.², Derkx P.³, Seibert T.M.⁴, Talon R.¹, Leroy S.¹

¹MIC, INRA, Saint-Genès-Champanelle, France, ²CHR. HANSEN SAS, Saint-Germain-lès-Arpajon, France, ³CHR. HANSEN A/S, Hørsholm, Denmark, ⁴CHR. HANSEN GmbH, Pohlheim, Germany

Staphylococcus xylosum, a coagulase-negative *Staphylococcus* is usually used as a starter culture in meat products. It contributes to the reduction of nitrate to nitrite through its nitrate reductase activity that is crucial for color development. Nitrite is reduced to nitric oxide (NO), which binds to the meat pigment metmyoglobin to form the stable red nitrosomyoglobin. However, the safety of the use of nitrite regarding human health has been questioned. Therefore, alternatives to substitute nitrite are under investigation. The aim was to evaluate the ability of *S. xylosum* nitric oxide synthase (NOS) to produce NO, based on an assay in which metmyoglobin is converted to nitrosomyoglobin. A mutant strain deleted for *nos* (Δnos) has been generated. The ability of the Δnos mutant to form nitrosomyoglobin was sharply decreased comparing to the wild-type and the *nos* complemented mutant, demonstrating the contribution of *S. xylosum* NOS in the production of NO. The NOS pathway needs to be further understood and could constitute a natural solution to substitute nitrite in meat products.

**16èmes Journées Sciences du Muscle et Technologies des Viandes,
Novembre 2016, Paris, France**

COMMUNICATION AFFICHEE

25th International ICFMH Conference – Food Microbiology,
July 2016, Dublin, Ireland



Geoffrey RAS^{1,2}
Véronique ZULIANI³
Patrick DERJOK³
Tim M. SEIBERT⁴
Régine TALON¹
Sabine LEROY¹

¹ INRA, URMS4 MIC
63122 Saint-Genès-Champagnelle,
FRANCE
² CHR-HANSEN SAS, 91290 Saint
Germain lès Arpajon, FRANCE
³ CHR-HANSEN A/S, 2970
Ilgsholm, DENMARK
⁴ CHR-HANSEN GmbH, 35415
Pöhlweis, GERMANY

sabine.leroy@dermont.Liwa.fr
regine.talon@dermont.Liwa.fr

CONTRIBUTION OF THE *STAPHYLOCOCCUS XYLOSUS* NITRIC OXIDE SYNTHASE TO THE FORMATION OF THE MEAT PIGMENT NITROSOMYOGLOBIN

Introduction

Staphylococcus xylosum is a coagulase-negative *Staphylococcus* that contributes to color formation in meat products through its nitrate reductase activity, which reduces the curing salt nitrate to nitrite. Nitrite is, subsequently, chemically reduced in nitric oxide (NO) which reacts with the meat pigment metmyoglobin to form the stable red nitrosomyoglobin. However, due to the risk of nitrosamines formation associated with the use of curing salt, alternatives to produce meat products without any addition of nitrate and nitrite or natural curing agents are under investigation. The nitric oxide synthase (NOS), an enzyme that synthesizes NO from arginine, was suggested as a potential alternative to substitute nitrate and nitrite in meat products. Although NOS activity has been well described in the coagulase-positive *S. aureus*, this activity remains to be demonstrated in coagulase-negative staphylococci.

The main objective was to study the ability of *S. xylosum* NOS to produce NO

Materials & Methods

Bacterial strains:

S. xylosum C2a (wild-type)
S. xylosum C2a deleted for *nos*
(mutant): Δnos
S. xylosum C2a Δnos
complemented for *nos*:
 $\Delta nos-pnos$

Conditions of growth:

Strains were grown
under aerobic
conditions (150 RPM)
at 30°C

Pigmentation:

Carotenoids were
methanol-extracted after
3 days of growth on
Tryptic Soy Agar

NO production:

Strains were inoculated in
a metmyoglobin-
supplemented medium
and incubated at 30°C for
24h

Results

Conclusion

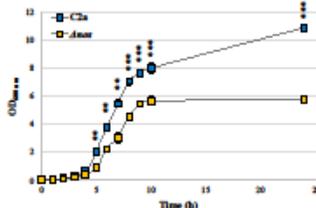
NOS is involved for the growth of *S. xylosum* C2a under aerobic conditions. Loss of NOS resulted in higher pigmentation in the mutant (Δnos). The involvement of NOS in the production of nitric oxide was demonstrated in a coagulase-negative staphylococcus strain used as starter culture.

Prospect

The NOS pathway needs to be further characterized as a potential natural solution to substitute nitrate and nitrite in meat products.

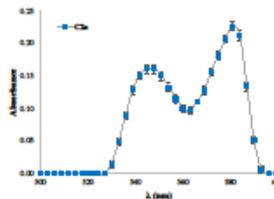
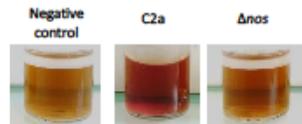
Acknowledgements
We would like to thank
J. P. Chacoma for
technical assistance

NOS is required for growth

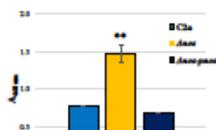


Strains were grown in Tryptic Soy Broth. **: p<0.01, ***: p<0.001.

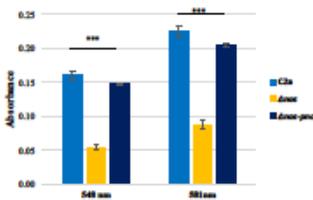
NOS produces NO



NOS affects pigmentation



Absorbance of pigment was measured at $\lambda_{460 nm}$. **: p<0.01.



Absorbance of nitrosomyoglobin was measured at $\lambda_{568 nm}$ and $\lambda_{581 nm}$. ***: p<0.001

1^{er} PRIX POSTER

Production de monoxyde d'azote par les staphylocoques à coagulase négative : implication de l'oxyde nitrique synthase de *Staphylococcus xylosus*

Résumé

Les staphylocoques à coagulase négative (SCN) sont des bactéries fréquemment isolées de viandes et de produits carnés. Parmi les SCN, seules les deux espèces *S. xylosus* et *S. carnosus* sont utilisées comme ferments dans les produits carnés. Dans ces produits, il est d'usage d'ajouter du nitrate/nitrite pour le développement de la couleur typique des salaisons. Les staphylocoques participent au développement et à la stabilité de la couleur en réduisant le nitrate en nitrite *via* leur activité nitrate réductase. Le nitrite est chimiquement réduit en monoxyde d'azote (NO), qui se lie au fer de l'hème de la myoglobine pour former la nitrosomyoglobine, un pigment rouge et stable. Le contexte actuel vise à réduire l'utilisation du nitrate/nitrite afin de limiter le risque de formation de composés N-nitrosés tels que les nitrosamines. Il a été montré que les bactéries pouvaient synthétiser du NO à partir d'une oxyde nitrique synthase (NOS). Le gène *nos* a été identifié dans une collection de souches de SCN isolées de viande. La séquence protéique de la NOS est fortement conservée entre les espèces. Pour mettre en évidence la production de NO, un test basé sur la conversion de metmyoglobine en pigments rouges, l'oxymyoglobine et la nitrosomyoglobine, a été utilisé. Le nitrosohème contenu dans la nitrosomyoglobine a été extrait. La formation du nitrosohème, chez un mutant de délétion du gène *nos* de la souche *S. xylosus* C2a, est fortement réduite en condition limitée en oxygène et abolie en condition aérobie. De plus, la NOS de *S. xylosus* C2a est impliquée dans la réponse à un stress oxydant. Afin de déterminer le potentiel de production de NO de souches de *S. xylosus* et d'autres espèces de SCN, leur capacité à former de la nitrosomyoglobine a été évaluée. Cette formation est espèce- et souche-dépendante. Les souches de *S. xylosus* ont un potentiel de production de NO plus élevé que les souches des autres espèces. Ce test a également révélé que certaines souches de SCN sont capables de former de l'oxymyoglobine à partir de la metmyoglobine.

Cette étude a permis de mettre en évidence l'implication de la NOS dans la production de NO chez *S. xylosus* et la capacité de formation de nitrosomyoglobine chez d'autres souches de SCN isolées de viande.

Mots clés : staphylocoques à coagulase négative, *Staphylococcus xylosus*, ferment, couleur, nitrosomyoglobine, monoxyde d'azote, oxyde nitrique synthase

Nitric oxide production among coagulase negative staphylococci: involvement of nitric oxide synthase from *Staphylococcus xylosus*

Abstract

Coagulase Negative Staphylococci (CNS) are usually isolated from meat and meat products. In meat products, *S. xylosus* and *S. carnosus* are the only CNS species used as meat starter cultures. In these products, nitrate and nitrite are used as additives where they contribute to the development of the typical red coloration. Staphylococci contribute to the development and stability of colour through their nitrate reductase activity that reduces nitrate to nitrite. Nitrite is chemically reduced to nitric oxide (NO) which is able to bind the ferrous-heme iron to form the stable bright red nitrosomyoglobin pigment. However, the safety regarding the use of these additives on meat products has been questioned as nitrite is able to form N-nitroso compounds such as nitrosamines. Some bacteria are able to synthesize NO by nitric oxide synthase (NOS). The *nos* gene was identified in a collection of CNS isolated from meat. The NOS sequence is well conserved between species. NO production has been investigated based on the formation of red myoglobin derivatives from metmyoglobin such as oxymyoglobin and nitrosomyoglobin. Subsequently, the nitrosoheme was extracted from nitrosomyoglobin. Nitrosoheme formation was reduced under limited oxygenated condition while it was abolished under aerobic condition in a *S. xylosus* C2a *nos* deleted mutant. Moreover, NOS is involved in oxidative stress resistance in *S. xylosus* C2a. In order to determine the potential of NO production among other strains of *S. xylosus* and other CNS species, their potential to form nitrosomyoglobin was evaluated. Nitrosomyoglobin formation is strain- and species-dependent. This assay has also revealed that several CNS strains are able to form oxymyoglobin from metmyoglobin.

This study has demonstrated NOS-dependent NO production in *S. xylosus* and the ability of CNS isolated from meat to form nitrosomyoglobin.

Keywords: Coagulase Negative Staphylococci, *Staphylococcus xylosus*, meat starter, colour, nitrosomyoglobin, nitric oxide, nitric oxide synthase.