



HAL
open science

Etude des mécanismes de détection, d'adaptation et de protection d'une souche de *Pseudomonas fluorescens* isolée de l'air en réponse au NO₂ gazeux, marqueur de pollution automobile

Sékolène Depayras

► **To cite this version:**

Sékolène Depayras. Etude des mécanismes de détection, d'adaptation et de protection d'une souche de *Pseudomonas fluorescens* isolée de l'air en réponse au NO₂ gazeux, marqueur de pollution automobile. Bactériologie. Normandie Université, 2019. Français. NNT : 2019NORMMR005 . tel-03135440

HAL Id: tel-03135440

<https://theses.hal.science/tel-03135440>

Submitted on 9 Feb 2021

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

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

THÈSE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Préparée au sein de l'Université de Rouen Normandie

Étude des mécanismes de détection, d'adaptation et de protection d'une souche de *Pseudomonas fluorescens* isolée de l'air en réponse au NO₂ gazeux, marqueur de pollution automobile

Présentée et soutenue par

Ségoène DEPAYRAS

Thèse soutenue publiquement le 8 Février 2019
devant le jury composé de

M. Benoît COURNOYER	Directeur de Recherche (CNRS) / Responsable de l'équipe Bactéries Pathogènes Opportunistes et Environnement, Laboratoire d'écologie microbienne, Université Claude Bernard Lyon I, France	Rapporteur
M ^{me} Katy JEANNOT	MCU-PH (HDR) / Directrice adjointe du Laboratoire de Microbiologie (UMR 6249)/ Centre national de référence de la résistance aux antibiotiques, CHRU de Besançon, France	Rapporteur
M. Ivan MATIC	Directeur de Recherche / Responsable de l'équipe Réparation de l'ADN, réponse aux stress et vieillissement / Laboratoire Génétique moléculaire évolutive et médicale (UMR_S1001, INSERM) / Faculté de Médecine Paris Descartes, France	Examineur
M. Raphaël DELÉPÉE	Professeur des universités / Co-Responsable de l'équipe polluants chimiques et particuliers / Laboratoire Aliments Bioprocédés Toxicologie Environnements (EA4651), Université de Caen Normandie, France	Examineur
M ^{me} Nicole ORANGE	Professeur des universités / Laboratoire de Microbiologie, Signaux et Microenvironnement (EA 4312), Université de Rouen Normandie, Évreux, France	Directeur de thèse
M ^{me} Cécile DUCLAIROIR-POC	MCU (HDR) / Laboratoire de Microbiologie, Signaux et Microenvironnement (EA 4312), Université de Rouen Normandie, Évreux, France	Codirecteur de thèse

Thèse dirigée par le Pr Nicole ORANGE et co-encadrée par le Dr Cécile DUCLAIROIR-POC, Laboratoire de Microbiologie, Signaux et Microenvironnement LMSM EA4312, Université de Rouen Normandie

À mes parents

À Kévin

À Cécile

Remerciements

L'ensemble de ce travail a été réalisé au sein du Laboratoire de Microbiologie et Microenvironnement (EA4312) à l'Université de Rouen Normandie grâce à un financement régional. Ainsi je tiens à remercier dans un premier temps la région Haute Normandie pour leur support financier.

Je tiens à remercier mes deux rapporteurs, le **Dr Katy Jeannot**, du CHRU de Besançon, et le **Dr. Cournoyer**, de l'université Claude Bernard à Lyon, pour m'avoir fait l'honneur d'examiner mes travaux. Je suis également très honorée de compter parmi mon jury de thèse le **Dr. Ivan Matic**, de la faculté de Médecine Paris Descartes, et le **Pr. Raphaël Delépée**, de l'université de Caen Normandie. C'est avec une grande impatience que j'attends de vous rencontrer afin de pouvoir défendre l'ensemble de mes recherches, voire, de les faire évoluer en fonction de vos remarques à venir.

Je tiens à remercier énormément ma directrice de thèse, le **Pr. Nicole Orange**, et ma co-directrice, le **Dr. Cécile Duclairor-Poc** pour m'avoir choisie, m'avoir fait confiance et soutenue. Vous avez tout le temps cru en moi et, quand bien même j'étais prise de doutes, vous avez toujours su m'épauler. Merci d'avoir toujours été disponibles pour moi ! Merci Nicole pour ton enthousiasme, ton énergie est si communicative ! Cécile, je tiens à te dédicacer ce manuscrit en gage de reconnaissance car aucun mot ne peut décrire ce que tu représentes pour moi...Tu es bien plus qu'une simple encadrante! Je suis très heureuse d'avoir passé trois ans à tes côtés et triste à la fois de me dire que tout cela est passé si vite. Je pense qu'il est très difficile de retrouver des encadrantes avec des personnalités aussi belles que les vôtres et j'espère sincèrement que notre collaboration ne se terminera pas de sitôt !

Je tiens à remercier également le **Dr Nadine Merlet-Machour** et le **Dr. Hermann Heipiepper** avec qui j'ai pu collaborer sur l'aspect lipidomique de mon travail. Merci pour votre aide ainsi que vos corrections et remarques constructives concernant nos valorisations.

Cher **Marc**, je tiens particulièrement à te remercier pour toutes ces conférences auxquelles tu m'as permis de participer car j'ai découvert une nouvelle facette de ma personnalité côté communication, vulgarisation et valorisation ! Merci également pour tous nos échanges scientifiques (ou non !) en tout genre !

Un énorme merci aussi à toi aussi maman **Annabelle**, pour ton soutien moral et scientifique, tous ces brainstorming de BM et ces moments de rires!

A toi ma **Djoudjou** d'amour (ou « Djar » en référence à notre première rencontre ^^) Merci, merci, merci !!!! Tu es comme ma petite sœur, tu n'es pas une simple amie, tu es ma confidente, mon binôme de choc, mon recto-verso ! Merci de m'avoir appris le Kabyle (« Sdou »), de m'avoir fait découvrir tes émissions No-Brain, de m'avoir torturée de ton fameux franglish nocturne (« siudomonas ») et pour nos innombrables fous rires, pleurs, et craquages en tout genre ! Un mot pour l'avenir : Tu es capable de bien plus de chose que ce que tu ne crois... Ne lâche rien, soit forte, tu es une battante : « tout vient à point à qui sait attendre »...

A toi ma **Brenda** d'amour : Wololo ma Chatira (La cravache fonctionne bien ? Haha !). Heureusement que tu étais là ma copine du Sud quand on a débarqué sous ce froid, ce vent et cette

pluie infernale de Normandie ! Qu'est que ça aurait été déprimant sans toi ce début de thèse ! Alors mille fois merci d'avoir été là et d'avoir fait rayonner mes débuts chaotiques de chercheuse !

A mon p'tit **Mathias**, merci pour tout : tes petites recettes de cuisine « BM », tes fameuses inventions (à bientôt le prix de l'innovation !) et tous ces moments de déconnade : « Alerte aux gogoles », « I kill you », le concombre, ces photos bizarres d'animaux partout dans mes affaires, et bien d'autres bêtises encore !

A toi mon p'tit chinois **Andy**, merci d'avoir été là dès le début ! Ça n'a pas été facile tous les jours c'est sûr mais j'ai vraiment adoré tous les moments qu'on a passé ensemble : toi, Djoudjou, **Nalan** et moi ! Encore merci de m'avoir permis de réaliser mon rêve avec ce voyage en Chine, un moment magique d'évasion inoubliable. Merci infiniment d'avoir su me reconforter quand j'en ai eu le plus besoin...

Au binôme de choc Roc et Gravillon alias **Booby** et le **Frérot**, pfiou que dire... tant de chose à raconter en si peu de temps. Par quoi commencer, je ne sais pas, entre les vacances ensemble, **Guigui** et ses haut-le-cœur, nos traquenards de soirées, les litchis qui passent plus, nos discussion dans le jacuzzi, les knackis, les bobos partagés, la coupe d'Hagrid, ou le monospace ... En bref, quand le soleil se casse la gueule c'est foupoudav tout ça ! Merci pour tous ces moments qu'on a partagés ensemble !

A nos deux tourtereaux, **Daminou** et **Mélou**, merci pour toutes ces soirées, ces bonnes bouffes, ces moments de pâtisserie, ces barbecues qui giclent sur vos chaussures ! On se sera bien marrés à jouer à Call of à l'appart' avec toute la clique (et **Djoudjou** qui fait sa mauvaise !) ! Ravie d'avoir pu polluer vos esprits de mes expressions ^^ (Golbute, Baltringue, WOLOLO) ! Merci aussi pour toutes ces discussion ciné- et bibliographique m'ayant permis de découvrir un tas de nouvelles séries, BD, jeux... m'écartant du « droit » chemin de la thèse ^^!

Merci aussi à mon p'tit **Thotho** et ma **Valou** pour toutes nos soirées, nos escapades rouennaises, nos débuts de thésards et tous ces évènements auxquels on a participé ensemble ! Merci **Thotho** pour ces discussions entre geek et **Valou** pour ces petits moments entre filles forts sympathiques!

Enfin merci à vous tous, ceux qui ont contribués de près ou de loin à ma thèse, via l'ensemble des connaissances que vous avez pu partager, nos discussions, votre soutien et vos divers expertises qui font la force de ce laboratoire : **Ali, Florie, Sophie, Coco, Emeline, Anne, Nathalie, Olivier, Xavier, Sylvie, Jérémy, Lucille, mister Janvier** et mon p'tit **Mailloli**.

Merci à tous nos anciens thésards : **Tatiana, Rachel, Awa, Thibault** et **Dorian** pour tout le savoir-faire qu'ils nous auront apporté !

Merci également à toutes ces personnes qui contribuent énormément au bon fonctionnement de notre laboratoire : à toi mon p'tit rôleur de **Mailloli, Mag, Camille, Pierre-Jean** et **Chloé** !

Enfin un gros, **gros** merci à toi ma **Cathy**, tu as toujours été là pour moi et je n'ai pas assez su te remercier pour tout ce que tu as fait tout au long de ma thèse ! Merci pour toutes ces petites discussions autour d'un café et tous tes petits conseils !

Finalement quand je repense encore à ces trois ans, je ne vois plus que du bonheur qui en ressort. Tous les craquages qu'on a eu tous ensemble... il y en a tellement que je ne peux plus les

compter. Parfois, pendant la thèse, comme dirai Perceval et Karadok « **on en a gros !** » et « **on aimerai bien être considérés en tant que tel !** ». En tout cas je suis vraiment très heureuse, **Thibault**, qu'un de mes camarades Poitevin prenne la relève et que ce projet puisse continuer à s'épanouir, voire même, à développer les nouvelles perspectives que tu imagineras... **Force et Honneur !**

Enfin juste un petit mot à tous mes collègues thésards: « Le succès, c'est se promener d'échecs en échecs tout en restant motivé. » (Winston Churchill)

Pour finir, ces remerciements n'auraient aucun sens si je ne remerciais pas également les personnes qui ont fait de moi ce que je suis :

Un grand merci à mon équipe de Poitiers et principalement à mes deux mentors : **Juju** et **Emilie**, pour m'avoir autant inspirée dans cette carrière ! Merci à toi papa **Jean-Marc** car je sais que tu as toujours été très présent toi aussi !

Merci aussi à mes ami(e)s : mon **Robinou**, ma **Mymy** et ma p'tite **Nat'**, qui ont toujours été là pour me soutenir, me reconforter et me faire rire, bien que la distance nous sépare !

A ma petite famille sans qui je ne serai rien aujourd'hui et surtout ma **Maman** et mon **Papa** à qui je dédicace également ce travail ! Merci de vous être autant sacrifiés et d'avoir tout donné pour vos enfants, j'espère que vous serez toujours fières de nous. Merci aussi à mes **grands-parents** pour tout ce qu'ils ont fait pour moi ! Merci également à mes grands frères **Damien** et **Florent** que j'admire et qui ont toujours été des modèles pour moi.

Enfin, merci à l'ensemble de ma **belle-famille** de m'avoir acceptée et de m'avoir autant gâtée ! Mais surtout un grand merci à mon chéri **Kévin**, qui, en plus de m'avoir « supportée » lors de ces derniers mois, m'a épaulée, chouchoutée et m'a également aidée dans ma rédaction ! Ainsi, je te dédicace mes nombreux « level de Mario » à toi aussi mon p'tit geek en gage de ma gratitude et de tout mon amour !

Sommaire

LISTE DES ABRÉVIATIONS	8
LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES	12
FIGURES	12
TABLEAUX	14
INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE	15
CHAPITRE I. LES OXYDES D'AZOTES (NOX) : DES POLLUANTS ATMOSPHÉRIQUES AUX ALLURES MENAÇANTES	16
I. LA POLLUTION ATMOSPHÉRIQUE : L'UNE DES PLUS GROSSES MENACES SANITAIRES ET ENVIRONNEMENTALES	17
1. <i>Les principaux polluants atmosphériques</i>	17
2. <i>Quelques chiffres clefs</i>	18
II. LES OXYDES D'AZOTE: DES COMPOSÉS PRÉOCCUPANTS	18
1. <i>Définition et sources de production</i>	18
2. <i>Principales réactions atmosphériques</i>	19
3. <i>Les principaux NOx à l'échelle du vivant</i>	20
4. <i>Les stratégies limitant la pollution : une lutte constante</i>	43
CHAPITRE II. LE STRESS NITROSANT : L'ÉPÉE DE DAMOCLÈS INTRACELLULAIRE	45
I. LE CYCLE DE L'AZOTE ET LE MÉTABOLISME BACTÉRIEN	46
1. <i>La formation de composés azotés métabolisables : fixation, ammonification et nitrification</i>	47
2. <i>Le recyclage de l'azote : dénitrification classique et cas particuliers</i>	49
II. LES PRINCIPALES CIBLES DES NOX	52
1. <i>La membrane au centre des interactions ROS/RNS</i>	52
2. <i>Les modifications post-traductionnelles des protéines et oligopeptides</i>	57
3. <i>Les RNS à l'origine d'altérations du matériel génétique</i>	64
4. <i>La dégradation de matrices extracellulaires de polysaccharides : vers une anarchie du microenvironnement cellulaire</i>	67
III. DE LA PERCEPTION À LA RÉPONSE AU STRESS NITROSANT, UN PROCESSUS D'ADAPTATION ET DE TOLÉRANCE	69
1. <i>Les stratégies de déNOxification : principaux facteurs limitant le stress nitrosant</i>	69
2. <i>Les réparations des dommages liés au stress nitrosant</i>	76
3. <i>Le stress nitrosant et la lutte pour la conservation de l'énergie : principales reprogrammations métaboliques</i>	83
4. <i>Les pompes à efflux dans la réponse adaptative au stress oxydants et nitrosant</i>	90
CHAPITRE III. LES MICROORGANISMES AÉROPORTÉS : EXEMPLE DE PSEUDOMONAS FLUORESCENS, UN CONTAMINANT OMNIPRÉSENT À L'ADAPTABILITÉ HORS DU COMMUN	100
I. LES MICROORGANISMES AÉROPORTÉS : ORIGINES, TYPES ET MENACES	101
II. <i>PSEUDOMONAS FLUORESCENS</i> UNE ESPÈCE EN PERPÉTUEL REMANIEMENT	102
III. L'OMNIPRÉSENCE DE <i>P. FLUORESCENS</i> DANS L'ENVIRONNEMENT ET LA SANTÉ	103

IV. PRINCIPALES CARACTÉRISTIQUES DE <i>P. FLUORESCENS</i> ET FACTEURS DE VIRULENCE ASSOCIÉS	104
1. Aspects généraux	104
2. Cas particulier du modèle aéroporté MFAF76a et avancé des recherches	106
CONTEXTE D'ÉTUDE ET OBJECTIFS	108
MATÉRIEL ET MÉTHODES	109
I. PHYSIOLOGIE BACTÉRIENNE	110
1. Souches bactériennes	110
2. Milieux de culture	111
3. Conditions de culture	112
4. Cryo-conservation des souches	112
5. Étude de la cultivabilité	112
6. Suivi de croissance	113
7. Mesure de la perméabilisation membranaire	113
8. Microscopie confocale à balayage laser	113
9. Cytométrie en flux phase liquide	114
II. MÉTHODES DE PHYSICO-CHIMIE	115
1. Exposition au NO _x	115
III. MÉTHODES DE BIOCHIMIE	115
1. Extraction des protéines totales	115
2. Étude du profil de glycérophospholipides (GPs)	116
IV. MÉTHODES DE BIO-INFORMATIQUE	117
1. Identification de séquences d'intérêt	117
2. Élaboration des amorces pour la RT-qPCR	118
3. Élaboration des amorces pour la création de mutants	119
4. Vérification de la séquence nucléotidique	120
5. Étude de la séquence protéique et de la structures 3D	120
6. Analyse statistique	120
V. MÉTHODES DE BIOLOGIE MOLÉCULAIRE	121
1. Extraction d'ADN génomique	121
2. Extraction de plasmides	121
3. Séparation d'acides nucléiques	121
4. Quantification des acides nucléiques	121
5. Construction des séquences nucléiques pour les mutants	122
6. Transformation des souches d' <i>Escherichia coli</i>	123
7. Transformation des souches de <i>Pseudomonas fluorescens</i>	124
8. Étude d'expression de gènes par RT-qPCR	125
9. Analyse de l'expression de gènes cibles	127
RÉSULTATS	128
I. PARTIE 1 : LE NO ₂ ET LA MEMBRANE : UNE PERMÉABILISATION À L'ORIGINE DE L'APPARITION DE PHÉNOTYPES ANTIBIORÉSISTANT ?	129

1. Article 1 : Impact of gaseous NO ₂ on <i>P. fluorescens</i> strain in the membrane adaptation and virulence	130
2. Article 2: The modulation of antibiotic resistance as a consequence of NO ₂ induced membrane permeability in <i>P. fluorescens</i> ?	143
II. PARTIE 2 : UN ACTEUR CLEF DANS LA DÉTOXIFICATION DU NO ₂ CHEZ <i>P. FLUORESCENS</i> MFAF76 : LA FLAVOHÉMOPROTÉINE HMP	166
1. Article 3 : Some elements on detoxification pathway in <i>P. fluorescens</i> under nitrosative stress	167
DISCUSSION GÉNÉRALE	189
CONCLUSION	192
RÉFÉRENCES	194
ANNEXES	222
I. COMMUNICATIONS ORALES	222
II. PUBLICATIONS	222
III. POSTERS	224

Liste des abréviations

2-OG: 2-oxoglutarate	c-di-GMP : Di-guanosine monophosphate cyclique
3-nt: 3-nitrotyrosine	CIRC : Centre International de Recherche sur le Cancer
α-KDH: Alpha-cétoglutarate	CK: Cycle de Krebs
α-TH/α-T*: Alpha-tocophérol réduit/oxydé	CL: Citrate lyase
aa: acides aminés	CoA : Coenzyme A
ABC : « <i>ATP-Binding Cassette</i> »	Comammox : « <i>COMplete AMMonia Oxydizer</i> »
ACN: Aconitase	COV : Composés Organiques Volatiles
ADN_(SB/DB): Acide désoxyribonucléique simple brin ou double brin	CRP: « <i>cAMP receptor protein</i> »
ADNc : ADN complémentaire	CS: Citrate synthase
ADP : Adenosine diphosphate	DHB: Acide 2,5-Dihydroxybenzoïque
AhpC/F: Alkyl hydroxyperoxydase C et F	DMA: « <i>Davis Medium Agar</i> »
AK: Acétate kinase	DMB: « <i>Davis Medium Broth</i> »
Amo : Ammonium monooxygénase	DNR: « <i>Dissimilatory Nitrate respiration Regulator</i> »
AMPc : Adénosine monophosphate cyclique	DNRA: « <i>Dissimilatory Nitrate Reduction to Ammonia</i> »
Anammox: « <i>Anaerobic AMMonia OXYdizer</i> »	DO_{580nm}: Absorbance à 580nm
AQP: Aquaporine	EDTA: Éthylènediaminetétraacétique
ANR: « <i>Anaerobic regulator of arginine deiminase and Nitrate Reductase</i> »	eNOS: NO synthase endothéliale
AP: Site apurique/apyrimidique	EPS: Exopolysaccharides
ARNm: Acide ribonucléique message	ESI: « <i>ElectronSpray Ionization</i> »
ATP: adenosine triphosphate	ETC: « <i>Electron Transfert Chain</i> »
AVC: Accidents Vasculaires Cérébraux	FAD: flavine adénine dinucléotide
BCAA: « <i>Branched-chain amino acids</i> »	FADH₂: FAD réduite
BCPO : Bronchopneumopathies Chroniques Obstrucives	Fdx: Ferrédoxine
BER: « <i>Base Excision Repair</i> »	FNR: « <i>Fumarate and Nitrate reductase Regulatory</i> »
bNOS: NO synthase bactérienne	FRD: Fumarate réductase
bp : paire de bases	FUM: Fumarase
CA : Canal à Anions	FUR: « <i>Ferric Uptake Regulator</i> »

GAG: Glycosaminoglycanes	IPTG: Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside
GC: Guanylate cyclase	ISC: "Iron-sulfur cluster"
GCs: Guanylate cyclase soluble	Kat : Catalase
GDH: Glutamate déshydrogénase	L-Arg : L-Arginine
GDP: Guanosine diphosphate	LB: Luria Bertani
GOGAT: Glutamate synthase	LDL: « <i>Low-Density Lipoprotein</i> »
GP: Glycérophospholipides	Leu: Leucine
GPx: Glutathion peroxydase	LPS: Lipopolysaccharide
GR: Glutathion réductase	Lrp: « <i>Leucine-responsive regulatory protein</i> »
Grx: Glutarédoxine	MALDI: « <i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionization</i> »
GS: Glutamine synthase	MDH: Malate déshydrogénase
GS*: Glutathion radicalaire	mL: millilitre
GSH: Glutathion réduit	MS: Malate synthase
GS-NO: S-nitrosoglutathion	NAD(P)/ NAD(P)H: Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
GS-NO₂: S-nitroglutathion	NADH/NAD⁺: Nicotinamide adénine dinucléotide
GSNOR: S-nitroglutathion réductase	nm: nanomètre
GS-SG: Disulfure de glutathion	nNOS: NO synthase neuronale
GST: Glutathion S-transférase	NOD: NO dioxygénase
GTP: Guanosine triphosphate	NOR: NO réductase
Hao: Hydroxylamine oxydase	NOS: NO synthase
HDH: Hydrazine déshydrogénase	NOx: Oxydes d'azote
Hmp: Flavohémoprotéine	NDPK: "Nucleoside diphosphate kinase"
H-NOX: Heme sensible au NO et O ₂	NAR/NAP/NAS: Nitrate réductases
HR: Recombinaison homologue	NIR: Nitrite Réductase
HZS : Hydrazine synthase	NOR : NO Réductase
ICDH: Isocitrate déshydrogénase	NR: Nitrate Réductase
ICL : Isocitrate lyase	nt: nucléotides
Ile: Isoleucine	OMS: Organisation mondiale de la santé
INERIS : Institut National de l'Environnement Industriel et des RISques	ORF: "Open Reading Frame"
iNOS: NO Synthase de l'inflammation	
IP : Iodure de Propidium	

PAS: domaine protéique « Per-Arnt-Sim »
PC: phosphatidylcholine
PCR: “*Polymerase Chain Reaction*”
PDE: Phosphodiesterase
PDH: Pyruvate déshydrogénase
PE: Phosphatidyléthanolamine
PEPC: Phosphoénolpyruvate carboxylase
PG: Phosphatidylglycérol
PM: “*Particle Matter*”
P_{ox}: Phosphorylation oxydative
PPDK: Phosphoénolpyruvate dikinase
ppm: Particule par million
Prx: Peroxyrédoxine
PS: Phosphatidylsérine
PSD: “*Post-Source Decay*”
RND: « *Resistance Nodulation and cell division* »
RNS: “*Reactive Nitrogen Species*”
ROO•: Radicaux peroxydes
ROS: “*Reactive Oxygen Species*”
RT-qPCR: “Reverse Transcription quantitative Polymerase Chain Reaction”
SDH: Succinate déshydrogénase
SOD: SuperOxyde Dismutase
SOS: Voie de réponse SOS
SST3 : Système de sécrétion de type III
SST6 : Système de sécrétion de type VI
SUC: Succinyl-CoA déshydrogénase
TCA (ou CK): Cycle de l'acide tricarboxyliques (ou Cycle de Krebs)
TLC: « *Thin Layer Chromatography* »
TNT: Trinitrotoluène
Trx: Thiorédoxine

Trx-NO: Thiorédoxine nitrosylée
TrxR: Thiorédoxine réductase
Tyr• : Radical tyrosine
TyrNO• : Iminoxyles tyrosines
TyrO• : Radical tyrosyles
UFC : Unité formant des colonies
UGP: “*Unknown Glycerophospholipid*”
UQ: Ubiquinone
UQH₂: Ubiquinol
UV : UltraViolets
Val : Valine

Espèces chimiques

CO₂: Dioxyde de carbone
CO₃⁻: Ion carbonate
e⁻ : électron
Fe²⁺: Ion ferreux
Fe³⁺: Ion ferrique
Fe-S: Cluster fer-soufre
H⁺: Hydrogène
H₂O: Eau
H₂O₂: Peroxyde d'hydrogène
HCO₃⁻ : Bicarbonate
HNO₂: Acide nitreux
HNO₃: Acide nitrique
HO-Meⁿ⁺ : Complexe métallique réduit
L• : Radical lipidique
LH: Lipide
LNO: Nitroso-alcène
LNO₂: Nitro-alcène
LO• : Radical alcoxyl
LONO: Nitrite de lipide

LOO[•] : Radical peroxy
LOOH: Hydroperoxyde lipidique
LOONO: Lipide peroxydinitrite
Me: Complexe métallique
Me-NO: Complexe métallique nitrosylé
N₂: Diazote communément appelé azote
NH₃: ammoniac
NH₄⁺: ammonium
NH₂OH: Hydroxylamine
N₂O₃: Trioxyde de diazote
N_{org}: Azote organique
NO⁺: Ion nitrosonium
•NO/NO: monoxyde d'azote
•NO₂/NO₂: Dioxyde d'azote
NO₂⁻: Ion nitrite
NO₃⁻: Ion nitrate
O=Me⁽ⁿ⁺¹⁾: Complexe métallique oxydé
O₂: oxygène
O₃: Ozone
O₂^{•-}: anion superoxyde
•OH: radicaux hydroxyle
ONOO⁻: peroxydinitrite
ONOOH: acide peroxydinitreux
R-S[•]: radicaux thyls
R-SH: thiols
R-S-OH: Acide sulfénique
R-S-NO: S-nitrothiol
R-S-S-R': ponts disulfures

Liste des Tableaux et Figures

Figures

FIGURE 1 : LES PRINCIPALES SOURCES DE LA POLLUTION DE L'AIR	17
FIGURE 2 : LES NOX DANS L'ATMOSPHÈRE (ADAPTÉ DE (GRAHAM <i>ET AL.</i> , 2010)).	19
FIGURE 3 : PRODUCTION ENDOGÈNE DU MONOXYDE D'AZOTE (NO) SOUS L'ACTIVITÉ DE L'OXYDE NITRIQUE SYNTHASE (NOS) <i>IN VIVO</i> .	20
FIGURE 4 : FORMATION ENDOGÈNE DES PRINCIPAUX DÉRIVÉS NOX.	22
FIGURE 5 : SYNTHÈSE DE LA CONVERSION DE L'AZOTE GAZEUX EN COMPOSÉS AZOTÉS MÉTABOLISABLES (ADAPTÉE DE KUYPERS <i>ET AL.</i> , 2018).	47
FIGURE 6 : VUE D'ENSEMBLE DES DIFFÉRENTS MÉCANISMES INTERVENANT DANS LE RECYCLAGE DE COMPOSÉS AZOTÉS ORGANIQUES EN AZOTE GAZEUX (ADAPTÉE DE KUYPERS <i>ET AL.</i> , 2018).	50
FIGURE 7 : DIFFUSION DES PRINCIPAUX NOX, RNS ET ROS AU SEIN DE MEMBRANES ARTIFICIELLES (ADAPTÉ DE MÖLLER <i>ET AL.</i> , 2008 ; TROSTCHANSKY <i>ET AL.</i> , 2010).	53
FIGURE 8 : LA MEMBRANE AU CENTRE DE RÉACTIVITÉ ENTRE LES ROS ET RNS (ADAPTÉ DE BARTESAGHI <i>ET AL.</i> , 2011 ET DE MÖLLER <i>ET AL.</i> , 2007).	54
FIGURE 9 : SYNTHÈSE SIMPLIFIÉE DES PRINCIPALES RÉACTIONS DES RNS EN PRÉSENCE DE LIPIDES POLYINSATURÉS CHEZ L'EUCARYOTE (ADAPTÉ DE MÖLLER <i>ET AL.</i> , 2008).	56
FIGURE 10 : BIOGÉNÈSE DE LA 3-NITROTYROSINE (3-NT) (ADAPTÉE DE BARTESAGHI ET RADI, 2018).	58
FIGURE 11 : PRINCIPALES VOIES DE FORMATION DES NITROTHIOLS : EXEMPLE DE L'ACIDE AMINÉ CYSTÉINE (ADAPTÉ DE ZAFFAGNINI <i>ET AL.</i> , 2016).	60
FIGURE 12 : SIMPLIFICATION DE L'INTERACTION ENTRE LE FER, SOUS SES DIFFÉRENTES FORMES, ET LE NO (ADAPTÉE DE (GOW <i>ET AL.</i> , 2004) ET DE CRUZ-RAMOS <i>ET AL.</i> , 2002).	62
FIGURE 13 : BIOSYNTHÈSE DE GROUPEMENT PROSTHÉTIQUE FER-SOUFRE PAR LE COMPLEXE PROTÉIQUE ISC (ADAPTÉE DE (TAKAHASHI AND NAKAMURA, 1999)).	64
FIGURE 14 : DÉTÉRIORATIONS MAJEURES DE L'INFORMATION GÉNÉTIQUE INDUITES PAR LES RNS : CAS DE LA DÉSOXYGUANOSINE (ADAPTÉE DE (BHAMRA <i>ET AL.</i> , 2012; NNATE AND ACHI, 2016)).	66
FIGURE 15 : MÉCANISME HYPOTHÉTIQUE DE LA FRAGMENTATION DES GAGS (<i>E.G.</i> ACIDE HYALURONIQUE) INDUITE PAR LE PEROXYNITRITE (ADAPTÉE DE (KENNETT AND DAVIES, 2009)).	68
FIGURE 16 : RÉCAPITULATIF DES STRATÉGIES PRÉVENTIVES ANTI-NOX/ROS CHEZ <i>P. AERUGINOSA</i> (ADAPTÉE DE (MISHRA AND IMLAY, 2012)).	72
FIGURE 17 : STRUCTURE, RÉGULATION ET FONCTIONS DE LA FLAVOHÉMOPROTÉINE.	75
FIGURE 18 : SIMPLIFICATION DU CYCLE DU GLUTATHION ET SON IMPORTANCE DANS LA RÉPONSE AU STRESS OXYDANT ET NITROSANT (ADAPTÉE DE (SMIRNOVA AND OKTYABRSKY, 2005)).	77
FIGURE 19 : IMPLICATION DE LA THIORÉDOXINE DANS LA DÉTOXIFICATION DES ROS ET RNS (ADAPTÉE DE (MONTEIRO <i>ET AL.</i> , 2017)).	79
FIGURE 20 : MÉCANISMES IMPLIQUÉS DANS LA RÉPARATION DE L'ADN _(SB) SUITE À UN STRESS NITROSANT CHEZ <i>E. COLI</i> (ADAPTÉE DE (SPEK <i>ET AL.</i> , 2001)).	81
FIGURE 21 : INTER-RÉGULATION DES OPÉRONS GÉNÉRIQUES <i>ISC</i> ET <i>SUF</i> IMPLIQUÉS DANS LA BIOSYNTHÈSE DE GROUPEMENT FER-SOUFRE CHEZ <i>E. COLI</i> (ADAPTÉ DE (AYALA-CASTRO <i>ET AL.</i> , 2008)).	83

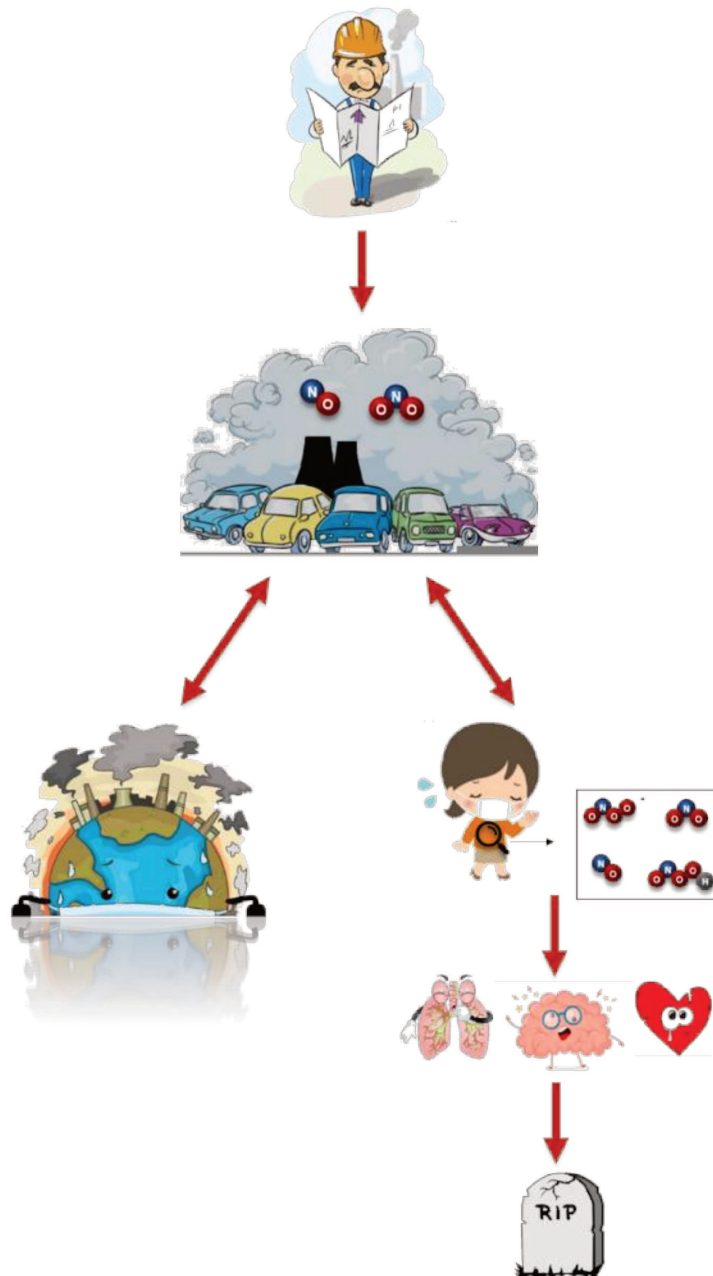
FIGURE 22 : SIMPLIFICATION DE L'ALTÉRATION DE LA PHOSPHORYLATION OXYDATIVE INDUITE PAR LE NO CHEZ <i>P. FLUORESCENS</i> (ADAPTÉE DE (AUGER ET AL., 2011)).	84
FIGURE 23 : LA REPROGRAMMATION DU MÉTABOLISME RESPIRATOIRE ADÉQUAT À DES CONDITIONS ANAÉROBIE CHEZ <i>P. AERUGINOSA</i> (ADAPTÉ DE (ARAI, 2011)).	86
FIGURE 24 : LA REPROGRAMMATION DU CYCLE DU CITRATE (TCA) CHEZ <i>P. FLUORESCENS</i> EN RÉPONSE AU STRESS NITROSANT (D'APRÈS (AUGER AND APPANNA, 2015; AUGER ET AL., 2011)).	87
FIGURE 25 : ORIGINES DE LA RÉPONSE STRINGENTE SUITE À UN STRESS NITROSANT CHEZ <i>E. COLI</i> (ADAPTÉE DE (KAISER AND HEINRICHS, 2018)).	89
FIGURE 26 : MÉCANISMES HYPOTHÉTIQUES IMPLIQUÉS DANS LA SUREXPRESSON DE <i>MEXEF-OPRN</i> EN PRÉSENCE D'UN STRESS NITROSANT CHEZ <i>P. AERUGINOSA</i> (ADAPTÉE DE (FETAR ET AL., 2011)).	94
FIGURE 27 : MÉCANISMES IMPLIQUÉS DANS LA DISPERSION DU BIOFILM DE <i>P. AERUGINOSA</i> MÉDIÉE PAR LE NO (ADAPTÉE DE (BARRAUD ET AL., 2015; HOSSAIN AND BOON, 2017)).	97
FIGURE 29 : DISTRIBUTIONS ET IMPLICATIONS DE <i>P. FLUORESCENS</i> DANS DIFFÉRENTES NICHES ÉCOLOGIQUES (SCALES ET AL., 2014).	103
FIGURE 28 : CARACTÉRISTIQUES PHYSIOLOGIQUES ET MORPHOLOGIQUES DE <i>P. FLUORESCENS</i>	105
FIGURE 30 : EXEMPLE DES AMORCES DESSINÉES POUR LE MUTANT DE DÉLÉTION DU GÈNE <i>OPRN</i>	119
FIGURE 31 : OBSERVATION DE <i>P. AERUGINOSA</i> À LA SUITE D'UNE EXPOSITION AU NO PAR MICROSCOPIE À FORCE ATOMIQUE (ADAPTÉE DE (DEUPREE AND SCHOENFISCH, 2009)).	130
FIGURE 32 : ÉTUDE PRÉDICTIVE DU MÉTABOLISME DE GLYCÉROPHOSPHOLIPIDES CHEZ <i>P. FLUORESCENS</i> MFAF76A (EN COURS DE VALORISATION).	142
FIGURE 33 : STRUCTURE HYPOTHÉTIQUE DE L'UGP (« <i>UNKNOWN GLYCEROPHOSPHOLIPID</i> »).	142
FIGURE 34 : REPRÉSENTATION DES POTENTIELLES CIBLES DU STRESS NITROSANT AU SEIN DE L'ENVELOPPE DE <i>P. FLUORESCENS</i> MFAF76A.	144
FIGURE 35 : RÉCAPITULATIF DU STRESS D'ENVELOPPE INDUIT PAR LE NO ₂ ET PRINCIPAUX MÉCANISMES IMPLIQUÉS DANS LA STABILISATION DE L'ENVELOPPE.	164
FIGURE 36 : RÉCAPITULATIF DES STRATÉGIES PRÉVENTIVES ANTI-NOX/ROS CHEZ <i>P. AERUGINOSA</i> (ADAPTÉE DE (MISHRA AND IMLAY, 2012)).	167
FIGURE 37 : REPRÉSENTATION HYPOTHÉTIQUE DES MÉCANISMES MODULÉS EN RÉPONSE À UNE EXPOSITION AU NO ₂ CHEZ <i>P. FLUORESCENS</i> MFAF76A.	188

Tableaux

TABLEAU 1 : DISTRIBUTION ET PRINCIPALES CARACTÉRISTIQUES PHYSIOLOGIQUES DES NOS.	21
TABLEAU 2 : PRINCIPALES CARACTÉRISTIQUES DES EPS PRODUITS CHEZ <i>PSEUDOMONAS SP.</i>	69
TABLEAU 3 : COMPARAISON DES RÉGULONS RESPECTIFS D'OXYR ET DE SOXRS ET FUR, ET VOIES MÉTABOLIQUES ASSOCIÉES, À LA SUITE D'UN STRESS OXYDANT ET/OU NITROSANT, CHEZ <i>E.COLI</i> ET <i>P. AERUGINOSA</i> .	70
TABLEAU 4 : LES POMPES À EFFLUX RND CHEZ <i>P. AERUGINOSA</i> D'INTÉRÊTS CLINIQUES ET LA RÉPONSE AU STRESS	90
TABLEAU 5 : PROFILS BIOCHIMIQUES ET PHYSIOLOGIQUES DES SOUCHES <i>P. FLUORESCENS</i> MFAF76A (AÉROPORTÉE) ET MFN1032 (CLINIQUE) ADAPTÉ DE DUCLAIROIR-POC <i>ET AL.</i> , 2014	106
TABLEAU 6 : LISTE DES SOUCHES UTILISÉES.	110
TABLEAU 7 : LISTE DES PLASMIDES UTILISÉS	111
TABLEAU 8 : COMPOSITION DE LA SOLUTION TRACE CONSTITUANT LE DMB	112
TABLEAU 9 : PARAMÈTRES D'ACQUISITION UTILISÉ POUR LES DIFFÉRENTS MARQUEURS	114
TABLEAU 10 : PARAMÈTRES UTILISÉS SUR LE LOGICIEL CYTExpert	114
TABLEAU 11 : AMORCES DE RT-QPCR UTILISÉES POUR LA SOUCHE <i>P. FLUORESCENS</i> MFAF76A	118
TABLEAU 12 : LISTE DES AMORCES UTILISÉES POUR LA MUTAGÉNÈSE.	119
TABLEAU 13 : LISTE DES AMORCES UTILISÉES POUR LA COMPLÉMENTATION.	120
TABLEAU 14 : LISTE DES ENZYMES DE RESTRICTION ET CONDITIONS UTILISÉES	123

Introduction bibliographique

Chapitre I. Les oxydes d'azotes (NO_x) : des polluants atmosphériques aux allures menaçantes



I. La pollution atmosphérique : l'une des plus grosses menaces sanitaires et environnementales

1. Les principaux polluants atmosphériques

Les polluants atmosphériques peuvent être définis comme des composés, sous forme de gaz ou particules, abiotiques ou non, altérant considérablement la qualité de l'air (N_2/O_2 , 78% /21%) (Skalska *et al.*, 2010). Cette pollution peut avoir des conséquences sur la santé (humaine, faune), ainsi que des répercussions écologiques et matérielles. Ces effets dépendent notamment de la concentration des polluants dans l'atmosphère et/ou de la durée d'exposition. Parmi l'ensemble des polluants retrouvés dans l'atmosphère, ces derniers peuvent être classés selon trois critères : leur origine (génération primaire ou secondaire), leur état physique (gaz ou solide) et leur source (naturelle ou anthropogénique). Les polluants primaires (e.g. CO , SO_2 , NO/NO_2) sont directement émis à la source, tandis que les polluants secondaires (e.g. O_3 , HNO_3) sont formés à la suite d'une réaction chimique entre les différents polluants primaires (**Figure 1**).

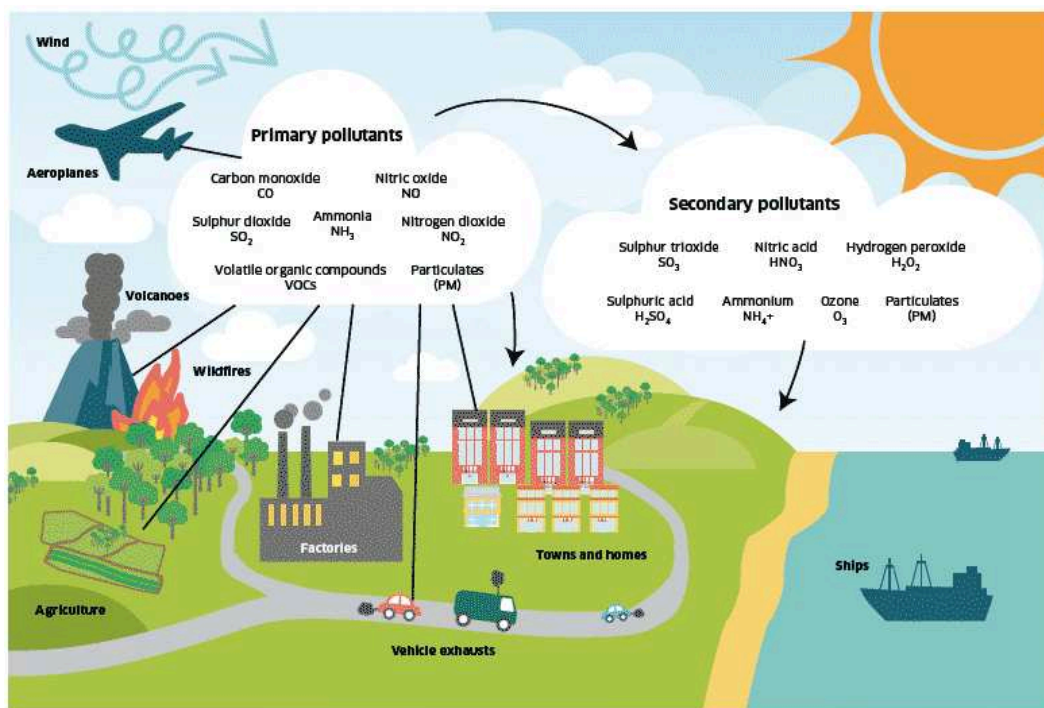


Figure 1 : Les principales sources de la pollution de l'air
(<https://beta.gov.scot/publications/cleaner-air-scotland-road-healthier-future/pages/6/>)

L'organisation mondiale de la santé (OMS) a préféré classer ces polluants en quatre grandes familles : les polluants classiques (plus abondants), organiques (hydrocarbonés), inorganiques (minéraux) et les polluants « d'intérieur » (WHO, 2000). Les polluants classiques sont continuellement mesurés en raison de leurs effets néfastes sur la santé. Ils regroupent le

dioxyde d'azote (NO₂), l'ozone (O₃), les particules fines de 2,5 à 10 µm (PM ; e.g. 10µm : poussière, pollen ; 2,5µm : composés organiques, métaux), les composés organiques volatiles (COV), ainsi que le dioxyde de soufre (SO₂) (Archibald *et al.*, 2017).

2. Quelques chiffres clefs

La pollution atmosphérique représente la plus grosse menace environnementale à l'échelle mondiale pour la santé. En effet, en 2016, près de 91% de la population mondiale est localisée dans des zones où les seuils de qualité de l'air sont dépassés. De plus, environ 7 millions de morts prématurés dans le monde ont été attribués à la pollution atmosphérique au cours de cette même année, dont 500 000 en Europe (OMS, 2018 ; <https://www.who.int/airpollution/ambient/en/>). En 2016, les pathologies associées à l'exposition aux polluants atmosphériques et conduisant à cette mortalité prématurée sont les cardiopathies ischémiques (34%), les pneumonies (21%), les accidents vasculaires cérébraux (AVC) (20%) les bronchopneumopathies chroniques obstructives (19%) et les cancers pulmonaires (7%) (OMS, 2018 ; <https://www.who.int/airpollution/ambient/en/>).

Les particules fines, notamment de 2,5 µm, ont été classées carcinogènes par le Centre International de Recherche sur le Cancer de l'OMS en 2013. Elles représentent l'une des plus grandes menaces avec 399 000 morts prématurés associés en Europe en 2014 contre 75 000 pour le NO₂ et 13 600 pour l'O₃ (European Environment Agency, 2018). Néanmoins les tendances actuelles démontrent une diminution du taux de mortalité associée à ces polluants excepté pour le NO₂ qui ne cesse d'augmenter (68 000 morts en 2013) (European Environment Agency, 2015).

II. Les oxydes d'azote: des composés préoccupants

1. Définition et sources de production

Le terme d'« oxydes d'azotes » (NO_x) regroupe l'ensemble des composés chimiques constitués d'atomes d'azote et d'oxygène. Différents états d'oxydation des NO_x, allant de N(-III) à N(+V), sont observés dans l'environnement (Depayras *et al.*, 2018). Les deux espèces majoritaires de cette famille sont le monoxyde d'azote (NO) et le dioxyde d'azote (NO₂) (Skalska *et al.*, 2010). D'après leur structure de Lewis, ces deux composés sont retrouvés sous la forme de radicaux libres notés respectivement *NO et *NO₂ (présence d'un électron non-apparié). Afin d'homogénéiser la suite du texte, ces deux radicaux seront nommés NO et NO₂.

Les oxydes d'azote émis dans l'atmosphère sont constitués à 90% de NO et à 10% de NO₂. Dans l'air, le NO₂ est retrouvé sous sa forme dimérique appelée peroxyde d'azote (N₂O₄)

(Fukuto *et al.*, 2000). Ces NO_x sont principalement issus de la combustion d'énergies fossiles (90%) suite aux activités anthropogéniques : (i) mobiles (transports) ou (ii) stationnaires (industries). Néanmoins une faible proportion des NO_x émis dans l'atmosphère peut également être d'origine naturelle (10%), telle que lors d'orages (Schumann and Huntrieser, 2007) ou d'éruptions volcaniques (Boichu *et al.*, 2011).

2. Principales réactions atmosphériques

Le monoxyde d'azote présente une forte réactivité avec les autres polluants atmosphériques. En effet, le NO est rapidement converti en NO_2 , par oxydation, notamment en présence d' O_3 (Figure 2).

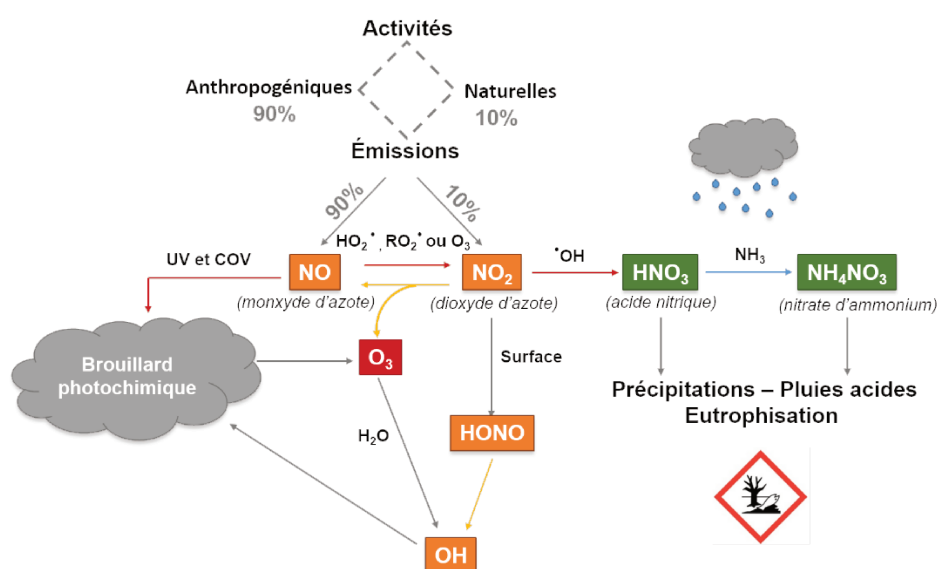


Figure 2 : Les NO_x dans l'atmosphère (adapté de (Graham *et al.*, 2010)).

UV : ultraviolets ; COV : composés organiques volatiles ; HO_2^* : hydroperoxyde ; RO_2^* : radicaux peroxyde ; O_3 : ozone ; $^*\text{OH}$: radicaux hydroxyles ; NH_3 : ammoniac

La réaction inverse est observée lors de la photolyse du NO_2 (flèches jaunes) (Stedman and Niki, 1973). Ainsi, un certain équilibre est maintenu entre les deux espèces chimiques. Néanmoins cet équilibre est perturbé par la présence d'autres polluants. Cela s'illustre notamment par la réaction d'oxydation du NO en présence de composés organiques volatiles (COV) ou stimulée par les UV (Goldstein and Rabani, 2007). Ces processus sont à l'origine de la génération d'un brouillard photochimique, où d'autres polluants secondaires, plus toxiques, sont formés (*e.g.* O_3) (Heicklen, 1987). Le NO_2 peut également s'oxyder en présence de radicaux hydroxyles ($^*\text{OH}$) ou d'eau pour former l'acide nitrique (HNO_3), mais également l'acide nitreux (HNO_2) (Singh and Agrawal, 2008). L'acide nitrique peut, à son tour, être réduit en présence d'ammoniac (NH_3) pour donner du nitrate d'ammonium (NH_4NO_3). Le HNO_3 et le NH_4NO_3 sont à l'origine de graves dommages au niveau de l'écosystème (Camargo and

Alonso, 2006). Il est possible de citer les phénomènes d'eutrophisation, voire d'acidification. Dans le pire des cas, des fuites de nitrate dans l'environnement peuvent être observées.

Parmi les NO_x, un autre composé est néfaste pour l'environnement. Il s'agit du protoxyde d'azote (N₂O) connu aussi sous le nom de gaz hilarant, et présentant des propriétés anesthésiantes (Radke and Fabian, 1991). Cependant le N₂O est déconnecté de cette biogénèse atmosphérique. En effet, le N₂O est majoritairement formé par les bactéries dénitrifiantes (cycle de l'azote) avant d'être relargué dans l'atmosphère (Torres *et al.*, 2016). Il peut être généré, dans de plus faibles proportions, lors de processus de réductions catalytiques. Au niveau atmosphérique, la toxicité ainsi que la prépondérance du N₂O le place à l'échelle du troisième plus important gaz à effet de serre. En effet, son fort pouvoir oxydant conduit à la déplétion de la couche d'ozone (Radke and Fabian, 1991). De plus, contrairement au NO et NO₂, le N₂O possède une longue durée de vie (100-150 ans) (Prather *et al.*, 2015).

Ainsi, la durée de vie du NO et du NO₂ est relativement courte (4 jours) dans l'air (Skalska *et al.*, 2010). Le NO est ensuite rapidement converti en NO₂. Par conséquent, la quantification des NO_x est principalement réalisée via la mesure de la concentration en NO₂ dans l'atmosphère. Les principales sources d'émission du NO₂ sont les secteurs du transport (45%), les industries et la production d'énergie (35%) suivis des commerces et ménages (14%) (Guerreiro *et al.*, 2017). L'ensemble de ces dérivés NO_x sont à l'origine de conséquences désastreuses au niveau écologique, mais également sanitaire (Camargo and Alonso, 2006; Latza *et al.*, 2009). Ainsi, il paraît donc essentiel de diminuer en priorité les émissions d'oxydes d'azote.

3. Les principaux NO_x à l'échelle du vivant

3.1. La biogénèse des NO_x et leur réactivité *in vivo*

Les NO_x et autres dérivés (RNS) sont retrouvés à l'échelle cellulaire, où ils jouent un rôle majeur dans la signalisation. En effet, le NO est généré de manière endogène suite à la conversion de la L-arginine en L-citruline sous l'action de l'enzyme NOS (Nitric oxide synthase) (**Figure 3**).

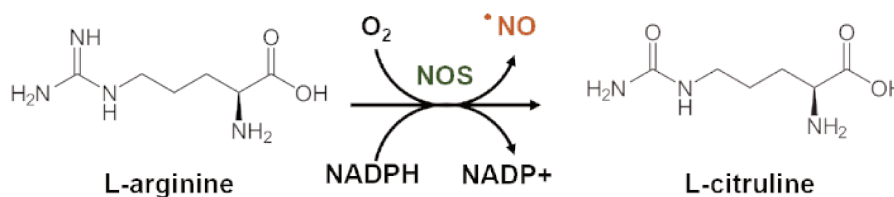


Figure 3 : Production endogène du monoxyde d'azote (NO) sous l'activité de l'oxyde nitrique synthase (NOS) *in vivo*.

Ce phénomène est hautement conservé au sein de divers règnes, soulignant ainsi l'implication et l'importance du NO dans de nombreux processus physiologiques. En 1998, le NO se voit attribuer le rôle de médiateur clef dans des cascades de signalisations intracellulaires par Furchgott, Ignarro et Murad, leur valant ainsi le prix Nobel de médecine (**Tableau 1**) (Ignarro and Murad, 1995).

Tableau 1 : Distribution et principales caractéristiques physiologiques des NOS.

Règne	Isoforme	Localisation	Fonction	Référence
Animal (dont l'Homme)	eNOS	Cytoplasme des cellules endothéliales	Relaxation musculaire	(Zhao <i>et al.</i> , 2015)
	iNOS	Cytoplasme des macrophages	Activité anti-bactérienne, -virale et -tumorale	(Lechner <i>et al.</i> , 2005)
	nNOS α	Cytoplasme des neurones post-synaptiques	Neurotransmission	(Mungrue and Bredt, 2004)
	nNOS μ	Cytoplasme des cellules cardiaques et des muscles squelettiques	Dilatation vasculaire et augmentation de la pression sanguine	
Végétal	NOS	cytosol	Croissance et développement Réponse à des facteurs (a)biotiques	(Frunghillo <i>et al.</i> , 2014; Gupta <i>et al.</i> , 2011)
Procaryote	bNOS	cytoplasme	Molécule signal (reprogrammation métabolique ?)	(Crane, 2008; Sudhamsu and Crane, 2009)

Chez l'Homme, le NO et ses produits réactionnels jouent un rôle de médiateurs notamment dans la neurotransmission, le système cardiovasculaire et respiratoire, la relaxation musculaire ainsi que la réponse inflammatoire à des concentrations physiologiques (Lechner *et al.*, 2005; Mungrue and Bredt, 2004). Le NO est un radical libre, neutre, hydrophobe et de petite taille. Ces différents paramètres lui confèrent une très forte capacité à diffuser au travers des membranes lui permettant d'agir à distance de son lieu de formation (100 μ m - 1mm) (Ignarro, 1990). Néanmoins le NO n'est ni un bon oxydant, ni un bon réducteur, et présente une faible réactivité avec des biomolécules (Radi, 1996). Ces caractéristiques expliquent la durée de vie de ce composé relativement longue *in vivo* (1-30s) (Ignarro, 1990). Ainsi, l'activité du NO est liée à sa réactivité avec de nombreux radicaux libres notamment l'anion superoxyde (O₂^{•-}), les radicaux hydroxyles ([•]OH) et le [•]NO₂ (**Figure 4**) ou encore les résidus tyrosyles (Tyr[•]), thiols (RS[•]), peroxydes (ROO[•]), et les complexes métalliques (hèmes) (**Partie II : Le stress nitrosant**).

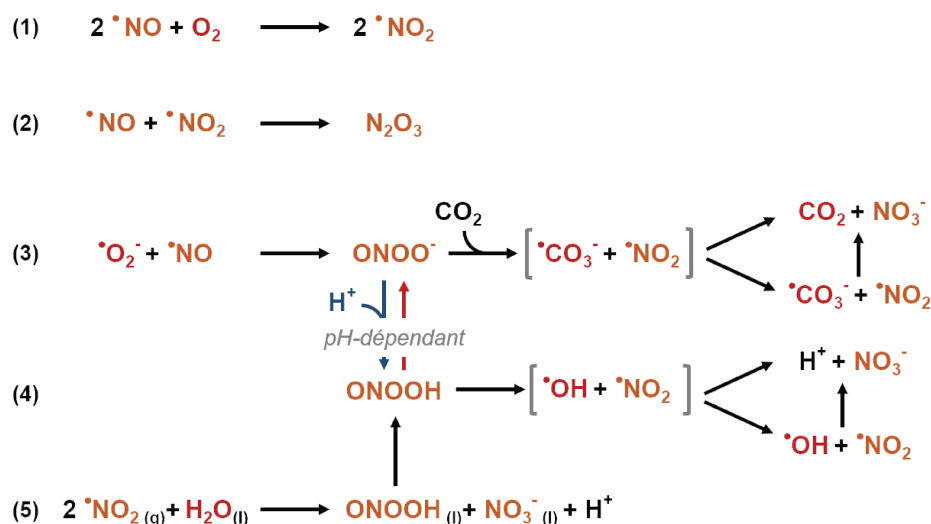


Figure 4 : Formation endogène des principaux dérivés NOx.

En rouge et en orange sont représentés respectivement les ROS et RNS.

Une première réaction d'auto-oxydation du $^{\bullet}\text{NO}$ a lieu en présence d'oxygène, générant ainsi du $^{\bullet}\text{NO}_2$ (1). Ce phénomène est nettement favorisé dans des environnements hydrophobes tels que les membranes biologiques (Hughes, 2008). Cela s'explique notamment par le caractère hydrophobe de ces deux espèces impliquant subséquentment leur plus forte concentration dans le compartiment membranaire (Moller *et al.*, 2005). Par la suite le $^{\bullet}\text{NO}_2$ formé peut réagir avec le $^{\bullet}\text{NO}$ pour former le trioxyde d'azote (N_2O_3), une espèce très instable et au fort pouvoir oxydant (2) (Bartesaghi and Radi, 2018). Enfin, une réaction d'oxydation entre l'anion superoxyde ($^{\bullet}\text{O}_2^-$) et le $^{\bullet}\text{NO}$ peut avoir lieu (3) (Blough and Zafiriou, 1985). Ce phénomène est favorisé également dans des compartiments hydrophobes, tels que les membranes biologiques (Liu *et al.*, 1998). Cette réaction conduit à la formation du peroxy-nitrite (ONOO^-), un puissant agent oxydant et nitrosant. Le peroxy-nitrite est également retrouvé *in vivo* sous sa forme réduite, l'acide peroxy-nitrique (ONOOH). L'équilibre entre ces deux espèces est pH dépendant (Molina *et al.*, 2013). L' ONOOH peut être également formé à partir du $^{\bullet}\text{NO}_2$ sous forme gazeuse en présence d'eau (e.g. compartiment cytoplasmique) générant également des nitrates (NO_3^-) (5) (Kinugawa *et al.*, 2011). Enfin, ces deux composés présentent une forte réactivité et conduisent à l'apparition de RNS additionnels impliqués dans ce stress (Radi, 1996, 2013; Radi *et al.*, 2000). *In vivo*, l' ONOO^- réagit majoritairement avec le CO_2 par addition nucléophile pour donner une espèce instable le nitroso-peroxycarbonate (ONOOCO_2) (Ferrer-Sueta and Radi, 2009). Cet intermédiaire réactionnel subit une décomposition homolytique rapide formant ainsi des radicaux libres $^{\bullet}\text{NO}_2$ et carbonate ($^{\bullet}\text{CO}_3^-$), ou par isomérisation, du nitrate (NO_3^-) et du CO_2 (3) (Denicola *et al.*, 1996; Radi *et al.*, 1998). Enfin, l' ONOOH subit une décomposition homolytique générant des radicaux $^{\bullet}\text{OH}$ et $^{\bullet}\text{NO}_2$, processus relativement lent *in vivo* (Carballal *et al.*, 2014), ou par isomérisation, à la formation

de nitrates (NO₃⁻) (4) (Mahoney, 1970). L'ONOO⁻, contrairement au NO, présente une durée de vie très courte (10ms-1s) liée à son fort pouvoir réactionnel (Radi, 2013). Néanmoins le peroxy-nitrite ne diffuse pas à travers les membranes biologiques suggérant ici que son activité est principalement localisée à son lieu de production (Möller *et al.*, 2008). Cependant, sa forme réduite (ONOOH) est capable de diffuser librement au travers des membranes (Szabó *et al.*, 2007), tout comme le NO₂ (Möller *et al.*, 2008).

Généralement les propriétés oxydantes et nitrosantes du NO s'avèrent moindres que celles de ces dérivés réactionnels (RNS), tels que le peroxy-nitrite (ONOO⁻), l'acide peroxy-nitrique (ONOOH) ainsi que le NO₂. Les principales cibles de ces composés sont les lipides, les protéines, les acides nucléiques et les sucres (Bartesaghi and Radi, 2018), décrites plus amplement dans la **Partie II - Stress nitrosant**. En effet, ces composés jouent un rôle important dans le développement de pathologies humaines (Depayras *et al.*, 2018).

3.2. Les NOx et la santé : des composés charnières entre physiologie et pathologie humaine

La forte réactivité de ces composés, ainsi que leur fort pouvoir oxydant et/ou nitrosant suggère leur implication dans l'altération chimique puis fonctionnelle de nombreuses molécules biologiques (**Partie II - Stress nitrosant**). Cependant, dans des conditions physiologiques, de nombreux systèmes vont limiter l'impact négatif de ces NOx (système de réparation, détoxification ou système « tampon ») et la génération d'autres RNS (SOD, GSH...). Néanmoins lors de concentration intracellulaire aberrante en NOx et RNS, ces composés peuvent être la cause de nombreuses pathologies (Depayras *et al.*, 2018). Deux phénomènes sont à l'origine de ce déséquilibre : (i) une exacerbation de leur production et/ou (ii) un apport excessif exogène (pollution atmosphérique). De manière surprenante, ce phénomène est largement exploité, conjointement à la production de ROS et à l'inter-réactivité entre ces deux familles, au sein des cellules macrophagiques. Ce processus est impliqué dans la lutte anti-virale, anti-tumorale ou anti-bactérienne (Lechner *et al.*, 2005). Les NOx jouent donc un rôle charnière dans la régulation de fonctions physio- ou pathologiques en fonction des concentrations produites ou exogènes. Ainsi, la double facette de ces composés a été illustrée dans ma revue intitulée : « The hidden face of Nitrogen oxides : from toxic effects to potential cure ? », ci-dessous.

The Hidden Face of Nitrogen Oxides Species: From Toxic Effects to Potential Cure?

Sékolène Depayras, Tatiana Kondakova,
Hermann Josef Heipieper, Marc GJ Feuilloley,
Nicole Orange and Cécile Duclairoir-Poc

Additional information is available at the end of the chapter

<http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.75822>

Abstract


Nitrogen oxide (NO_x) species represent ones of the most threatening air pollutants due to their prevalence and harmful impact on the environment and human health. The term NO_x gathers mainly nitric oxide (NO) and nitrogen dioxide (NO₂), mostly produced by anthropogenic activities such as transport and industries. Several cellular constituents were already described as NO_x targets. These include membranes, proteins, respiratory chain enzymes, lipids, and DNA. Such damages lead to pathologies of lungs, cardiovascular system, and skin because these organs represent the first barrier toward the environment. On the other hand, NO_x is also naturally synthesized by several organisms, playing a mediator role in essential cellular functions. However, few data are yet available on NO_x activity toward microorganisms. Here, we review data concerning the double face of NO_x, including their use in the medical field against pathogens' infections that highlight the versatility of these compounds.

Keywords: NO_x, pollutants, signalization, physiopathology, treatment

1. NO_x species: the genesis of a major air pollutant

"Yet, pollution is the largest environmental cause of disease and death in the world today, responsible for an estimated 9 million premature deaths" stated The Lancet Commission in 2017. This phenomenon represents an alarming threat for human health, as a major cause of respiratory and cardiovascular pathologies as well as infertility. Moreover, those atmospheric pollutants have severe impacts on the environment and participate in climatic change,

IntechOpen

© 2018 The Author(s). Licensee IntechOpen. This chapter is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited. 

20 Emerging Pollutants - Some Strategies for the Quality Preservation of Our Environment

acidification, eutrophication, and ecosystem disturbances. Several international and national organizations (e.g. WHO, EEA, and INERIS) aim at reducing the global emission of pollutants, thanks to environmental policies as Kyoto and Gothenburg protocols signed in 1997 and 1999, respectively. After that, an encouraging decrease in air pollutants' levels was measured between 2000 and 2015 [1].

Atmospheric pollutants can be classified into four families: classical, indoor, and organic or inorganic air pollutants. Among the classical ones, which are the principle in amount, sulfur dioxide (SO_2), particle matter, ozone (O_3), and nitrogen oxide (NO_x) species are found [2]. The term NO_x refers to a wide range of nitrogen-derived compounds, where nitric oxide (NO) and nitrogen dioxide (NO_2) are predominant [3]. Those compounds can be naturally produced at low level by lightnings [4] and volcanic eruptions [5]. However, NO_x is mainly generated by anthropogenic activity (e.g., road transport, energy production, industry, and agriculture) (Figure 1) [6].

Even if NO and NO_2 represent the main species of NO_x , nitrogen exists in several oxidation states in the environment, from N (-III) to N (+V). NO takes a central place in the series of reactive nitrogen species (RNS) [7]. Oxidation and reduction of NO result in the formation of several RNS, including nitrate or ammonium. NO_2 is formed by the reaction of NO with O_2 and can be dimerized to give N_2O_4 . The formed reactive species can, in turn, be involved in a wide range of reactions (Figure 2).

Nitrogen is an essential constituent of vital macromolecules (nucleic acids and proteins). This atom also constitutes the dinitrogen (N_2) gas, usually abbreviated nitrogen. This gas represents 78% of atmospheric air and is continuously recycled in our environment. First, the atmospheric nitrogen is fixed in the soil by prokaryotes to form ammonia (NH_3), which could be taken up by plants. NH_3 is then converted into ammonium (NH_4^+). Ammonium could be also

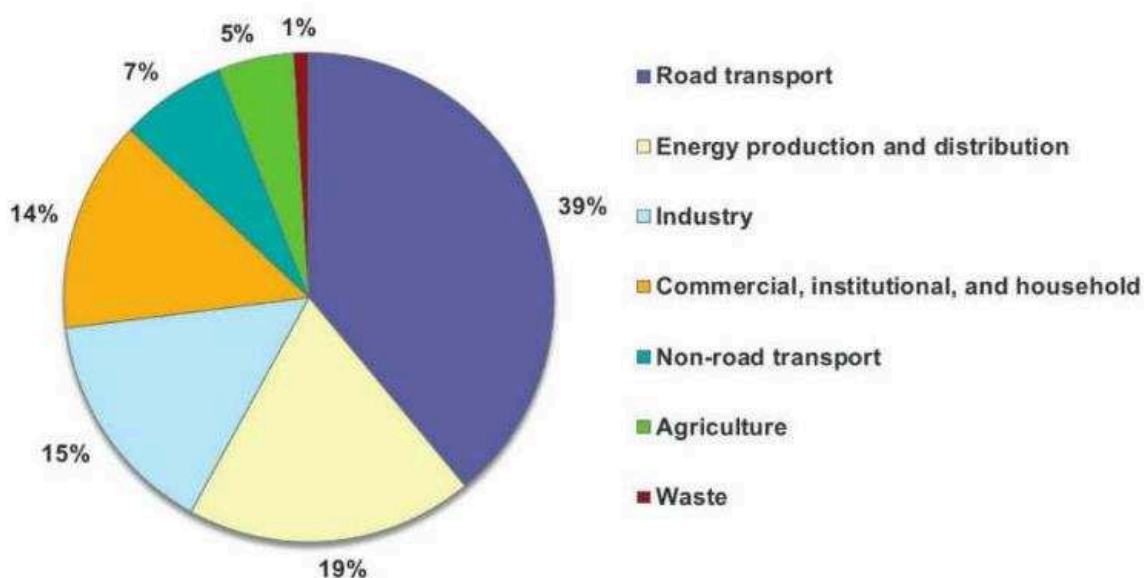


Figure 1. NO_x sources linked to anthropogenic activities (according to [1]).

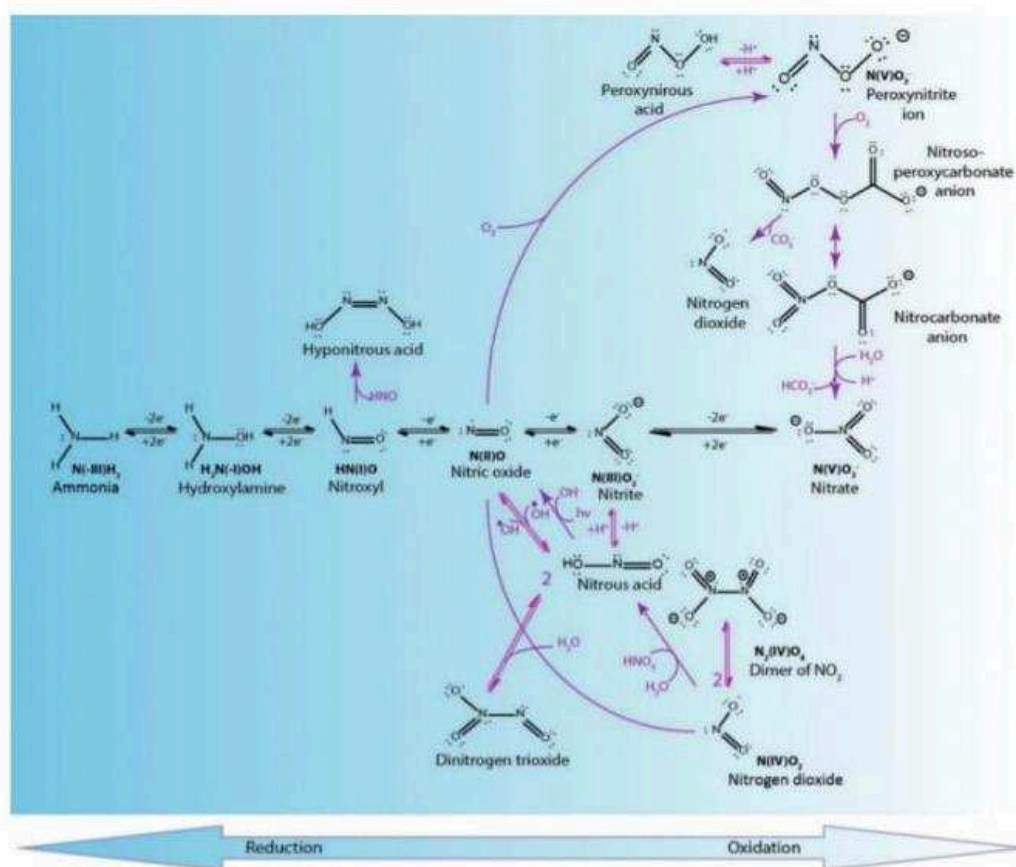


Figure 2. Redox relationships of NO_x with other RNS. Black arrow: oxidation and reduction of NO ; purple arrow: a wide range of reactions; roman numbers: oxidation state of the nitrogen atom; color gradient: reduction/oxidation state from (-III) to (V).

formed by mineralization of organic matter by decomposers (fungi, worms, and prokaryotes). The second part of the nitrogen cycle is the nitrification of ammonium by prokaryotes leading to nitrite (NO_2^-) formation, which is then further oxidized into nitrate (NO_3^-). Finally, nitrate could be assimilated by plants for their growth or converted into N_2 by denitrifying bacteria (Figure 3).

Moreover, nitrogen is also the precursor of NO_x . Indeed, NO_x formation can be separated into four steps. First, NO is formed in the atmosphere in combination with nitrogen, resulting from the global biogeochemical nitrogen cycle, and oxygen, following combustion (natural or anthropic). Then, this highly reactive compound can be oxidized by oxygen (O_2) to form NO_2 . Alternatively, nitrogen dioxide can also be directly formed through catalytic ammonia combustion or nitrosyl chloride oxidation. Then, a temperature-dependent equilibrium is establishing between NO_2 and its dimeric form, nitrogen tetroxide (N_2O_4). Finally, a photochemical reaction between NO_2 and hydroxyl radicals leads to the generation of ozone (O_3) (Figure 4).

Even if NO and NO_2 are classified as RNS, their characteristics are very different suggesting their diverse behavior and reactivity. For example, the solubility of NO is very low

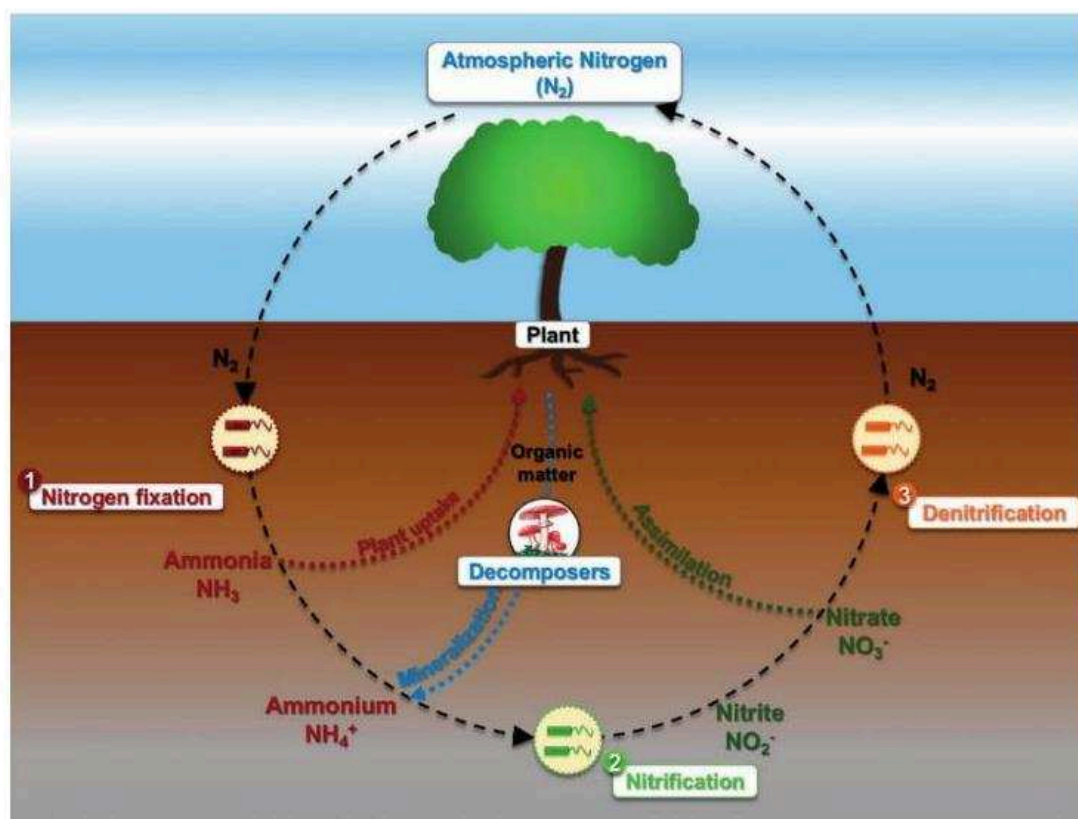


Figure 3. Nitrogen cycle at the interfaces among air, soil, and ecosystem. (1) Fixation of gaseous nitrogen by prokaryotes leading to ammonia (NH_3) and ammonium (NH_4^+); (2) nitrification of NH_4^+ by prokaryotes resulting in nitrite formation (NO_2^-) subsequently oxidized into nitrate (NO_3^-); (3) denitrifying prokaryotes catalyzing the conversion of nitrate into gaseous N_2 .

(5.7×10^2 g/L), and NO_2 is highly reactive in water resulting in the formation of HNO_2 and HNO_3 [8]. Moreover, the half-life time of those compounds highly differs because NO_2 half-life is around 35 h, whereas that of NO is almost impossible to determine because of its high reactivity [9]. The permeability of both compounds is also totally unrelated: NO has a lipophilic behavior with consequently a high-membrane permeability. This can be illustrated by the high-diffusion ability of NO toward the membrane. Conversely, the permeability coefficient of NO_2 is estimated about 5 cm s^{-1} suggesting a lower diffusion power toward biological membranes [10]. In spite of these differences, the penetration of NO and NO_2 inside cells and their high reactivity are at the origin of their pathogenic potential on human health, particularly when physiological elimination thresholds are exceeded. Since skin, respiratory tract, and lungs are the first barrier toward those gases, these organs are evidently the principle targets of these compounds and their derived species [11–13]. However, their diffusion deeper in the organism can lead afterward to other severe effects, for instance, on the cardiovascular and immune systems [12, 14]. Human health effects range from reversible (nausea, breathing difficulties, and asthma symptoms) to irreversible (cardiovascular defects, emphysema, and immunopathologies), including cancer induction in the worst cases (Figure 5) [15].

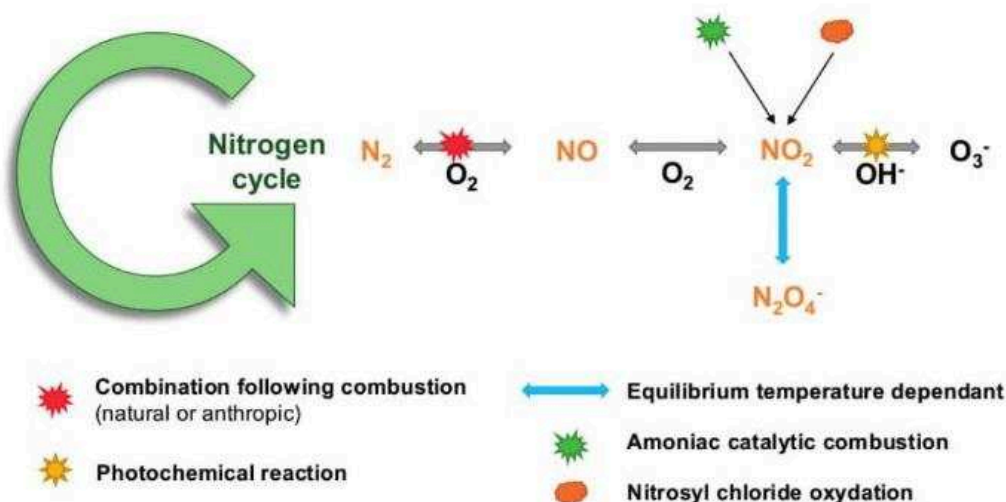


Figure 4. Atmospheric genesis of NO_x (adapted from [3]).

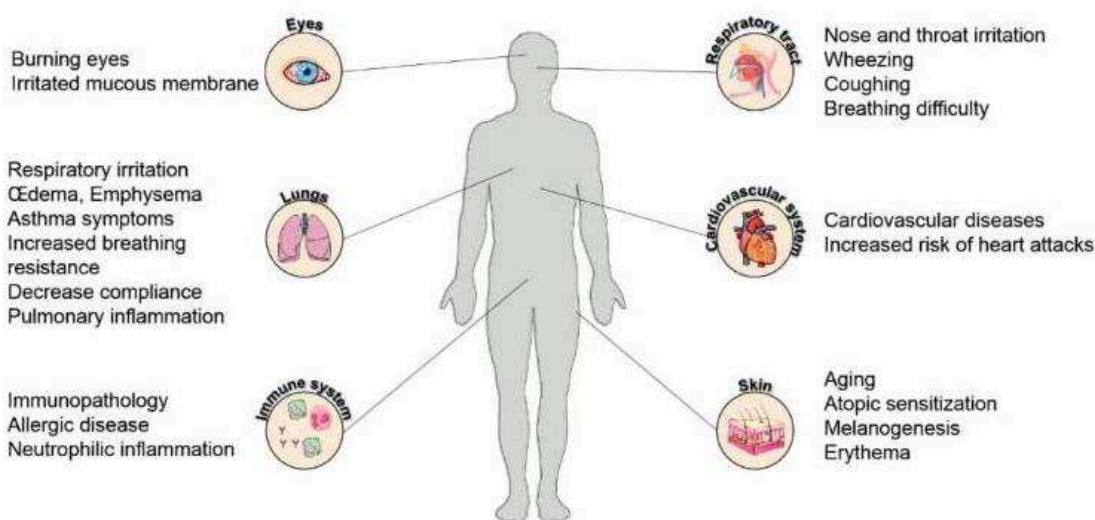


Figure 5. Representation of NO_x targets and associated pathologies [11–15].

Thanks to epidemiological and clinical studies, thresholds of NO and NO_2 , whose chemical structure and conversion factors are represented **Figure 6A**, have been determined for different human health effects (**Figure 6B** and **C**, respectively). However, no guideline values are available for NO (**Figure 6D**) due to its complete and rapid reaction [16]. Thus, in order to limit health issues, international organizations, such as WHO, set up guidelines for atmospheric NO_2 limit value (**Figure 6E**).

NO_x is then highly toxic compounds and has a myriad of deleterious impacts on the human physiology when the bearable thresholds are exceeded. However, NO_x is also naturally produced by cellular processes in a wide range of living organisms. In this case, NO_x can have totally different effects as discussed later.

Emerging Pollutants - Some Strategies for the Quality Preservation of Our Environment

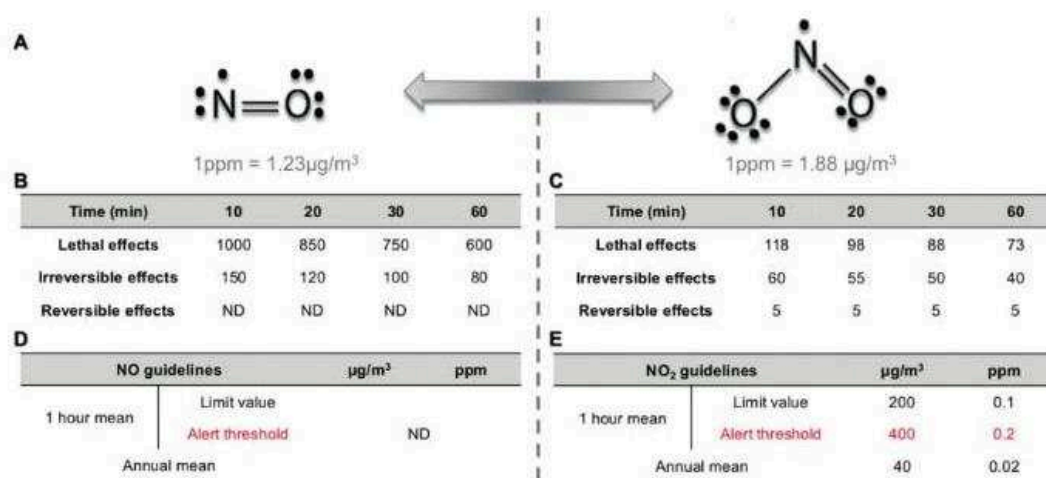


Figure 6. Key features concerning NOx. (A) Lewis structure of NOx and conversion factors; (B) NO threshold (ppm) according to [9]; (C) NO₂ threshold (ppm) according to [9]; (D) and (E) NO and NO₂ guideline values, respectively, according to [1]. ppm, parts per million; ND, not determined.

2. The double face of NOx in the eukaryotic world

To better understand why NOx impact on so many organs, it is essential to focus on the units forming each part of our body: the eukaryotic cells themselves.

2.1. Exogenous NOx: a hostile intruder inside the eukaryotic cells

Much work was already performed on NOx targets at the cell scale. NO and NO₂, thanks to their chemistry properties mentioned earlier, are highly diffusible through living membranes and exhibit a strong reactivity. It is easy to imagine the potential of such compounds. Since NO is highly reactive in lipophilic media, it can react inside the lipid bilayer, first protection of cells against the environment. Indeed, polyunsaturated fatty acids (PUFAs) are susceptible to NO in the presence of O₂ and ONOO⁻ [17]. The interaction of these toxic compounds with PUFA double bounds leads to the formation of nitrated FA. This process is considered as a protective strategy because it redirects O₂⁻ and ONOO⁻-mediated cytotoxic reactions to other oxidative pathways. Post-translational modification of several proteins is also observed in the presence of NOx and RNS. For example, tyrosine nitration on phenol residue mediated by peroxynitrite derived from OH and NO₂ leads to 3-nitrotyrosine formation [18]. This molecule represents a useful biomarker of nitrosative stress in various pathologies such as atherosclerosis [19]. Protein thiol residues are highly susceptible to NO and ONOO⁻ leading to the formation of nitrosothiol (RS-NO) and nitrothiol (RS-ONO), respectively [20]. This reversible modification modulates the activity of several proteins similar to phosphorylation. For example, S-nitrosylated cysteine thiol residue can be denitrosylated by S-nitrosoglutathione reductase or thioredoxin systems [21]. NO and other RNS can also nitrosylate [Fe-S] cluster of transition metal centers, which are essential for protein function. This modification can activate a wide range of enzymes such as the soluble guanylate cyclase (sGC) mentioned below

[22]. On the contrary, this reaction can also alter the protein function, for example, in the case of hemoglobin [23]. NO and other higher RNS products (ONOO⁻ or NO₂) are able to generate nitration, nitrosation, or deamination reactions on DNA bases leading to mutagenesis [24]. This phenomenon is enhanced by the inhibition of DNA repair triggered by NO [25]. More recently, a role of NO in epigenetic modification was suggested. To be more precise, this simple molecule seems to modulate histone acetylation and methylation through direct and indirect modulations of histone acetyltransferases and deacetylases, lysine demethylases, histone methyltransferases activity, thus modifying the expression of several genes [26]. These pleiotropic activities of NO and derived compounds highlight here the necessity of fine regulation pathways to prevent the development of several diseases.

2.2. Endogenous NO: an essential mediator of cellular signalization

Interestingly, NO can also be produced by several living organisms: plants, animals, and bacteria, thanks to a specific enzyme called nitric oxide synthase (NOS) [27, 28]. The large distribution of this enzyme through the different reigns emphasizes the importance of NO synthesis. Evolutionary studies highlight the necessity for the first living organisms during primitive era to eradicate toxic O₃ present in the paleoatmosphere as a survival strategy. Indeed, the liberation of gaseous NO in extracellular environment could have subsequently neutralized O₃, thus limiting harmful oxidative reactions [29]. In eukaryotic cells, three isoforms of NOS have been described [30]. The neuronal nNOS (NOS-1) and the endothelial eNOS (NOS-3) are constitutively expressed but are only activated through calcium-dependent mechanisms. The third one is the inducible iNOS (NOS-2) expressed in macrophages following infection by pathogens, virus, or tumors. Contrary to NOS-1 and 3, NOS-2 is constitutively functional. Interestingly, these NOSs have high structural similarities with an oxygenase and a reductase domain (Figure 7) [27].

To be fully functional, NOS requires to associate with homodimers, and this form of NOS is crucial for the generation of NO [32]. When conditions are favorable (high level of L-arginine

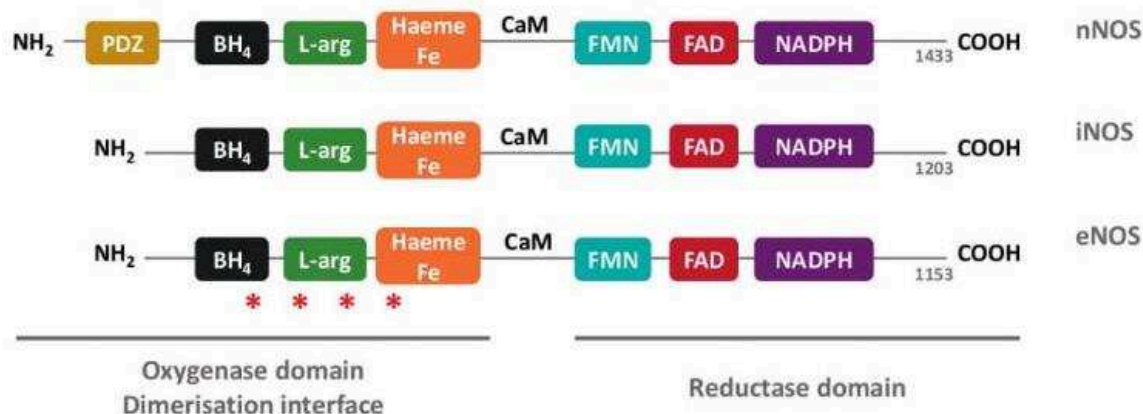


Figure 7. The structural similarities of NOS (adapted from [31]). BH₄, tetrahydrobiopterin; L-arg, L-arginine-binding site; Heme Fe, iron protoporphyrin IX; CaM, calmodulin-binding site; FMN, flavin mononucleotide-binding site; FAD, flavin adenine dinucleotide-binding site; NADPH, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-binding site; *, palmitoylation and myristoylation of eNOS oxygenase domain.

and cofactors like BH₄), this enzyme catalyzes the conversion of L-arginine into L-citrulline using O₂ and leading to NO formation with a ratio of 1:1 [33]. However, if these parameters are not available or if NOS remains monomeric, the enzyme only produces superoxide (O₂⁻) [32]. Even if NOS isoforms catalyze the same reaction, their distribution is largely related to their respective functions.

2.2.1. The endothelial eNOS and vasodilatation

Endothelial nitric oxide synthase (eNOS) can be activated through calcium-dependent and independent pathways. On the one hand, through activation of specific receptors, such as acetylcholine muscarinic receptors, bradykinin receptors, and H1 histamine receptors, distributed in the endothelial cell membrane, agonists can trigger an increase in intracellular concentration of calcium (Ca²⁺) through the well-known polyphosphoinositides pathway. Indeed, activation of those receptors stimulates membrane-associated PLC γ and PI3K activation. This results into inositol trisphosphate (IP3) formation, which induces the release of intracellular calcium stock from endoplasmic reticulum [34]. Then, Ca²⁺ binds to calmodulin (CaM), which could later fix on the calmodulin-binding domain of eNOS controlling its enzymatic activity. On the other hand, in response to hormones or growth factors acting on their corresponding receptors, phosphate kinase A (PKA) or B (AKT) pathway can be induced mediating a phosphorylation cascade. The post-translational phosphorylation of eNOS on three specific sites (Ser617 and Ser1179 for AKT, Ser635 and Ser1177 for PKA) enhances the activity of the enzyme [35]. Moreover, the lipidation of eNOS (palmitoylation and myristoylation) could also enhance its activity [36]. This other post-translational modification promotes eNOS association with cell membrane and is stabilized by interaction with membrane chaperone proteins (caveolin-1 and HSP70/90). Both mechanisms are essential for linking upstream signal transduction pathway to eNOS activity in cells [37]. eNOS could then produce a large amount of NO, which latter diffuses freely inside smooth muscles. Herein, NO activates soluble guanylate cyclase (sGC) by reaction with the heme of the enzyme leading to the increase of cyclic guanosine monophosphate level (cGMP). cGMP subsequently activates phosphate kinase G (PKG) favoring a cytosolic Ca²⁺ reuptake into sarcoplasmic reticulum [38]. The decrease of intracellular level of Ca²⁺ leads to the relaxation of smooth muscle. Moreover, NO can inhibit caspases 3 and 8 and thus apoptosis through protein nitrosylation. NO released by endothelium is also reducing platelet aggregation and platelet or leukocyte adhesion (**Figure 8**) [39, 40].

Another source of NO inside endothelial cells was also described. Indeed, nitrite and nitrate reservoirs could be converted into NO by several enzymes such as cytochrome P450, hemoglobin, myoglobin, and others, under specific conditions [42]. However, several pathways could abolish NO production. Indeed, NO can be eliminated in combination with reactive oxygen species (ROS). eNOS could be inactivated by several phosphatases. The removal of eNOS membrane sequestration by interaction between NOS-interacting protein (NOSIP) and NOS-traffic inducer (NOSTRIN) complex favors eNOS recycling [36]. Since NO plays a central role in this phenomenon, any abnormality altering its production leads to pathogenesis and vascular disorders such as atherosclerosis and hypertension [43].

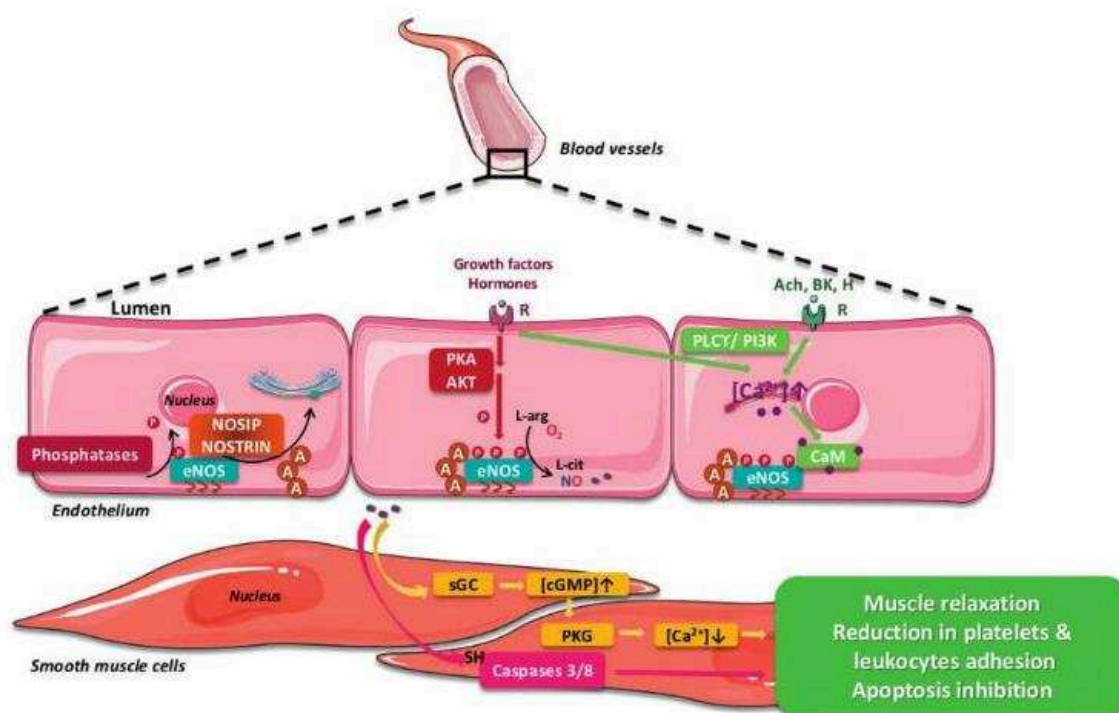


Figure 8. Physiology of vasodilatation: implication of eNOS and NO (adapted from [41]). eNOS, endothelial nitric oxide synthase; ach, acetylcholine; BK, bradykinin; H, histamine; R, receptor; CaM, calmodulin; PLCY, phospholipase C Y; PI3K, phosphoinositide 3-kinase; PKA, phosphate kinase A; AKT, phosphate kinase B (PKB); sGC, soluble guanylate cyclase; cGMP, cyclic guanosine monophosphate; PKG, phosphate kinase G; A, protein complex of HSP70, HSP90, and caveolin-1; NOSIP, NOS-interacting protein; NOSTRIN, NOS traffic inducer.

2.2.2. The neuronal nNOS: a crucial element in neurotransmission

nNOS, also called NOS-1, was the first isoform discovered in the neuronal tissue. It should be distinguished between two subfamilies: nNOS α and nNOS μ , thanks to their locations and functions. Indeed, nNOS α is found in central nervous system and plays a major role in the neurotransmission at neuronal synapses, whereas nNOS μ is found in skeletal and cardiac muscle where NO controls muscle contractility and local blood flow.

2.2.2.1. nNOS α in the central nervous system

Glutamate is the major excitatory neurotransmitter in the brain. When delivered into the synapse, this molecule is activating a specific receptor (NMDAR) located inside the postsynaptic membrane. Activated NMDAR thus allows the entry of calcium. Ca²⁺ are able to activate calmodulin by physical interaction [44]. Afterward calmodulin binds to nNOS α , which, in turn, is activated. Interestingly, nNOS α can indirectly interact with the NMDAR through its fixation on an adapter protein PSD95 by their PDZ interaction domain [45]. This allows the high speed of NO synthesis in response to NMDAR activation. Thereafter, NO can diffuse back to the presynaptic area leading to an increase in glutamate release in the synaptic cleft and thus neurotransmission. CAPON, a chaperon protein of DexRas, was found altering the level

of nNOS α present at the membrane [46]. Indeed, CAPON competes with the PDZ domain of nNOS α and thus promotes its detachment from the NMDAR-PSD95 complex. nNOS α interaction with CAPON-DexRas complex allows the activation of DexRas, a small protein G, through s-nitrosylation on its thiol residue [47]. Then, DexRas activates the MAPK cascade and the transcription of several genes [47]. Several shutdown systems are available to limit this process, which could dramatically affect the brain physiology by synapses hyperactivation. Indeed, kinases, such as PKC or PKII, can phosphorylate nNOS α leading to its loss of activity [48]. nNOS α can also be sequestered by two membrane proteins (caveolins 1 and 3) preventing its interaction with calmodulin (**Figure 9**).

As mentioned above, any disorder affecting NO synthesis can lead to dramatic consequences in the brain. Indeed, a lack of NO could impair the neurotransmission and hence the neuronal plasticity, such as long-term potentiation (LTP) in the hippocampus or long-term depression (LTD) in the cerebellum [50]. NO ensures also the correct irrigation of brain by its vasodilator effect on peripheral blood vessel. The synthesis of NO can be altered by a deficiency or a loss of activity of nNOS. Other regulatory elements, such as the decrease of L-arginine precursor availability or cofactors crucial for the catalytic activity of NOS, contribute also to nNOS inactivation. Conversely, in some several brain pathologies (ischemia, strokes, neurodegenerative disorders including Parkinson's and Huntington's diseases, and amyotrophic lateral sclerosis), a large amount of NO is produced [51]. It is hypothesized that NO or derived nitrogen species interact with various proteins inducing several toxic effects. Thus, pharmacological regulation of NO synthesis offers important strategies for the treatment of neurodegenerative and muscle diseases.

2.2.2.2. nNOS μ in peripheral neurotransmission

On the other hand, nNOS μ is located in skeletal and cardiac muscle where NO controls muscle contractility and local blood flow essential to support muscular effort. When the excitatory neurotransmitter acetylcholine (ACh) is released at the neuromuscular junction, it is activating specific acetylcholine nicotinic receptors present on muscle cells [52]. Activation of these receptors allows the release in the cell sarcoplasm of calcium from exogenous and/or endogenous

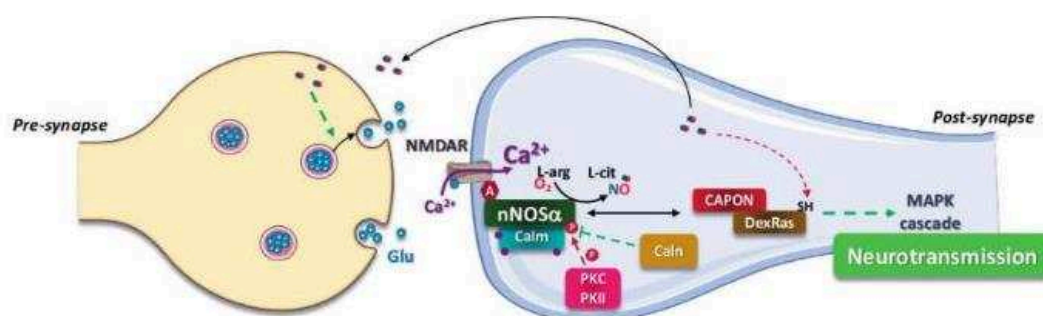


Figure 9. The neurotransmission mediated by NOS α in central nervous system (CNS) (adapted from [49]). Glu, glutamate neurotransmitter; NMDAR, N-methyl D-aspartate type-glutamate receptor; A, PSD95 protein adapter between nNOS α and NMDAR; CaM, calmodulin; PKC, phosphate kinase C; PKII, Ca²⁺/CaM-dependent protein kinase II; CaN, calcineurin; CAPON, C-terminal PDZ domain ligand of neuronal nitric oxide synthase; MAPK, mitogen-activated protein kinase.

sources. This process is also enhanced by the activation of a voltage-dependent Ca²⁺ channel (CaCn) [53]. The increase of Ca²⁺ from exogenous origin activates ryanodine receptor present on the sarcoplasmic reticulum, which, in turn, delivers a large amount of Ca²⁺. When the Ca²⁺ threshold is reached, it is binding on the calmodulin protein. Calmodulin can then interact with the nNOS_μ to activate the generation of NO. Interestingly, nNOS_μ interacts through its PDZ domain with adapter proteins (syntrophins) linked to a membrane protein complex called dystrophin [54]. Produced NO could then diffuse back to the motor neuron to enhance the liberation of neurotransmitters or the vasodilatation of blood vessels, thus increasing the local blood flow to support muscle needs during contraction efforts (**Figure 10**) [55].

NO synthesis is also well regulated by calpain (Calp). Indeed, this protein interacts with the PDZ domain nNOS_μ provoking its detachment from the dystrophin/syntrophin membrane complex [56]. Interestingly, in muscular Duchenne dystrophy, the damages caused by dystrophin absence are enhanced in case of simultaneous lack of nNOS_μ [57]. Thus, NO donors may offer a potential avenue for therapy.

2.2.3. The inducible iNOS and the innate immunity

NO also takes an important part in innate immunity. Indeed, NO and derived compounds are cytotoxic weapon against tumor cells, microorganisms, and viruses [58]. NO is generated by inducible nitric oxide synthases (iNOS and NOS2) within macrophages. However, more recently, studies have shown that this enzyme is also expressed in other cell line (vascular endothelial cells, hepatocytes, pulmonary, and colonic epithelial cells) [59]. Unlike nNOS or eNOS, its expression is stimulated by several pathways after activation of specific receptors by endotoxins (LPS) or cytokines (TNF α , IFN γ , and IL1 β). Briefly, the LPS endotoxins are carried by an LPS-binding (LPB) protein to its specific Toll-like receptor 4 (TLR4). Then, the transduction

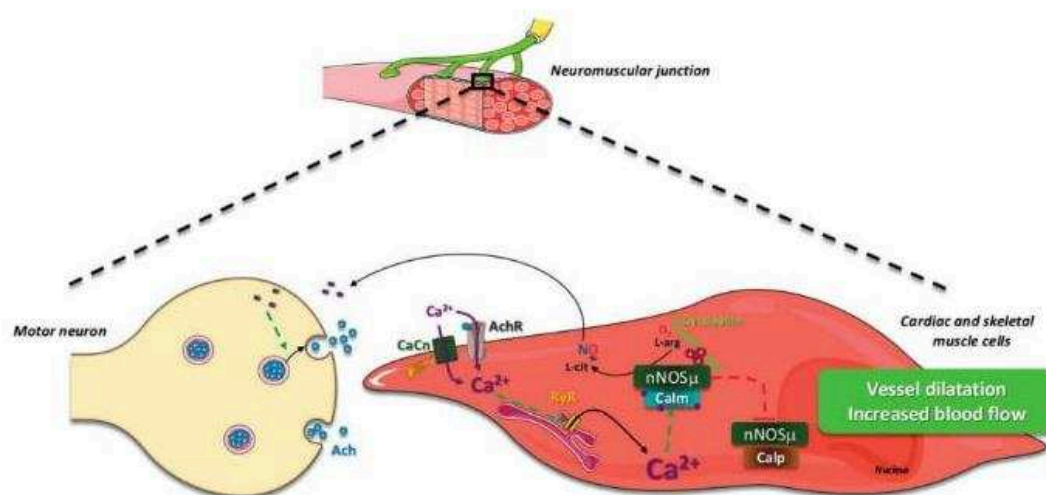


Figure 10. nNOS μ activity at the neuromuscular junction (adapted from [49]). Ach, acetylcholine; CaCn, voltage-dependent Ca²⁺ channel; AchR, acetylcholine receptor; yellow lightning symbols, membrane depolarization; Ca²⁺, calcium; RyR, ryanodine receptor; L-cit, L-citrulline; L-arg, L-arginine; CaM, calmodulin; A, syntrophin α 1, β 1 and β 2 adapter between dystrophin and nNOS μ ; Calp, calpain.

of the signal leads to the transcription of NF-κB [60]. This transcription factor is essential for the expression of *i*NOS gene. On the other hand, cytokines produced by infected cells activate pathways responsible for the expression of several transcription factors (NF-κB, AP1, and IRF1) also involved in the transcription of *i*NOS [61]. Both pathways are necessary to fully upregulate *i*NOS expression. Moreover, *i*NOS is constitutively active and exhibits a high affinity for calcium explaining its Ca²⁺-independent activity. *i*NOS produces a large amount of NO until substrate depletion [62]. Then, NO acts directly or through derived compounds (mostly ONOO⁻ and NO₂) generated through the reaction of NO with ROS formed by NADPH oxidase. These molecules can be generated inside (phagosome) or outside the cells. Altogether, NO and derivatives could act in synergy on several components within the targeted hostile elements such as proteins (thiols, metal centers, and tyrosine residues), nucleic acids, and lipids [63, 64]. Altogether, these modifications lead to irreversible damages impairing cellular metabolism and ultimately inhibit growth and replication mechanisms and even cell death (**Figure 11**).

After infection, NO generation is abolished by neutralization of *i*NOS activity. Indeed, *i*NOS undergoes a posttranslational modification called polyubiquitination leading to its proteasomal degradation. Physiological aggresome, an alternative pathway for protein degradation, is also involved in *i*NOS inactivation [66]. The degradation of NO can also be modulated by its own interaction with ROS. The depletion of L-arginine precursor also shuts down *i*NOS activity.

Overexpression of *i*NOS is observed during chronic infection leading to an excessive level of NO and RNS. This phenomenon can impair the host physiology because these high reactive compounds represent mutagenic sources. Thus, the NO balance is a crucial point to

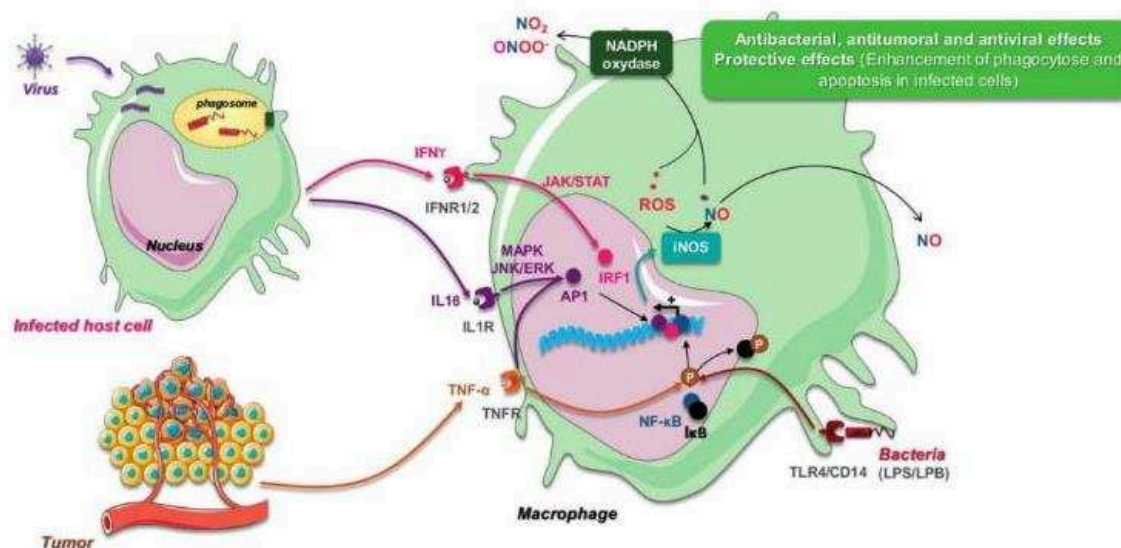


Figure 11. Implication of *i*NOS in the innate immunity (adapted from [65]). IFN γ , interferon γ ; IFNR1/2, IFN γ receptors 1 and 2; JAK, Janus kinase; STAT, signal transducer and activator of transcription; IRF1, interferon response factor 1; IL1 β , interleukin 1 β ; IL1R, IL1 β receptor; MAPK, mitogen-activated protein kinase; JNK, C-Jun N-terminal kinase; ERK, extracellular signal-regulated kinase; AP1, activator protein 1; TNF- α , tumor necrosis factor α ; TNFR, tumor necrosis factor receptor; NF- κ B, nuclear factor κ B; TLR4, Toll-like receptor 4; CD14, cluster of differentiation 14; LPS, lipopolysaccharide; LPB, LPS-binding protein; ROS, reactive oxygen species.

control in order to limit its tumorigenic potential. The development of iNOS inhibitors and NO-releasing agents offers interesting therapeutic strategies to struggle against cancer and microbial infections.

3. NOx versus prokaryote: "Catch me if you can"

3.1. NOx at the center of prokaryotic life, virulence, and death

Several environmental, commensal, and pathogenic prokaryotes possess an arsenal of proteins dedicated to the nitrogen metabolism under anaerobic conditions [67]. Indeed, an enzymatic chain is involved in the denitrification pathway responsible for the production of NO through nitrite reductase (NIR) as an intermediate. The outcome of this mechanism is the formation of dinitrogen (N_2). This process is crucial for the growth of bacteria in the absence of oxygen because it is coupled with ATP generation (Figure 12).

Interestingly, a shortened NOS-like protein called bNOS was discovered in Gram-positive bacteria [28]. This enzyme is deprived of the classical reductase domain already described in other NOS isoforms. However, bNOS is able to recruit other proteins exhibiting a reductase catalytic activity [69]. Similar to mammalian isoforms, bNOS catalyzes the production of NO using L-arginine precursor. However, NOx is key elements in the innate immunity to avoid infection. Indeed, similar to eukaryotic cells, prokaryotes are also sensitive to NOx activity. Thence, such compounds could alter DNA, proteins, and metal centers leading to severe alterations of bacterial growth and replication.

As previously described, NO could be endogenously produced by bacteria but is also a powerful exogenous antimicrobial agent. This highlights the requirement of systems to manage a bearable threshold of NOx within the cell. First, bacteria have developed NO sensing system

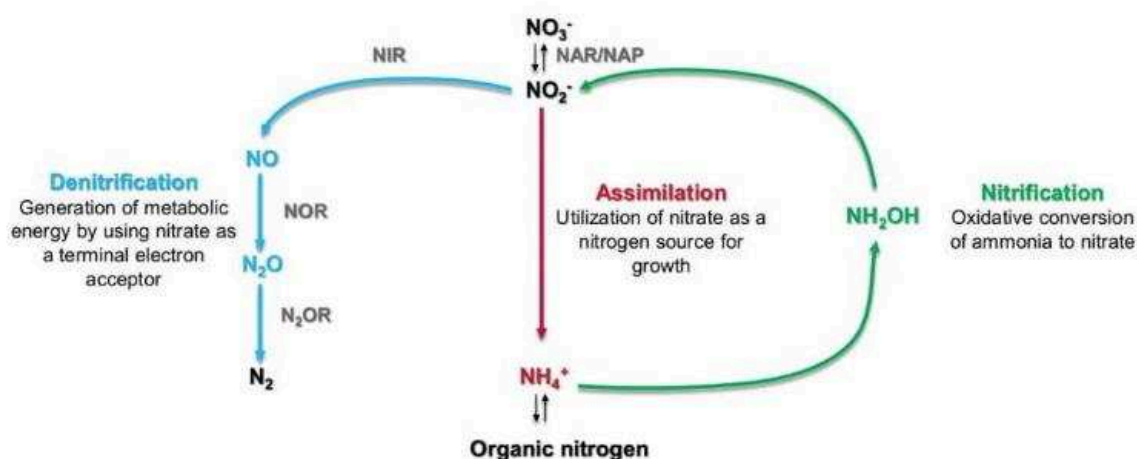


Figure 12. Bacterial nitrogen cycle (adapted from [68]). NO_3^- , nitrate; NO_2^- , nitrite; NO, nitric oxide; N_2O , nitrous oxide; N_2 , dinitrogen; NH_2OH , hydroxylamine; NH_4^+ , ammonia; NAR/NAP, nitrate reductase; NIR, nitrite reductase; NOR, nitric oxide reductase; N_2OR , nitrous oxide reductase.

through non-heme iron cluster conjugated with a wide range of detoxification mechanisms. Several pathways involving reaction of NO with non-heme iron cluster were described, mainly in *Escherichia coli* [70]. Indeed, NO can lead to a raise of the repression of sulfur assimilation operon (*suf*) exerted by ferric uptake regulator protein (Fur). This reaction is mediated by Fur nitrosylation through NO-derived S-nitrosoglutathione (GSNO). *Suf* products are required for the biogenesis of the [Fe-S] cluster, which, in turn, gives a lure to get rid of NO_x collateral damages. The flavohemoglobin (*hmpA*) is another response against the nitrosative stress. This enzyme catalyzes the conversion of NO into nitrous oxide (N₂O) under anaerobic conditions. Interestingly, in the presence of NO, the S-nitrosylation of cysteine residues on MetR and FNR inactivates both the proteins. Thus, the repression exerted by MetR and the fumarate and nitrate reductase regulatory protein (FNR) is raised by *hmpA* allowing its transcription. Furthermore, NO-responsive transcriptional factor (NorR) is directly activated by NO and enhances the expression of NorVW protein catalyzing the reduction of NO into N₂O. Redox-sensitive cysteines also take part in the NO-sensing systems. Indeed, NO-activated superoxide regulon (SoxR) protein leads to the transcription increase of superoxide dismutase (*sodA*) removing O₂⁻ that may react with NO to form NO₂ and ONOO⁻ [71]. Similar to SoxR, peroxide regulon (OxyR) protein is activated by S-nitrosylation. This protein induces gene expression for protective products against nitrosative stress at least by limiting the S-nitrosylation [72]. For example, the expression of catalase *KatA*, which could buffer free NO, is activated by OxyR [73]. Altogether, these sensing systems lead to the efficient detoxification by generation of less toxic compounds or scavenger molecules.

Moreover, bacteria also develop repairing system of DNA and [Fe-S] cluster damages related to nitrosative stress. Similar to eukaryotic cells, five DNA repair pathways are available in prokaryotes. Among them, the base excision repair (BER), to repair deaminated base, and the nucleotide excision repair (NER), to remove cross-linking in DNA, are predominant [74]. Concerning the [Fe-S] cluster repair, the iron sulfur cluster S protein (IscS), a cysteine desulfurase, can denitrosylate these protein clusters in the presence of L-cysteine [75]. Moreover, Isc regulator (IscR) protein is able to sense nitrosylated [Fe-S] cluster and thus enhances the formation and/or repair of [Fe-S] cluster [76, 77].

NO could also alter tricarboxylic acid (TCA) metabolic pathway and bacterial respiration through reaction with aconitase and cytochromes of the electron transfer chain, respectively [78]. However, these mechanisms are crucial for the generation of ATP and hence the energetic needs of bacteria [79]. To counteract the inefficiency of this enzyme, some bacteria are able to reprogram their metabolism. For example, *Pseudomonas* spp. uses the citrate lyase, phosphoenolpyruvate carboxylase, and pyruvate phosphate dikinase to convert citrate into pyruvate and ATP [80].

In nonlethal concentrations, NO interplays a signaling role in bacteria through several proteins possessing heme-nitric oxide/oxygen-binding domain and is referred under the name H-NOX proteins. H-NOX exhibits a highly conserved domain among bacteria and also shared in mammals (sGC) [81]. All H-NOX are histidine-ligated protoporphyrin IX hemoprotein able to fix NO on its ferrous iron. The H-NOX-encoding genes are found in operons with diverse bacterial signaling genes [82], whose majority is now divided in two classes: containing (i) histidine

kinase (HK) or (ii) diguanylate cyclase (DGCs) and phosphodiesterase (PDE). H-NOX could modify the function of proteins implicated in virulence such as biofilm formation and motility or even *quorum sensing* [83]. For example, H-NOX alters the function of diguanylate cyclase and enhances the phosphodiesterase activity. Altogether, this leads to the biofilm dispersion through the decrease of c-di-GMP, an essential mediator in this process. On the contrary, a more sophisticated system relative to histidine kinase (HnoK) activity leads to the accumulation of c-di-GMP in response to NO favoring the biofilm adhesion and formation. Another important virulence trait could be also modulated by H-NOX as in *Vibrio* species a cross-talk with QS seems to exist. However, a few studies are yet available.

More recently, an antibiotic resistance modulation was promoted by a bacterial NO₂ gaseous exposure. Indeed, an upregulation in expression of MexEF-OprN efflux pump was observed coupled with an increase in related antibiotic resistance [84]. The link between NO₂ and this efflux pump is yet not established, but the authors suggest here a potential role of this protein in the releasing of NOx outside the cells. Previous studies also highlight a correlation between NO endogenously generated by bNOS and increase aminoglycoside resistance [85]. NO and NO₂ could directly interact with antibiotic leading to a less toxic compound and exerted a repression of bacterial respiration preventing drug uptake.

To resume, bacteria are able to produce NO and RNS. Following endogenous burst or exogenous aggression (pollution, inflammation reactions), a physiological threshold is exceeded. However, bacteria developed an ingenious system to counteract the potential effects of NO and derived products. Various interconnected signaling pathways are implicated in this phenomenon: (i) NO detection, (ii) detoxification, (iii) repairing mechanisms, and (iv) metabolic reprogramming. Finally, these fundamental modifications modulate bacterial community behavior (QS) and virulence traits, such as biofilm and antibiotic resistance. This last point is particularly attractive in medicine. Indeed, the emergence of several antibiotic multiresistant pathogens represents a big threat for human that brings us to the last question of this review: "Does NOx therapy represent the new trends in human health care?"

3.2. The novel therapeutic strategies mediated by NOx

A lot of therapeutic strategies exploiting NOx-mediated pathways has recently emerged, particularly to treat cancer. Here we propose to classify them in three families: (i) NO-donor compounds, materials, or nanoparticles; (ii) modulators of NOS activity; and (iii) last but not least, generators of gaseous NO.

The first family NO donors consist of NO-chelating compounds that can release NO under specific conditions within the organism after administration. As shown below, several NO donors have been developed during the last decade. Their global—direct or not—anticancer effects have been exploited in the case of various carcinoma (**Table 1**).

For further information, we strongly recommend to read the review of Huang et al. [86]. Another extension of the use of NO-donor compounds is their graft on material and nanoparticles. Indeed, prosthetic biomaterials used in medical devices were modified through covalent or noncovalent binding of two NO donors (diazeniumdiolates and S-nitrosothiols).

34 Emerging Pollutants - Some Strategies for the Quality Preservation of Our Environment

NO-donor classes	Representative molecule	NO-release pathway	Physiological impact
Organic nitrates	Glyceril trinitrate (GTN)	Enzymatic biotransformation needed	Anticancer activity
Diazeniumdiolates	NONOates	Spontaneous and selective	Antiproliferative activity
Metal nitrosyl complexes	Sodium nitroprusside (SNP)	Spontaneous	Invasion suppression Radiosensitization
1,2,5-oxadiazole N-oxides	Furoxans	Thiol-dependant	Neuroprotective
S-nitrosothiols	S-nitroso-N-acetylpenicillamine (SNAP)	Metal ions- or superoxide-dependant	Therapeutic potential in cancers
Sydnominine	3 morpholinosydnominine (SIN1)	pH-dependant	Therapeutic potential in cancers

Table 1. The different classes of NO donor (adapted from [86]).

Several clinical trials have shown their usefulness in the context of preventing thrombus formation [87]. NO-donating nanoparticle systems represent a new promising tumoricidal agents, thanks to their unique properties: (i) strengthening NO-donor stability, (ii) loading a large amount of NO, and (iii) possibility to trigger NO releasing [88].

The modulation of NOS activity is another interesting strategy. In some pathologies inducing exacerbating inflammation (sepsis), a localized “nitrosative burst” occurs, and inhibition of NOS function is a crucial element. Thus, several L-arginine precursor analogs (N^ω-substituted L-arginine) were developed and tested. However, since L-arginine is the common point between all NOS isoforms, these analogs represent nonselective drugs. Moreover, such therapy did not reach clinical studies on human stage despite its effects on canine vascular tone [89]. Thus, investigation on a more selective inhibition of iNOS, crucial for inflammation, was conducted through transgenic animals. Unfortunately, iNOS knockout mice exhibit an increase in mortality following polymicrobial sepsis [90]. More recently, researcher focused on increasing NO delivery within cancers. Thus, thanks to technical progress and scientific knowledge updating, iNOS-based suicide gene therapy was investigated through viral vector use. This treatment exhibits promising tumoricidal effects and appears interesting for its specific and localized iNOS expression on animal models [91].

The third strategy is the direct gaseous delivery of NO in the treatment of various infection diseases related to antibiotic resistant bacteria. Ghaffari et al. provided a considerable work on this topic. First, they developed an ingenious delivery system usefulness for the monitoring of gNO effects on microorganisms (bacteria and fungi) and eukaryotic cells [92]. Then, they reported an effective concentration of gNO up to 200 ppm in continuous 4 h delivery exhibiting bacteriostatic effects on a representative group of microorganisms (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli*, *Candida albicans*, and *Group B Streptococcus*). Moreover, no toxic effects were observed on representative mammalian cell lines (dermal fibroblasts) of wound-healing pathology such as leg ulcer or burn injuries [93]. Thus, these promising results placed gNO as a potential topical antibiotic agent [94]. Later, they also investigated the potential use of inhaled gNO in the treatment of pathogenic infection in the case of cystic fibrosis. Indeed, this pathology is a threatening pulmonary disease where microbial infection could be lethal. However, a continuous exposure of gNO at such concentration can lead to severe

impact on the human health, particularly through methemoglobinemia. This phenomenon occurs when hemoglobin loses its vital function of oxygen carrier following the saturation of its iron heme with NO. Thus, an intermittent high-dose short-duration exposure was tested to determine the dose/duration most effective treatment. An adapted lung mammalian model was also used (macrophages and monocytes and pulmonary epithelial cells) to appreciate the potential effects of this cure on human health [95]. This study reached phase I clinical studies using a promising NO treatment at 160 ppm for 30 min three times daily for two periods of 5 days [96]. However, as reviewed by Petit et al., it is important to keep in mind that “administration of inhaled NO is associated with and unavoidable codelivery of NO₂,” thanks to the spontaneous high reactivity of NO with O₂ [97]. They also reported that the higher NO doses are used, the faster is the formation rate of NO₂. In contrast, a direct gaseous NO₂ exposure could also be benefit in the struggle against undesirable microorganism because it seems to impact their metabolism, social behavior, and growth [84]. Moreover, a continuous high-dose NO₂ exposure seems to lead in membrane alteration through an increased permeability [98].

4. Conclusion

In summary, this review of the literature shows that NO_x is ubiquitous and essential in our lives. We are exposed to these compounds through environmental contaminations, but they also result from physiological processes, infections, diseases, or even drugs. NO and derivatives are implicated in a large diversity of vital functions including brain functions; motricity; cardiac, vascular, and pulmonary functions; and immunity. For these reasons, NO_x is key molecules of major biochemical interest. As all active substances, NO_x can exert both beneficial and adverse effects with regard to the exposition dose. The physiological adaptation to NO_x results from a fine-tuned equilibrium where detoxification plays crucial roles. Myriad of finely regulated processes has emerged in response to nitrosative stress. Our knowledge still remains incomplete, and future studies are necessary to finely precise the synergy of each NO_x implemented in nitrosative stress, especially when they are presented in gaseous phase that remains less explored. However, in spite of all previously described mechanisms to counteract the nitrosative stress, abnormal NO_x thresholds could trigger a wide range of pathologies and even death. These antagonists, positive and negative effects, of NO_x are actually intriguing. So, many researches are now focusing on NO_x producing pathways to find the most effective treatments and drugs. More investigations are still needed to better understand the real potential of NO_x as antitumor, antibacterial agents, and their safe clinical use.

Acknowledgements

We thank Dr. Annabelle Merieau, Djouhar Souak, and Kévin Guérin for their constructive comments. LMSM is supported by grants from Evreux Portes de Normandie, Région Normandie, French research ministry, and European Union (FEDER). S. Depayras is a recipient of a PhD grant from Région Normandie.

Conflict of interest

We have no conflict of interest to declare.

Author details

Ségolène Depayras¹, Tatiana Kondakova², Hermann Josef Heipieper³, Marc GJ Feuilloley¹, Nicole Orange¹ and Cécile Duclairoir-Poc^{1*}

*Address all correspondence to: cecile.poc@univ-rouen.fr

¹ Laboratory of Microbiology Signals and Microenvironment, LMSM EA 4312, University of Rouen, Normandy, France

² Department of Microbiology, University of Illinois at Urbana-Champaign, Urbana, IL, United States

³ Department Environmental Biotechnology, Helmholtz Centre for Environmental Research— UFZ, Leipzig, Germany

References

1. Guerreiro, C., González Ortiz, A. & Frank de Leeuw. *Air quality in europe - 2017 report*. (2017). at <https://www.eea.europa.eu/publications/air-quality-in-europe-2017>
2. WHO (Europe) - *Guidelines for indoor air quality*. (2010).
3. Skalska, K., Müller, J. S. & Ledakowicz, S. Trends in NOx abatement. A review. *Sci. Total Environ.* **408**, 3976–3989 (2010).
4. Schumann, U. & Huntrieser, H. The global lightning-induced nitrogen oxides source. *Atmos. Chem. Phys. Discuss.* **7**, 2623–2818 (2007).
5. Huebert, B. *et al.* Volcano fixes nitrogen into plant-available forms. *Biogeochemistry* **47**, 111–118 (1999).
6. Signorelli, S., Möller, M. N., Coitinho, E. L. & Denicola, A. Nitrogen dioxide solubility and permeation in lipid membranes. *Arch. Biochem. Biophys.* **512**, 190–196 (2011).
7. Latza, U., Gerdes, S. & Baur, X. Effects of nitrogen dioxide on human health: Systematic review of experimental and epidemiological studies conducted between 2002 and 2006. *Int. J. Hyg. Environ. Health* **212**, 271–287 (2009).
8. Chang, A. L. S. Expanding Our Understanding of Human Skin Aging. *J. Invest. Dermatol.* **136**, 897–899 (2016).
9. Hanrahan, P. L. The Plume Volume Molar Ratio Method for Determining NO₂/NO_x Ratios in Modeling—Part II: Evaluation Studies. *J. Air Waste Manage. Assoc.* **49**, 1332–1338 (1999).
10. Augusto, O. *et al.* Nitrogen dioxide and carbonate radical anion: Two emerging radicals in biology. *Free Radic. Biol. Med.* **32**, 841–859 (2002).
11. Souza, J. M., Peluffo, G. & Radi, R. Protein tyrosine nitration—Functional alteration or just a biomarker? *Free Radic. Biol. Med.* **45**, 357–366 (2008).
12. Thomson, L. 3-Nitrotyrosine Modified Proteins in Atherosclerosis. *Dis. Markers* **2015**, (2015).
13. Brandes, N., Schmitt, S. & Jakob, U. Thiol-Based Redox Switches in Eukaryotic Proteins. *Antioxid. Redox Signal.* **11**, 997–1014 (2009).
14. Benhar, M., Forrester, M. T. & Stamler, J. S. Protein denitrosylation: Enzymatic mechanisms and cellular functions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **10**, 721–732 (2009).
15. Beuve, A. Thiol-Based Redox Modulation of Soluble Guanylyl Cyclase, the Nitric Oxide Receptor. *Antioxid. Redox Signal.* **26**, 137–149 (2017).
16. Angelo, M., Singel, D. J. & Stamler, J. S. An S-nitrosothiol (SNO) synthase function of hemoglobin that utilizes nitrite as a substrate. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**, 8366–8371 (2006).
17. Wiseman, H. & Halliwell, B. Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. *Biochem. J.* **313** (Pt 1), 17–29 (1996).
18. Socco, S., Bovee, R. C., Palczewski, M. B., Hickok, J. R. & Thomas, D. D. Epigenetics: The third pillar of nitric oxide signaling. *Pharmacol. Res.* **121**, 52–58 (2017).
19. Feelisch, M. & Marín, J. F. The early role of nitric oxide in evolution. *Trends Ecol. Evol.* **10**, 496–499 (1995).
20. Bruckdorfer, R. The basics about nitric oxide. *Mol. Aspects Med.* **26**, 3–31 (2005).
21. Lechner, M., Lirk, P. & Riederer, J. Inducible nitric oxide synthase (iNOS) in tumor biology: The two sides of the same coin. *Semin. Cancer Biol.* **15**, 277–289 (2005).
22. Watmough, N. J. *et al.* Nitric oxide in bacteria: synthesis and consumption. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* **1411**, 456–474 (1999).
23. Crane, B. R. The enzymology of nitric oxide in bacterial pathogenesis and resistance. *Biochem. Soc. Trans.* **36**, 1149–54 (2008).
24. Spiro, S. Nitric oxide-sensing mechanisms in *Escherichia coli*: Scheme 1. *Biochem. Soc. Trans.* **34**, 200–202 (2006).
25. Seth, D., Hausladen, A., Wang, Y.-J. & Stamler, J. S. Endogenous Protein S-Nitrosylation in *E. coli*: Regulation by OxyR. *Science* (80-.). **336**, 470–473 (2012).
26. Heo, Y. J. *et al.* The major catalase gene (katA) of *Pseudomonas aeruginosa* PA14 is under both positive and negative control of the global transactivator OxyR in response to hydrogen peroxide. *J. Bacteriol.* **192**, 381–390 (2010).
27. van der Veen, S. & Tang, C. M. The BER necessities: the repair of DNA damage in human-adapted bacterial pathogens. *Nat. Rev. Microbiol.* **13**, 83–94 (2015).
28. Djaman, O., Outten, F. W. & Imlay, J. A. Repair of oxidized iron-sulfur clusters in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **279**, 44590–44599 (2004).
29. Rogers, P. A. & Ding, H. L-Cysteine-mediated Destabilization of Dinitrosyl Iron Complexes in Proteins. *J. Biol. Chem.* **276**, 30980–30986 (2001).
30. Schwartz, C. J. *et al.* IscR, an Fe-S cluster-containing transcription factor, represses expression of *Escherichia coli* genes encoding Fe-S cluster assembly proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**, 14895–14900 (2001).
31. Husain, M. *et al.* Nitric oxide evokes an adaptive response to oxidative

- stress by arresting respiration. *J. Biol. Chem.* **283**, 7682–7689 (2008).
32. Appanna, V. P., Auger, C., Thomas, S. C. & Omri, A. Fumarate metabolism and ATP production in *Pseudomonas fluorescens* exposed to nitrosative stress. *Antonie van Leeuwenhoek, Int. J. Gen. Mol. Microbiol.* **106**, 431–438 (2014).
33. Auger, C. & Appanna, V. D. A novel ATP-generating machinery to counter nitrosative stress is mediated by substrate-level phosphorylation. *Biochim. Biophys. Acta* **1850**, 43–50 (2015).
34. Plate, L. & Marletta, M. A. Nitric oxide-sensing H-NOX proteins govern bacterial communal behavior. *Trends Biochem. Sci.* **38**, 566–575 (2013).
35. Nisbett, L. M. & Boon, E. M. Nitric Oxide Regulation of H-NOX Signaling Pathways in Bacteria. *Biochemistry* **55**, 4873–4884 (2016).
36. Kondakova, T. *et al.* Response to gaseous NO₂ air pollutant of *P. fluorescens* airborne strain MFAF76a and clinical strain MFN1032. *Front. Microbiol.* **7**, (2016).
37. McCollister, B. D., Hoffman, M., Husain, M. & Vázquez-Torres, A. Nitric oxide protects bacteria from aminoglycosides by blocking the energy-dependent phases of drug uptake. *Antimicrob. Agents Chemother.* **55**, 2189–2196 (2011).
38. Huang, Z., Fu, J. & Zhang, Y. Nitric Oxide Donor-Based Cancer Therapy: Advances and Prospects. *J. Med. Chem.* **60**, 7617–7635 (2017).
39. Varu, V. N., Tsihlis, N. D. & Kibbe, M. R. Basic science review: Nitric oxide-releasing prosthetic materials. *Vascular and Endovascular Surgery* **43**, 121–131 (2009).
40. Han, G., Friedman, A. J. & Friedman, J. M. Nitric oxide releasing nanoparticle synthesis and characterization. *Methods Mol Biol* **704**, 187–195 (2011).
41. Cobb, J. P. Nitric Oxide Synthase Inhibition as Therapy for Sepsis: A Decade of Promise. *Surg. Infect. (Larchmt)* **2**, (2001).
42. Laubach, V. E., Shesely, E. G., Smithies, O. & Sherman, P. A. Mice lacking inducible nitric oxide synthase are not resistant to lipopolysaccharide-induced death. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**, 10688–10692 (1995).
43. Ye, S. *et al.* Cationic liposome-mediated nitric oxide synthase gene therapy enhances the antitumor effects of cisplatin in lung cancer. *Int. J. Mol. Med.* **31**, 33–42 (2013).
44. Ghaffari, A. *et al.* A direct nitric oxide gas delivery system for bacterial and mammalian cell cultures. *Nitric Oxide* **12**, 129–140 (2005).
45. Miller, C. C., Miller, M. K., Ghaffari, A. & Kumimoto, B. Treatment of chronic nonhealing leg ulceration with gaseous nitric oxide: A case study. *J. Cutan. Med. Surg.* **8**, 233–238 (2004).
46. Ghaffari, A., Miller, C. C., McMullin, B. & Ghahary, A. Potential application of gaseous nitric oxide as a topical antimicrobial agent. *Nitric Oxide - Biol. Chem.* **14**, 21–29 (2006).
47. Miller, C. *et al.* Gaseous nitric oxide bactericidal activity retained during intermittent high-dose short duration exposure. *Nitric Oxide - Biol. Chem.* **20**, 16–23 (2009).
48. Deppisch, C. *et al.* Gaseous nitric oxide to treat antibiotic resistant bacterial and fungal lung infections in patients with cystic fibrosis: a phase I clinical study. *Infection* **44**, 513–520 (2016).
49. Petit, P. C. *et al.* The Pathophysiology of Nitrogen Dioxide during Inhaled Nitric Oxide Therapy. *ASAIO J.* **63**, 7–13 (2017).
50. DEPAYRAS, S. *et al.* Impact Of Gaseous No₂ On *P. Fluorescens* Strain In The Membrane Adaptation And Virulence. *Int. J. Environ. Impacts* **1**, 183–192 (2018).

3.3. Les seuils de tolérance

Au vue de la forte pathogénie de ces NO_x, des études épidémiologiques compilées par l’OMS et l’INERIS ont permis de déterminer les seuils de NO et NO₂ pouvant conduire à des effets réversibles (toux, nausées, malaises), irréversibles (asthme, allergie, maladies cardiovasculaire et respiratoire), voire létaux (Depayras *et al.*, 2018). Ainsi des seuils d’émissions tolérés en NO₂ ont été proposés afin de limiter leur impact en santé public (INERIS, 2011; Organisation Mondiale de la Santé, 2005). Néanmoins, la réaction complète et rapide du NO dans l’atmosphère (**Figure 2**), telle que sa conversion en NO₂ (Hanrahan, 1999), rend impossible la détermination des seuils d’émissions propres à ce gaz. De plus, le NO₂ présente un plus fort pouvoir pathogène sur l’Homme. Par conséquent la moyenne horaire du NO₂ à ne pas excéder est de 0,1 ppm (200 µg/m³) et la moyenne annuelle est de 0,02 ppm (40 µg/m³) (Organisation Mondiale de la Santé, 2005), aussi mentionnées au sein de la revue précédente (Depayras *et al.*, 2018).

4. Les stratégies limitant la pollution : une lutte constante

4.1. Les traités gouvernementaux : un effort commun

Depuis l'ère de la révolution industrielle (XIX^{ème} siècle), un grand nombre de pays ont démontré un développement technologique exponentiel, notamment dans les secteurs des transports et des industries. Néanmoins ces avancées ont conduit à une nette augmentation de la pollution atmosphérique. Au vu des conséquences environnementales et sanitaires désastreuses à l'échelle mondiale, les différents gouvernements ont collectivement établi des lois limitant l'émission de ces polluants. Ainsi, à l'échelle internationale, l'Organisation des Nations Unies (ONU) a fait signer les protocoles de Kyoto (1997) et de Göteborg (1999). Ces deux protocoles tendent à réduire l'émission de gaz à effet de serre (Kyoto) et les phénomènes d'acidification et d'eutrophisation (Göteborg). La stratégie communautaire européenne de surveillance de la qualité de l'air se base sur la directive du 21 mai 2008 (2008/50/CE) et celle du 15 décembre 2004 (2004/107/CE). Néanmoins, les seuils d'émissions proposés dans ces directives étant largement dépassés, une nouvelle directive a été rédigée. Cette directive du 14 décembre 2016 (2016/2284) engage, par exemple, la France à diminuer de 50%, puis de 69% ses émissions d'oxydes d'azotes, aux horizons respectifs de 2020 et 2030. Dans le prolongement de cette directive et dans le cadre de la transition énergétique, le ministre de l'écologie, Nicolas Hulot, a proposé son plan de réduction des émissions de polluants atmosphériques (PREPA) en 2017. Ce dernier vise principalement les secteurs industriels, des transports, résidentiels, et agricoles.

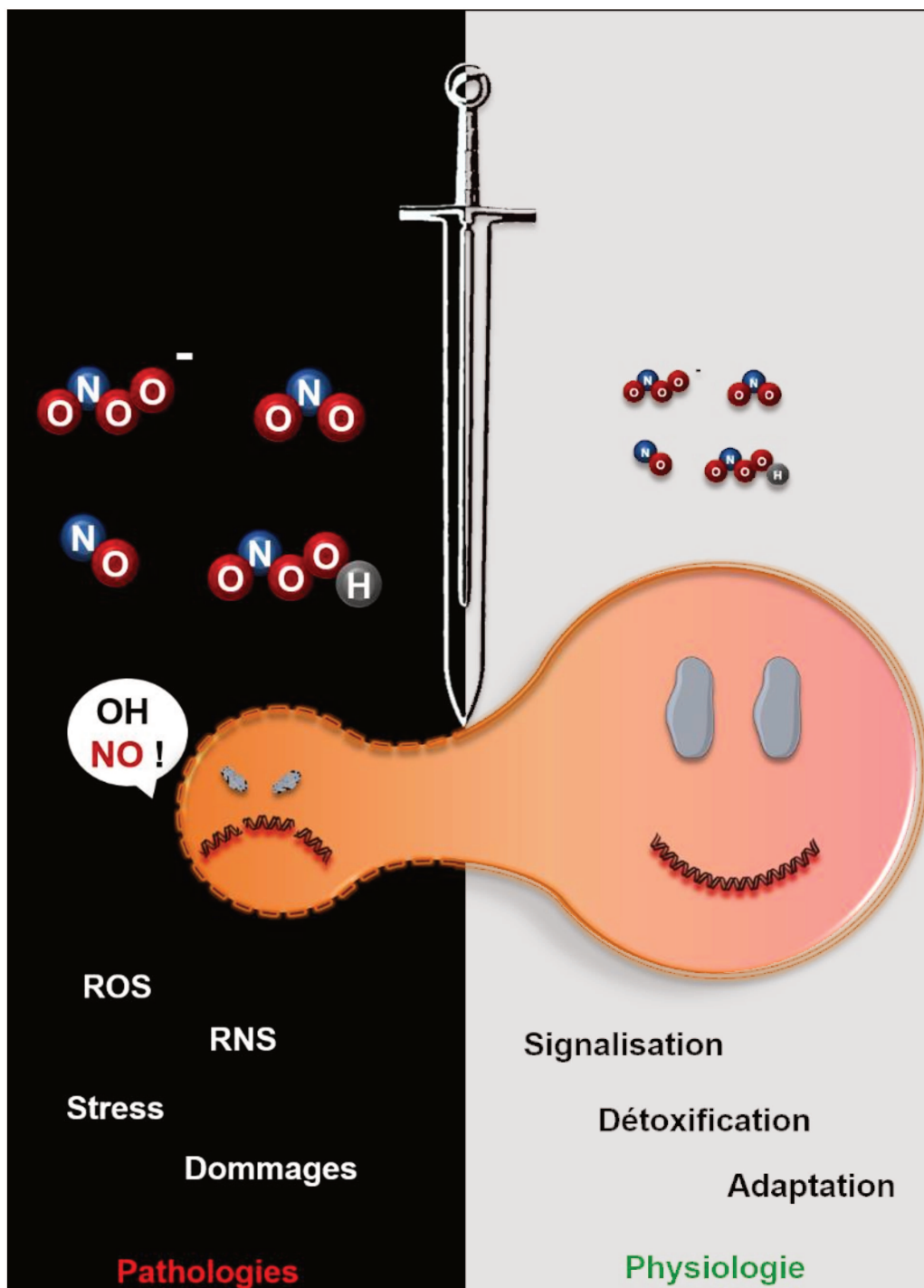
4.2. La « déNOxification » :

En parallèle de ces diverses stratégies politiques, de nouvelles technologies « anti-pollution » ont été développées. On retrouve principalement des procédés physico-chimiques (Skalska *et al.*, 2010). L'ensemble de ces techniques sont applicables aux différents secteurs d'émissions, soit prioritairement, les industries (chimiques, centrales d'énergie) et les transports. Ces technologies tendent à diminuer les émissions de polluants atmosphériques en les convertissant en composés moins, voire non, toxiques, pour l'environnement. Comme mentionné précédemment, les NO_x proviennent à 90% d'activités anthropogéniques, et plus précisément à la suite de processus de combustion. Ainsi, trois étapes clés de la combustion sont ciblées dans ces stratégies d'abattement des NO_x : la précombustion, la combustion et la postcombustion. Les paramètres principaux pouvant jouer sur les deux premières étapes sont le choix (i) du comburant, (ii) du combustible et (iii) de la température utilisée. Concernant l'étape de postcombustion, un large panel de techniques, physiques ou chimiques, existe. Les

procédés chimiques peuvent être basés sur un principe de réduction (réduction sélective catalytique ou non), ou d'oxydation des NO_x (oxydation photo-catalytique, injection d'O₃, utilisation de plasma non-thermique) (Brüggemann and Keil, 2008; Devahasdin *et al.*, 2003; Mok and Lee, 2006). Les procédés physiques sont basés sur l'adsorption (charbon actif) ou l'absorption des NO_x (solutions alcalines) (Mok and Lee, 2006; Rubel *et al.*, 1995). Pour plus de détails, la lecture de la revue de Skalska sur les stratégies d'abattement des NO_x (Skalska *et al.*, 2010) est fortement suggérée. Plus récemment, l'application de biotechnologies dans la lutte anti-« NO_x » a également vu le jour. En effet, la biofiltration avec l'utilisation de bactéries ou de microalgues dénitrifiantes (Yang *et al.*, 2007; Yen *et al.*, 2015) peut être citée. Une autre alternative, la phylloremédiation (adaptation de la phytoremédiation), est en cours de développement (Wei *et al.*, 2017). Cette technique est basée sur l'exploitation du système foliaire, absorbant le NO et le NO₂ (Morikawa *et al.*, 1998), et de la phyllosphère microbienne dotée de systèmes de nitrification générant des nitrates utilisés pour la croissance de la plante les hébergeant (Whipps *et al.*, 2008).

Malheureusement, les techniques décrites précédemment sont onéreuses et/ou présentent des limites d'utilisation pour obtenir des efficacités optimales, souvent de l'ordre de 80% (Skalska *et al.*, 2010). Aussi les chercheurs s'intéressent, en parallèle, à développer des solutions pour limiter l'impact des NO_x d'un point de vue sanitaire. Cela peut s'illustrer par la mise sur le marché de masques « anti-pollution ». Bien qu'encore victimes de controverse, ces masques seraient capables de filtrer un grand nombre de polluants atmosphériques (Pacitto *et al.*, 2019). Il est possible de citer notamment celui développé récemment par l'entreprise française R-pur se positionnant comme la référence sur le marché en termes de norme européenne (FFP3) (<https://www.r-pur.com/>).

Chapitre II. Le stress nitrosant : l'épée de Damoclès intracellulaire



La forte réactivité des NOx avec de nombreux constituants vitaux de la cellule (lipides, protéines, sucres et acides nucléiques) est à l'origine de stress importants pour la bactérie (Bartesaghi and Radi, 2018). De plus, le stress nitrosant présente une grande interconnexion avec le stress oxydant, via la réaction des RNS avec des espèces réactives de l'oxygène (ROS), ainsi que l'ensemble des mécanismes de réponse au stress en commun (Bartesaghi and Radi, 2018). Bien qu'un grand nombre de connaissances soient actuellement disponibles chez l'Homme, les microorganismes sont peu documentés à ce sujet et, pourtant, également fortement exposés à ces polluants. En effet, un grand nombre de microorganismes possèdent la bNOS (**Chapitre 1, Partie 2**). Cette enzyme générant du NO est largement conservée (Crane, 2008; Sudhamsu and Crane, 2009). Néanmoins, les bactéries sont également exposées à ces polluants aussi bien environnementaux (air, sol, eau) que dans leur hôte. En effet, différents organismes (mammifères, plantes) synthétisent du NO, largement utilisé pour ses fonctions de signalisation intra-tissulaire (sGC) ou lors de réactions immunitaires dans les cellules macrophagiques (Depayras *et al.*, 2018). La présence de cette enzyme et son intérêt pour la bactérie sont difficiles à appréhender. Afin d'expliquer l'intérêt de cette enzyme, deux paléo-microbiologistes ont proposé une fonction de détoxification de l'O₃, largement majoritaire dans l'atmosphère de l'ère primitive. Ainsi, le NO formé réagirait avec l'O₃, limitant par la suite le stress oxydant dans le microenvironnement proche de la bactérie (Feelisch and Martin, 1995). Un autre point important dans la relation microorganismes-RNS est l'utilisation des NOx dans le métabolisme des bactéries de type nitrifiantes et dénitrifiantes. Ces phénomènes sont essentiels dans le cycle biogéochimique de l'azote (Depayras *et al.*, 2018; Watmough *et al.*, 1999).

I. Le cycle de l'azote et le métabolisme bactérien

L'azote est un composé essentiel à la vie puisqu'il est un constituant élémentaire de nombreuses molécules biologiques (acide aminés, acide nucléiques) (Ferguson, 1998). Bien que prépondérant dans l'air (Skalska *et al.*, 2010), cette molécule diatomique présente une double liaison à forte énergie difficilement hydrolysable (Jia and Quadrelli, 2014). Ainsi, l'azote gazeux n'est pas assimilable par les animaux. Ces derniers s'alimentent donc de végétaux pour pallier à leurs besoins en azote. Néanmoins, les plantes ne sont également pas capables d'utiliser l'azote gazeux directement, mais sous ses formes métabolisables (*e.g.* nitrate, nitrite, ammoniac). C'est ainsi qu'intervient un grand nombre de microorganismes environnementaux (champignons, algues, bactéries). Ces microorganismes sont capables de fixer l'azote gazeux c'est-à-dire de l'assimiler et de le nitrifier (*e.g.* bactéries « nitrifiantes »). Une fois sous leurs formes métabolisables, les composés azotés sont assimilés en protides par les bactéries ou prélevés puis assimilés par les végétaux avant de poursuivre la chaîne alimentaire. Pour éviter la déplétion totale d'azote gazeux dans l'atmosphère, les composés azotés organiques sont

recyclés en azote gazeux. Ainsi, à leur mort, les êtres vivants (plantes, animaux) se décomposent dans le sol où ils libèrent des composés organiques, qui sont ensuite dénitrifiés afin de réémettre de l'azote gazeux dans l'atmosphère. Ce processus est notamment réalisé par un grand nombre de bactéries dites « dénitrifiantes ».

1. La formation de composés azotés métabolisables : fixation, ammonification et nitrification

La première phase critique pour l'utilisation de l'azote gazeux par les différents organismes vivants consiste à l'étape de **fixation** *i.e.* la conversion de l'azote gazeux (N_2) en dérivés métabolisables pour les plantes (**Figure 5**).

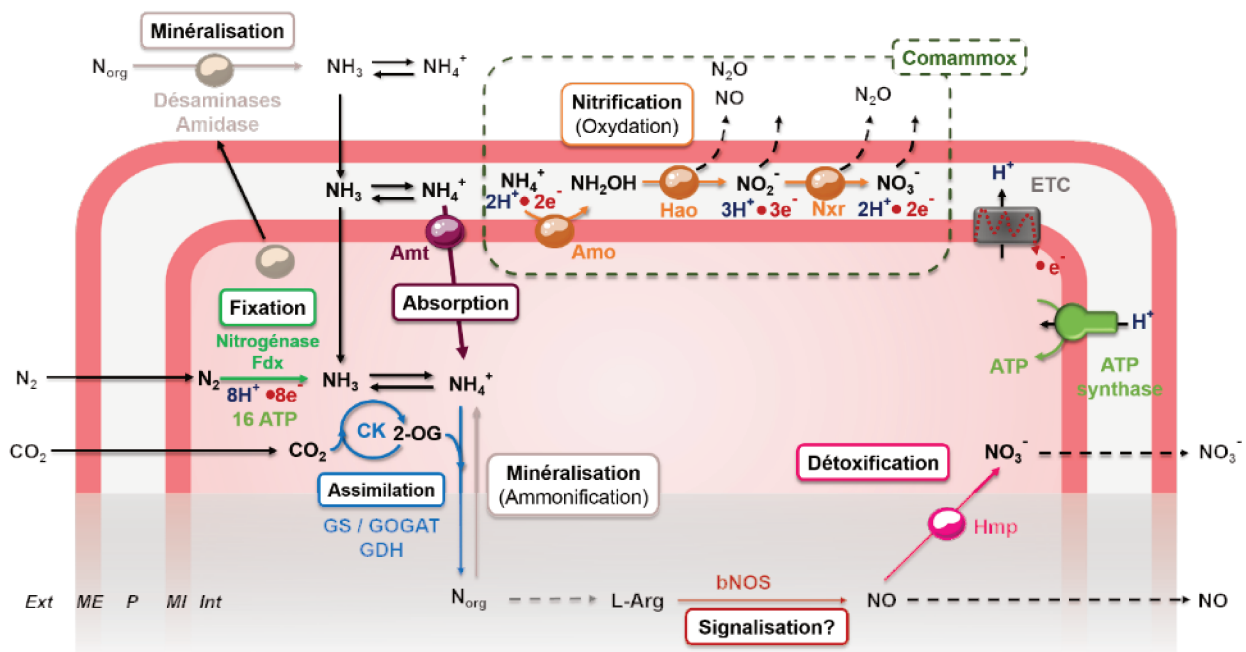


Figure 5 : Synthèse de la conversion de l'azote gazeux en composés azotés métabolisables (adaptée de Kuypers *et al.*, 2018).

Amt : transporteur de l'ammoniac ; Amo : ammonium monooxygénase ; Hao : hydroxylamine oxydoréductase ; Nxr : nitrite oxydoréductase ; Fdx : Ferredoxin ; N_{org} : composés azotés organiques ; L-Arg : L-arginine ; CK : cycle de Krebs ; 2-OG : 2-oxoglutarate ; GS : glutamine synthase ; GOGAT : glutamate synthétase ; GDH : glutamate déshydrogénase ; bNOS : NO synthase bactérienne ; Hmp : flavohémoprotéine ; ETC : chaîne de transfert d'électrons ; Ext : milieu extracellulaire ; ME : membrane externe ; P : espace périplasmique ; MI : membrane interne ; Int : milieu intracellulaire ; les flèches en pointillés noires correspondent à l'échappement des dérivés azotés formés (NO , N_2O , NO_2^- et NO_3^-) dans l'environnement ; les flèches pleines au transfert non réactif des espèces au travers la membrane bactérienne.

Cette fixation de l'azote est réalisée par deux types de microorganismes nitrifiants : (i) les bactéries libres (non-symbiotiques), regroupant notamment les cyanobactéries et les bactéries des genres *Azotobacter sp.*, *Beijerinckia sp.*, *Clostridium sp.* et *Klebsiella sp.*, ou par (ii) des bactéries symbiotiques, notamment *Rhizobium sp.*, *Frankia sp.*, et *Azospirillum sp.*, associées respectivement, aux nodules racinaires de légumineuses, aux dicotylédones et aux céréales

(Shrimant Shridhar, 2012). Plus de 90% de l'azote gazeux serait fixé par ces microorganismes (<https://www.britannica.com/science/nitrogen-fixing-bacteria>). La clef de cette conversion du N₂ en NH₃ réside dans le complexe protéique nitrogénase intracellulaire codé par l'opéron génique *nif*, variable selon l'espèce bactérienne (Hoffman *et al.*, 2014; Zehr *et al.*, 2003). Ce complexe protéique est composé de deux sous-unités protéiques à cœur métallique, la dinitrogénase (complexe protéine-Molybdène-Fer) et la dinitrogénase réductase (complexe protéine-Fer) (Cheng, 2008). Un important apport d'énergie (16 molécules d'ATP/ 1 molécule de N₂ fixée) ainsi que la présence de cofacteurs, tels que la ferrédoxine, sont nécessaires aux étapes d'oxydo-réduction successives (EC 1.18.2.1), générant ainsi le NH₃. Précédemment formés dans l'espace intracellulaire, l'ammoniac est converti, spontanément en présence d'eau, en ammonium et radicaux hydroxyles. D'autres sources d'ammonium intracellulaires sont notamment (i) son **absorption** directe du milieu extracellulaire via le transporteur cytoplasmique Amt (Wingreen, 2013) ou (ii) sa formation suite à la décomposition de matières organiques, **minéralisation**, ou ammonification (Schimel and Bennett, 2004), par des champignons ou bactéries du sol (Blair *et al.*, 1990; Kaiser *et al.*, 2015). Néanmoins l'ammonium, à forte concentration, est un composé toxique pour la bactérie (Müller *et al.*, 2006). Il est donc rapidement consommé par la bactérie via sa conversion (i) en composés azotés organiques (**assimilation**) ou (ii) en ions nitrites et nitrates (**nitrification**) (Geisseler *et al.*, 2010). L'assimilation correspond à la transformation de l'ammonium ou de l'ammoniac en composés organiques générant ainsi des acides aminés, dont la glutamine et le glutamate sont les précurseurs. Deux voies métaboliques sont responsables de ce processus (i) via la réaction successive de la glutamine synthétase (GS) et de la glutamate synthase (GOGAT), générant respectivement la glutamine et le glutamate, ou via (ii) l'activité de la glutamate déshydrogénase (GDH) (Yuan *et al.*, 2009). Le groupement amine (-NH₂) est ensuite transféré à un autre acide α -cétonique par transamination à l'aide d'une aminotransférase permettant ainsi la synthèse de nouveaux acides aminés (Gale, 1940; Lichstein and Cohen, 1945). La nitrification est l'oxydation de l'ammonium ou l'ammoniac en nitrate, localisée dans l'espace périplasmique (Myrold, 1998). Ce processus est réalisé en deux étapes : la nitrification et la nitrosylation réalisées par deux groupes bactériens distincts (Winogradsky, 1890).

- La nitrification est effectuée par *Nitrosomonas sp.* via l'activité de l'ammonium oxydase (AMO) et de l'hydroxylamine oxydase (HAO) conduisant à la formation de nitrite (Whittaker *et al.*, 2000). Cette étape conduit à l'apparition d'un intermédiaire réactionnel, l'hydroxylamine (NH₂OH), et d'autre NO_x (NO, N₂O) potentiellement réémis dans l'atmosphère (Caranto and Lancaster, 2017).

- L'étape de nitrosylation est, quant à elle, réalisée par *Nitrobacter sp.* Elle consiste en l'oxydation des nitrites en nitrates, catalysée par la nitrite oxydoréductase (Nxr). Cependant,

ce concept est désormais soumis à controverse avec l'apparition de la notion de comammox pour «complete ammonia oxydizer » (Hu and He, 2017). En effet, de récentes études ont établi le portrait de *Nitrospira sp.* capable d'effectuer la nitrification de l'ammonium entièrement à elle seule (Daims *et al.*, 2016; van Kessel *et al.*, 2015). Cette étape de nitrification génère des électrons et des atomes d'hydrogène dans l'espace périplasmique. Ces composés sont transférés respectivement à la chaîne de transfert d'électron et à l'ATP synthase restaurant ainsi partiellement la dépense énergétique occasionnée lors de la fixation (Kuypers *et al.*, 2018). Le NO est également formé au niveau cytoplasmique sous l'activité de la bNOS par divers genres bactériens : *Streptomonas sp.*, *Deinococcus sp.*, *Staphylococcus sp.*, *Bacillus sp.* (Crane *et al.*, 2010). Le NO est toxique à forte concentration, aussi des processus de détoxification sont nécessaires à la survie bactérienne. La première enzyme de détoxification du NO intracellulaire a été découverte chez *E. coli* (Poole *et al.*, 1996c). Il s'agit de la flavohémoprotéine Hmp capable de convertir le NO en nitrate (**Chapitre 2, Partie 3**) (Bonamore and Boffi, 2008).

2. Le recyclage de l'azote : dénitrification classique et cas particuliers

La dénitrification est un processus intervenant dans le recyclage de la matière azotée organique en azote gazeux par des étapes de réductions successives en conditions d'anoxie. Ce processus est largement répandu chez de nombreux genres bactériens tels que *Bacillus sp.*, et *Pseudomonas sp.* (Martens, 2005; Zumft, 1992). L'ensemble des enzymes intervenant dans cette réaction est couplée à la chaîne de transfert d'électrons (ETC). Dans ce cas, l'anion nitrate joue le rôle d'accepteur terminal de l'ETC. La première étape de ce processus consiste à l'assimilation du nitrate (réduction en nitrite) par une nitrate réductase (NR). Il en existe trois types différents notamment de par leur localisation cellulaire et leurs implications : la NAR (membrane interne, respiration anaérobie), la NAP (périplasma, désassimilation) et la NAS (cytoplasme, assimilation) (Moreno-Vivián *et al.*, 1999). L'enzyme NAR, couplée à la ferrédoxine, catalyse la réduction du nitrate en nitrite dans le compartiment cytoplasmique. Elle est couplée à l'ETC qui apporte les électrons nécessaires à cette réaction (**Figure 6**).

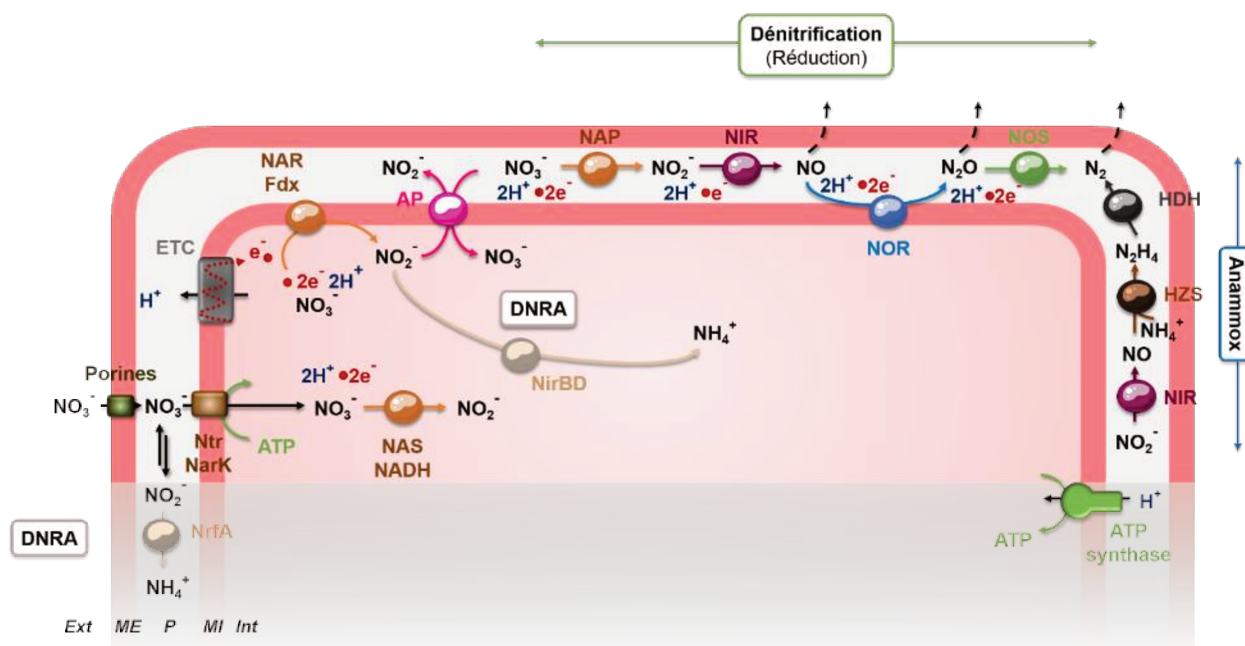


Figure 6 : Vue d'ensemble des différents mécanismes intervenant dans le recyclage de composés azotés organiques en azote gazeux (adaptée de Kuypers *et al.*, 2018).

NAR, NAP, NAS : Nitrate réductases membranaire, périplasmique et cytoplasmique ; NIR : nitrite réductase ; NOR : NO réductase ; NOS : nitrous oxyde synthase ; ETC : chaîne de transfert d'électrons ; Ntr, NarK : Transporteurs de nitrate ATP dépendant ; AP : protéine anti-transporteur de nitrate et nitrite ; HZS : hydrazine synthase ; HDH : hydrazine déshydrogénase ; NrfA: nitrite réductase ; DNRA : « dissimilatory nitrate reduction to ammonia » ; Anammox : « anaerobic ammonia oxidizer » ; Ext : milieu extracellulaire ; ME : membrane externe ; P : espace périplasmique ; MI : membrane interne ; Int : milieu intracellulaire ; les flèches en pointillés noires correspondent à l'échappement des dérivés azotés formés (NO , N_2O , NO_2^- et NO_3^-) dans l'environnement.

De plus un apport de protons est également nécessaire, participant ainsi à la force protomotrice utilisée subséquemment par l'ATP synthase (phosphorylation oxydative). La suite de la dénitrification étant localisée dans l'espace périplasmique, les ions nitrites formés sont alors transportés dans cet espace par un anti-transporteur des ions nitrates et nitrites (AP), présent dans la membrane interne. L'enzyme NAP, quant à elle, catalyse directement la formation de nitrites dans le périplasmie. Contrairement à la NAR, l'activité de la NAP ne contribue pas à la force protomotrice précédemment évoquée. Une grande variété de microorganismes possède ces deux enzymes tels que *Pseudomonas sp.* et *E. coli* (Moreno-Vivián *et al.*, 1999). Enfin la NAS, en présence du cofacteur NADH, synthétise du nitrite dans le cytoplasme. Un transport de nitrates jusqu'au cytoplasme est ainsi nécessaire pour le fonctionnement des NAS et NAR. Ce transport est possible notamment par des porines présentes dans la membrane externe telles que OprF (Yoon *et al.*, 2002) et des transporteurs de nitrate ATP dépendants (NarK, Ntr) (Moir and Wood, 2001). Les étapes suivantes de la dénitrification sont catalysées consécutivement par la nitrite réductase (NIR), la NO réductase (NOR), et la N_2O synthase (NOS) dans le périplasmie générant respectivement du NO_2^- , du NO, du N_2O et finalement du N_2 gazeux (Ferguson, 1994; Ye *et al.*, 1994). Ces réactions

nécessitent un apport d'électrons et de protons, fournis par l'ETC. Tout comme la NAP, de par leur localisation et activité, elles ne contribuent pas à la force protomotrice (Zumft, 1997). Une libération de NO, N₂O et N₂ dans l'atmosphère est observée lors de ce processus (Skiba *et al.*, 1993). Un mécanisme alternatif de conversion du nitrate en N₂ gazeux a été décrit chez des bactéries de type anammox (« anaerobic ammonia oxidizer ») issues du *phylum Planctomycètes* (Jetten *et al.*, 2003; Mulder *et al.*, 1995). Trois étapes réactionnelles successives d'oxydation en anaérobiose du nitrate sont réalisées dans l'espace périplasmique. Elles sont catalysées par la NIR, l'hydrazine synthase (HZS) et l'hydrazine déshydrogénase (HDH) conduisant à la formation d'intermédiaires réactionnels : le NO, et l'hydrazine (N₂H₄) (Kartal *et al.*, 2011). Enfin des réactions de réduction des nitrates en ammoniac sont également observées chez des microorganismes de type DNRA (« *dissimilatory nitrate reduction to ammonia* »), marins ou terrestres (Einsle *et al.*, 1999). Ce processus est en compétition directe avec la dénitrification via l'utilisation des ions nitrates. De plus, contrairement à la dénitrification, la DNRA empêche la perte de l'azote (N₂), ainsi que le relargage atmosphérique de polluants tels que le N₂O (Putz *et al.*, 2018). En effet, comme évoqué précédemment, l'ammoniac peut ensuite être assimilé en matière organique (**Figure 5**). Cette conversion est catalysée par une cytochrome c nitrate réductase (NrfA) périplasmique ou la nitrite réductase cytoplasmique (NirBD). NrfA est distribuée chez un grand nombre de bactéries (Mohan *et al.*, 2004) et largement étudiée chez *E. coli* (Einsle, 2011). Plus récemment, une étude d'interactomique a mis en évidence un potentiel couplage entre le complexe protéique associé au flagelle et la dénitrification chez *Pseudomonas* (Borrero-de Acuña *et al.*, 2017). Ce mécanisme pourrait souligner la mise en place de mécanisme de fuite des microorganismes hors d'un micro-environnement inapproprié à leur développement.

Chez *Pseudomonas sp.* la dénitrification est un mécanisme finement régulé suite à la modulation de nombreux facteurs transcriptionnels. Les facteurs influençant l'activation de ces régulation sont : (i) le taux d'oxygène dans le microenvironnement proche (ANR) ou (ii) la présence de composés azotés type NO (DNR) ou NO₃⁻, NO₂⁻ (NarX/L) (Arai, 2011). L'ensemble des mécanismes de régulation de la dénitrification seront abordés plus en détails ultérieurement (**Chapitre 2, Partie 3**).

II. Les principales cibles des NOx

1. La membrane au centre des interactions ROS/RNS

1.1. Perméabilité et diffusion des ROS et RNS prépondérants à l'échelle cellulaire

Les membranes biologiques, principalement constituées de bicouches de phospholipides et de protéines membranaires représentent une formidable barrière naturelle hydrophobe imperméable à certains composés en fonction de leur taille et de leur charge (Lodish *et al.*, 2008). Ainsi, certaines molécules telles que les gaz (*e.g.* O₂, CO₂), des molécules hydrophobes ou petites molécules polaires non chargées (*e.g.* H₂O), traversent cette membrane par diffusion simple. La présence de protéines (canaux, transporteurs, pompes) en son sein, confère une modulation de cette perméabilité (Lodish *et al.*, 2008; Orsi *et al.*, 2009). En effet, certaines grosses molécules ou composés chargés vont diffuser de manière facilitée à l'aide de ces protéines. Dans certains cas, cette diffusion est passive et dépend principalement du gradient de concentration de cette molécule de part et d'autre de la membrane (Bienert *et al.*, 2007). Dans le cas inverse, un apport d'énergie est nécessaire ce qui correspond à un transport actif (ATP-dépendant) et est généralement dans le sens inverse du gradient (Heinz and Patlak, 1960). Le développement de différents modèles de membranes artificielles (liposomes) contenant principalement de la phosphatidylcholine (PC) tels que les EYPC (PC issues de jaune d'œuf), ou des systèmes vésiculaires plus complexes (Low-Density Lipoprotein ; LDL), ont permis de mesurer cette capacité de diffusion de diverses molécules et ions (**Figure 5B**) (Goss *et al.*, 1999; Möller *et al.*, 2008). Néanmoins, la variabilité de ces modèles (composition, température, épaisseur) induisent une hétérogénéité de la quantification des coefficients de perméabilité (cm.s⁻¹) retrouvée dans la littérature (Möller *et al.*, 2008). De plus, les ROS et RNS ne présentent pas tous les mêmes propriétés chimiques (charge, polarité, taille, réactivité) conférant ainsi des capacités de diffusion, au sein de ces membranes, propres à chaque espèce (**Figure 7A et B**).

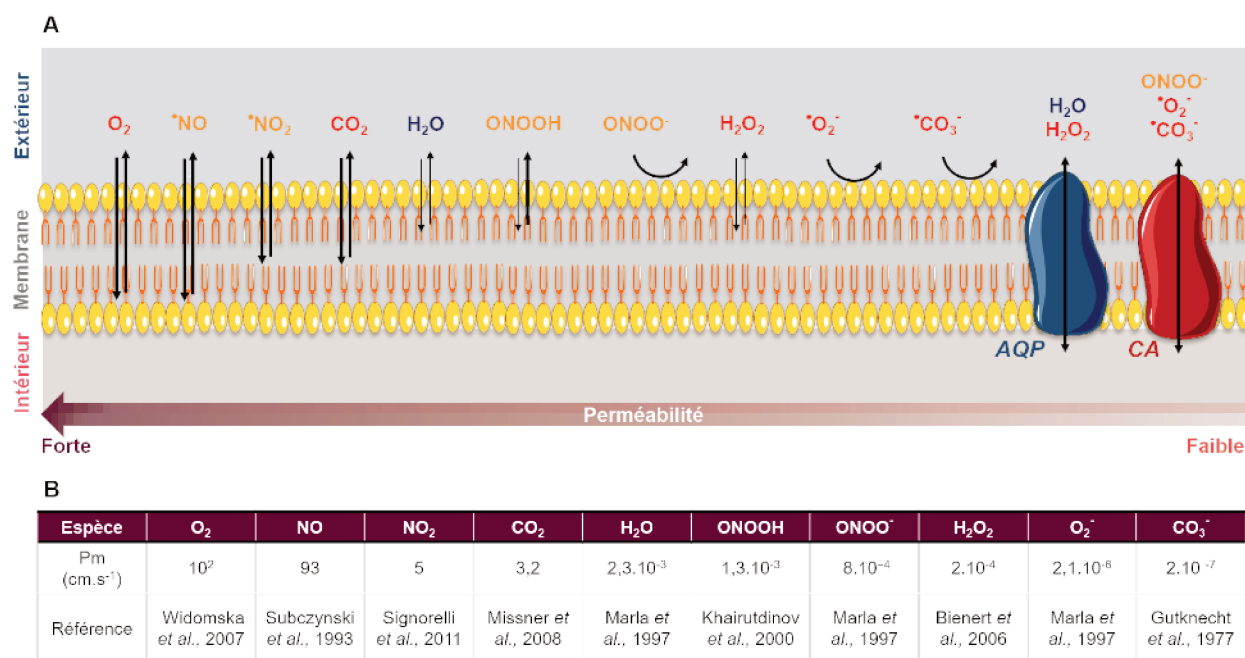


Figure 7 : Diffusion des principaux NO_x, RNS et ROS au sein de membranes artificielles (adapté de Möller *et al.*, 2008 ; Trostchansky *et al.*, 2010).

A : représentation schématique de la diffusion des différentes espèces chimiques au sein de membrane artificielles ; B : coefficient de perméabilité (Pm) en cm.s⁻¹ pour chaque espèce chimique ; AQP : aquaporine ; CA : canal à anions ; Les espèces chimiques annotées en rouge et orange appartiennent respectivement à la famille des ROS et des RNS.

Ainsi, comme illustré ci-dessus, l'O₂ et le NO sont deux molécules de petite taille, lipophiles et polaires présentant une forte capacité à diffuser au sein de membranes (Pm de l'ordre de 10 à 10² cm.s⁻¹). Ces deux gaz sont localisés préférentiellement au niveau des chaînes d'acide gras des phospholipides membranaires où leur solubilité est nettement augmentée (Sugii *et al.*, 2005). Ces caractéristiques induisent l'accumulation du NO et de l'O₂ dans ce compartiment cellulaire. Ainsi, des réactions d'auto-oxydation du NO, conduisant à l'apparition de NO₂, sont alors nettement favorisées dans l'espace membranaire (**Figure 8**) (Liu *et al.*, 1998).

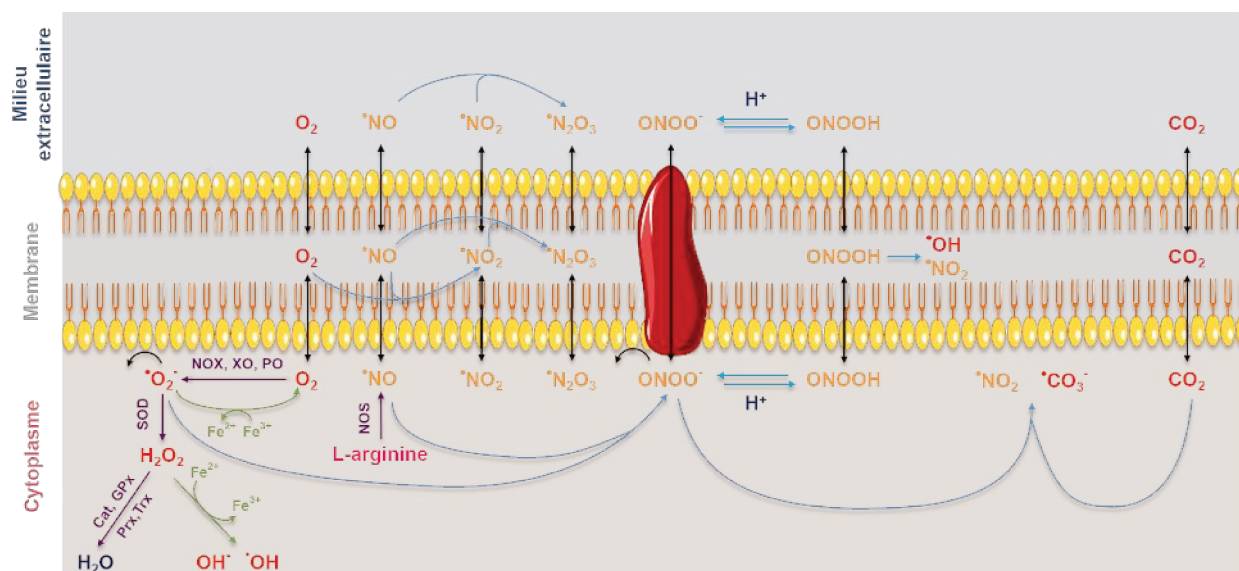


Figure 8 : La membrane au centre de réactivité entre les ROS et RNS (adapté de Bartesaghi *et al.*, 2011 et de Möller *et al.*, 2007).

NOX : NADH oxygénase ; XO : xanthine oxydase, PO : phosphorylation oxydative ou chaîne de transfert d'électron; SOD : superoxyde dismutase ; Cat : catalase ; Gpx : Glutathion peroxydase, Prx : Peroxyredoxin ; Trx : Thioredoine, Fe^{2+/3+} : Fer sous l'état d'oxydation II et III ; NOS : synthase du NO ; Les espèces chimiques notées en rouge et orange appartiennent respectivement à la famille des ROS et des RNS ; les flèches bleues, vertes et violettes correspondent respectivement aux réactions chimiques spontanées, de Fenton et catalysées par des enzymes.

Le NO₂ est également capable de diffuser au travers des membranes, mais plus faiblement que le NO (5 cm.s⁻¹). Par la suite, une réaction entre le NO et le NO₂ conduit à la formation du N₂O₃, un puissant agent nitrosant (O'Donnell *et al.*, 1999). Malgré la forte réactivité de ce composé avec un grand nombre de biomolécules (acides nucléiques, lipides, protéines), aucun coefficient de perméabilité n'est disponible dans la littérature pour ce composé (**Figure 7**). Un autre agent toxique à l'échelle cellulaire, le peroxy-nitrite (ONOO⁻), est également formé à proximité des membranes. En effet, il est formé suite à la réaction de l'anion superoxyde O₂⁻ avec le NO endogène ou d'origine environnementale. Sa formation est localisée au lieu de production de l'O₂⁻ (Radi *et al.*, 2000). En effet, l'O₂⁻ présente un coefficient de perméabilité trop bas (2,1.10⁻⁶ cm.s⁻¹) ne lui permettant pas de diffuser passivement dans la membrane. Néanmoins, son transport pourrait être facilité par la présence de canaux à anions (Lynch and Fridovich, 1978) (**Figure 7A**). L'anion superoxyde est un composé formé principalement à l'issue de la chaîne de transfert d'électron (phosphorylation oxydative ; PO) ou de l'activité de la NADPH oxydase (NOX) et de la xanthine oxydase (XO) (Radi *et al.*, 2000). L'anion superoxyde, appartenant à la famille des ROS, présente un fort pouvoir oxydant. Cependant, un grand nombre d'enzymes interviennent dans la détoxification en deux étapes de ce composé. La première étape consiste à sa réduction en peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) par une métalloprotéase, la superoxyde dismutase (SOD) (Brunori and Rotilio, 1984). Le H₂O₂ est également un composé au fort pouvoir oxydant de la famille des ROS. Tout comme l'anion

superoxyde, le peroxyde d'hydrogène est capable de réagir avec des ions fer, groupements métalliques (réaction de Fenton) pouvant conduire à l'apparition de ROS supplémentaires (O₂^{•-} ou OH[•] et [•]OH) (Winterbourn, 1995) (**Figure 8**). Le peroxyde d'hydrogène présente un Pm faible (2.10⁻⁴ cm.s⁻¹) soulignant une diffusion moindre dans la membrane (Bienert *et al.*, 2006). Néanmoins, le H₂O₂ est capable d'utiliser les aquaporines (AQP), protéines membranaires permettant la diffusion de l'eau, afin de traverser les membranes (Bienert and Chaumont, 2014) (**Figure 7A**). Ainsi, une étape supplémentaire dans la détoxification de l'O₂^{•-} est donc nécessaire pour transformer l'H₂O₂ en H₂O. De nombreuses enzymes peuvent intervenir dans ce processus telles que la catalase (Cat), la glutathion peroxydase (GPx) ou encore la peroxirédoxine (Prx) et la thiorédoxine (Trx) (Netto and Antunes, 2016; Rhee *et al.*, 2005).

L'ONOO⁻, de par son coefficient de perméabilité faible (8.10⁻⁴ cm.s⁻¹) (Marla *et al.*, 1997), diffuse difficilement dans la membrane, mais pourrait utiliser des canaux à anion (Denicola *et al.*, 1998). En revanche, sa forme conjuguée, l'acide peroxy-nitrique (ONOOH) diffuserait plus facilement à travers la membrane (P_{ONOOH} = 1,3.10⁻³ cm.s⁻¹) (Denicola *et al.*, 1998; Khairutdinov *et al.*, 2000). Au sein de la membrane, la réaction d'homolyse de l'ONOOH est facilitée (Liu *et al.*, 1998). Cette réaction conduit à la formation de deux produits plus toxiques, le NO₂ et de radical hydroxyle [•]OH (**Figure 4**) dont la forte réactivité au sein de ce compartiment sera discutée ultérieurement. En parallèle, l'ONOO⁻ peut également réagir avec le CO₂, gaz diffusant de manière passive au travers de la membrane (P_{CO₂} = 3,2 cm.s⁻¹). Cette réaction génère l'ion carbonate (CO₃⁻) et le NO₂, également oxydants (Ferrer-Sueta and Radi, 2009). Néanmoins, comme présenté précédemment, le CO₃⁻ est incapable de diffuser de manière passive dans la membrane (P_{CO₃⁻} = 2.10⁻⁷ cm.s⁻¹) (Gutknecht *et al.*, 1977). L'utilisation d'un canal à anion, comme l'ONOO⁻ et l'O₂^{•-}, pourrait être une alternative à sa diffusion dans la membrane (Möller *et al.*, 2008). La réactivité entre l'ONOO⁻ et le CO₂ permet ainsi de limiter la formation d'ONOOH et des produits réactionnels délétères au niveau membranaire (Romero *et al.*, 1999).

1.2. RNS, ROS et membrane : principales altérations du contenu lipidique

Les ROS et RNS présentent une forte capacité à diffuser et/ou interagir au sein de membranes, formant ainsi d'autres intermédiaires aux pouvoirs oxydant et nitrosant croissants (Bartesaghi *et al.*, 2011; Möller *et al.*, 2007). Néanmoins la membrane n'est pas inerte face à ce stress chimique. En effet, au niveau des biomembranes eucaryotes, la peroxydation, nitration et nitrosylation des lipides, a été largement étudiée (Botti *et al.*, 2005; Trostchansky

et al., 2001). Cette réaction peut être décrite en trois grandes étapes : l'initiation (flèches bleues), la propagation (flèche rouge) et la terminaison (flèches vertes) (**Figure 9**).

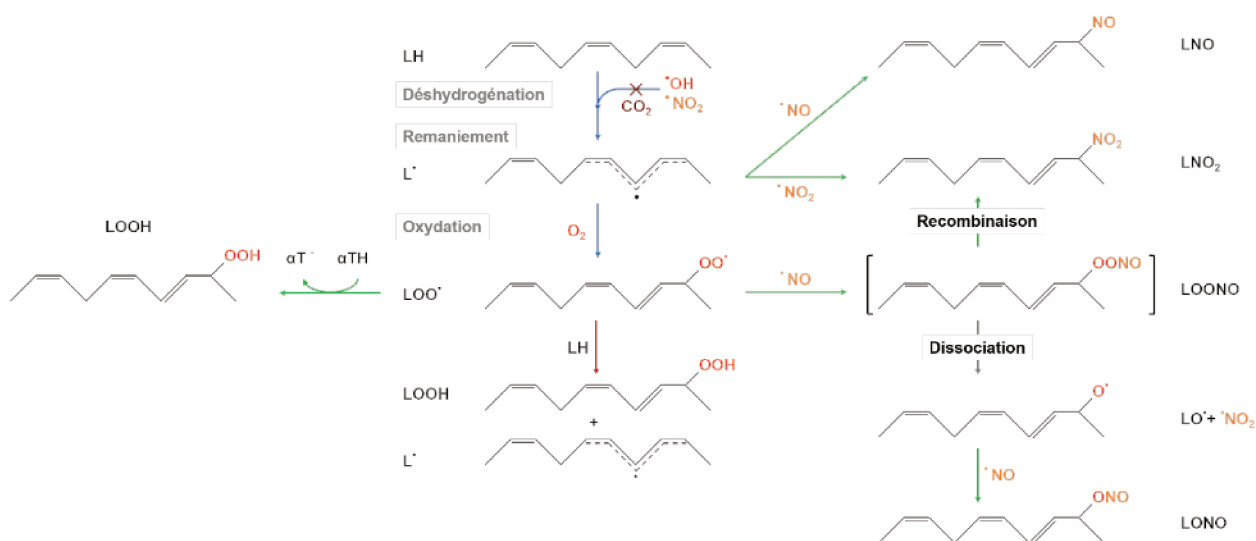


Figure 9 : Synthèse simplifiée des principales réactions des RNS en présence de lipides polyinsaturés chez l'eucaryote (adapté de Möller et al., 2008).

Les flèches bleues, rouges et vertes correspondent respectivement aux étapes d'initiation, de propagation et de terminaison de la peroxydation des lipides. LH : lipide polyinsaturé ; L* : radical lipidique ; LOO* : radical peroxy ; LOOH : hydroperoxyde lipidique ; LO* : radical alcoxy ; LNO : nitroso-alcène ; LNO₂ : nitro-alcène ; LOONO : lipide peroxy-nitré ; LONO : nitrite de lipide ; αTH : α-Tocophérol réduit ; αT• : α-Tocophérol oxydé.

Brièvement, l'étape d'initiation consiste à la déshydrogénation d'un lipide polyinsaturé en présence de radicaux issus de la décomposition du peroxy-nitrite (NO_2 , OH) (Trostchansky et al., 2001). La présence de CO_2 inhibe cette réaction en consommant le peroxy-nitrite, pour former des ions CO_3^- , incapables de diffuser dans la membrane (Rubbo et al., 2000) (**Figure 8**). Cette réaction conduit à un radical lipidique (L*) capable de s'oxyder pour former un radical peroxy (LOO*). Ces radicaux peroxy sont capables d'oxyder à leur tour d'autres lipides, initiant ainsi une réaction en chaîne amplifiant ce phénomène (propagation) (Halliwell and Gutteridge, 1985). Différents mécanismes interviennent dans la clôture de cette chaîne réactionnelle grâce à l'apparition de produits non radicalaires (Terminaison). Chez l'animal, le mécanisme le plus connu est la réduction des LOO* par l'α-Tocophérol (vitamine E) générant ainsi des hydroperoxydes lipidiques (LOOH) (Yamauchi, 1997). Les RNS interviennent également dans les processus de terminaison. En effet le NO est un important anti-oxydant à l'échelle lipidique (Rubbo et al., 2000). Le NO est capable d'interagir avec les radicaux lipidiques pour donner des nitrosolipides (LNO). Le NO peut également réagir avec le LOO* pour donner une espèce instable (LOONO) se dissociant en un radical alcoxy (LO*) pouvant réagir à son tour avec le NO afin de former le nitrite de lipide (LONO). Le LOONO peut également se recombiner en nitrolipide (LNO₂). Le LNO₂ est également directement formé suite à la réaction du NO_2 avec un radical lipidique. Ainsi, à l'échelle lipidique, le NO_2 présente

à la fois un rôle de pro-oxydant et d'anti-oxydant via son intervention dans l'initiation et la terminaison de ce processus (**Figure 9**). La formation de ces dérivés lipidiques semble impacter des mécanismes de signalisation cellulaire (Baker *et al.*, 2009; Coles *et al.*, 2002). Ceci s'expliquerait par le rôle important des lipides peroxydés (LOO^{*}) dans la formation de radicaux tyrosine, à l'origine de modifications post-traductionnelles de diverses protéines (Bartesaghi *et al.*, 2007, 2017). Les protéines représentent ainsi une autre cible du stress nitrosant dont les conséquences sur la physiologie cellulaire sont non négligeables. Toutefois à l'échelle bactérienne, seuls des acides gras saturés et mono-insaturés sont formés (O'leary, 1962). La nitrosylation et nitration des acides gras bactériens est donc peu probables. Néanmoins une exposition au NO induit d'importants changements morphologiques au niveau de l'enveloppe bactérienne de *E. coli* et de *P. aeruginosa* suggérant des détériorations des constituants l'enveloppe (Deupree and Schoenfisch, 2009).

2. Les modifications post-traductionnelles des protéines et oligopeptides

Les oxydes d'azote ainsi que leurs dérivés, notamment le peroxydite, présentent une forte réactivité au niveau de nombreuses protéines. À l'échelle protéique, les principales cibles du stress nitrosant sont les groupements prosthétiques métalliques ainsi que la chaîne latérale à résidus thiol ou groupements aromatiques de divers acides aminés (Alvarez and Radi, 2003; Bonini and Augusto, 2001). Ces modifications post-traductionnelles conduisent à des modulations de l'activité protéique en fonction de leurs localisations. L'ensemble de ces réactions conduisent à l'apparition de radicaux d'acides aminés, d'espèces nitrosylées ou nitrosées décrites ultérieurement. Les protéines ciblées par ces réactions sont, pour la plupart, essentielles pour le métabolisme cellulaire (TCA, phosphorylation oxydative, métabolisme du fer) ainsi que la signalisation et la réponse au stress nitrosant et/ou oxydant (**Chapitre 2, Partie 3**). Néanmoins ces altérations sont, pour la plupart, réversibles sous l'activité de protéines impliquées dans la détoxification et la réponse adaptative au stress nitrosant (**Chapitre 2, Partie 3**).

2.1. La nitration des groupements aromatiques, exemple des résidus tyrosine : d'excellents marqueurs du stress nitrosant

Les groupements aromatiques des acides aminés : tyrosine, tryptophane, phénylalanine, et histidine présentent une forte réactivité avec les RNS et ROS (Alvarez and Radi, 2003). Cette réactivité a été observée en présence des radicaux issus du peroxyxynitrite et conjugués. L'hydrolyse spontanée de l'ONOOH est très lente *in vivo* (Ferrer-Sueta and Radi, 2009). Ainsi, la présence de CO_2 (Bonini and Augusto, 2001), ou de centres métalliques oxydés (Campolo *et al.*, 2014), accélère la génération de radicaux à l'origine de ce processus. L'exemple le plus étudié est la nitrosylation de la tyrosine. Cette réaction correspond à une substitution d'un hydrogène par un groupement $-\text{NO}_2$ en position 3 du phénol. La nitrosylation des résidus tyrosine est induite indirectement par le peroxyxynitrite (ONOO^-). En effet, les radicaux résultants de l' ONOO^- ($^*\text{OH}$, $^*\text{NO}_2$, $\text{CO}_3^{\cdot-}$, lipides et centres métalliques oxydés) catalysent la première étape de la nitrosylation des résidus tyrosine (**Figure 10**).

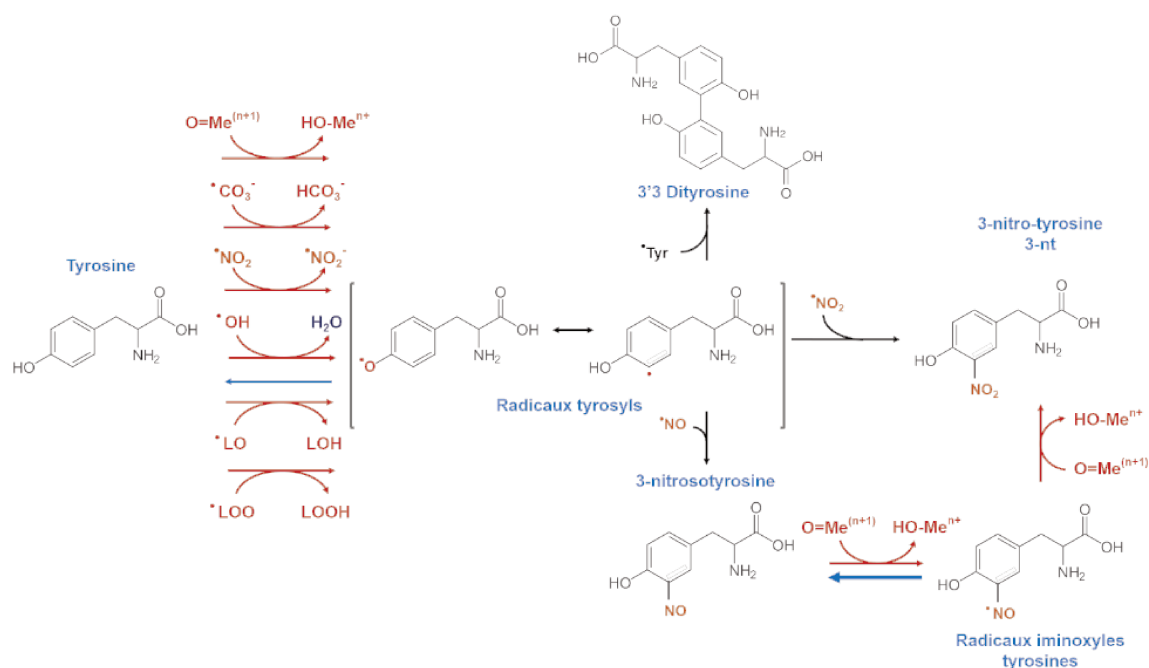


Figure 10 : Biogénèse de la 3-nitrotyrosine (3-nt) (adaptée de Bartesaghi et Radi, 2018). Les flèches rouges et bleues symbolisent respectivement les réactions d'oxydation et de réduction. $\text{O}=\text{Me}^{(n+1)}$: complexes métalliques oxydés ; $\text{HO}-\text{Me}^{n+}$: complexes métalliques réduits ; HCO_3^- : bicarbonate ; $^*\text{Tyr}$: radical tyrosine.

Cette réaction correspond à une déshydrogénation (oxydation) des résidus tyrosine en position 3 du cycle phénolique conduisant à la formation de radicaux tyrosyls (TyrO^{\cdot}). Le NO_2 interagit ensuite avec la lacune électronique précédemment formée pour donner la 3-nitrotyrosine (3-nt) (Ferrer-Sueta *et al.*, 2018). Une réaction parallèle peut avoir lieu entre le NO et la TyrO^{\cdot} générant des radicaux iminoxyles tyrosines (TyrNO^{\cdot}), intermédiaires

réactionnels instables. Ces derniers, par oxydation, conduisent également à la formation de la 3-nt (Radi, 2004).

La découverte de la 3-nt et la compréhension de sa biosynthèse a conduit à l'identification d'un marqueur du peroxy-nitrite (Ischiropoulos *et al.*, 1992). En effet, une augmentation de la concentration en 3-nt est observée dans de nombreuses pathologies humaines (maladies neuro-dégénératives, cardiovasculaires, immunitaires) (Pacher *et al.*, 2007). Sa détection peut être réalisée par colorimétrie. En effet, la nitration de la tyrosine conduit à un changement caractéristique de la couleur des protéines en jaune due à l'absorbance de la 3-nt à 420nm (pH 7,4) (Turan *et al.*, 2005). Par la suite, des anticorps spécifiques à la 3-nt ont été développés afin de quantifier l'apparition de résidus 3-nt (Ye *et al.*, 1996). Ces modifications peuvent engendrer des altérations de la fonction d'une protéine *i.e.* (i) une perte de fonction ou (ii) un gain de fonction. La perte de fonction nécessite qu'un grand nombre de cette même protéine soient nitrosylés. Néanmoins, *in vivo*, 1-5 résidus tyrosine sur 10 000 sont nitrosylés excluant ainsi cette hypothèse (Radi, 2004). De plus, la nitrosylation des tyrosines dépend de trois facteurs importants : (i) la localisation (ii) l'environnement et (iii) le processus de nitrosylation (Bartesaghi and Radi, 2018). En revanche, le gain de fonction nécessite qu'un petit nombre de protéines nitrosylées afin d'obtenir un signal substantiel. Plus récemment, un nouveau rôle a été attribué à l'apparition de 3-nt dans la modulation de la signalisation cellulaire. En effet, des résidus tyrosine sont impliqués dans les cascades de signalisation des tyrosines kinases (Bartesaghi *et al.*, 2007; Yakovlev and Mikkelsen, 2010).

2.2. Les résidus thiols dans la signalisation du stress nitrosant : exemple de la cystéine

Les résidus thiols sont constitués d'un atome de soufre (R-SH) nucléophile. Ces résidus sont retrouvés au niveau des chaînes latérales des acides aminés méthionine et cystéine (Alvarez and Radi, 2003). Ces résidus, de par leurs propriétés chimiques, présentent également une réactivité non négligeable avec les ROS et RNS. Le résidu thiol de la cystéine (-CH₂-SH) est l'un des exemples de cette réactivité, des plus étudiés (**Figure 11**).

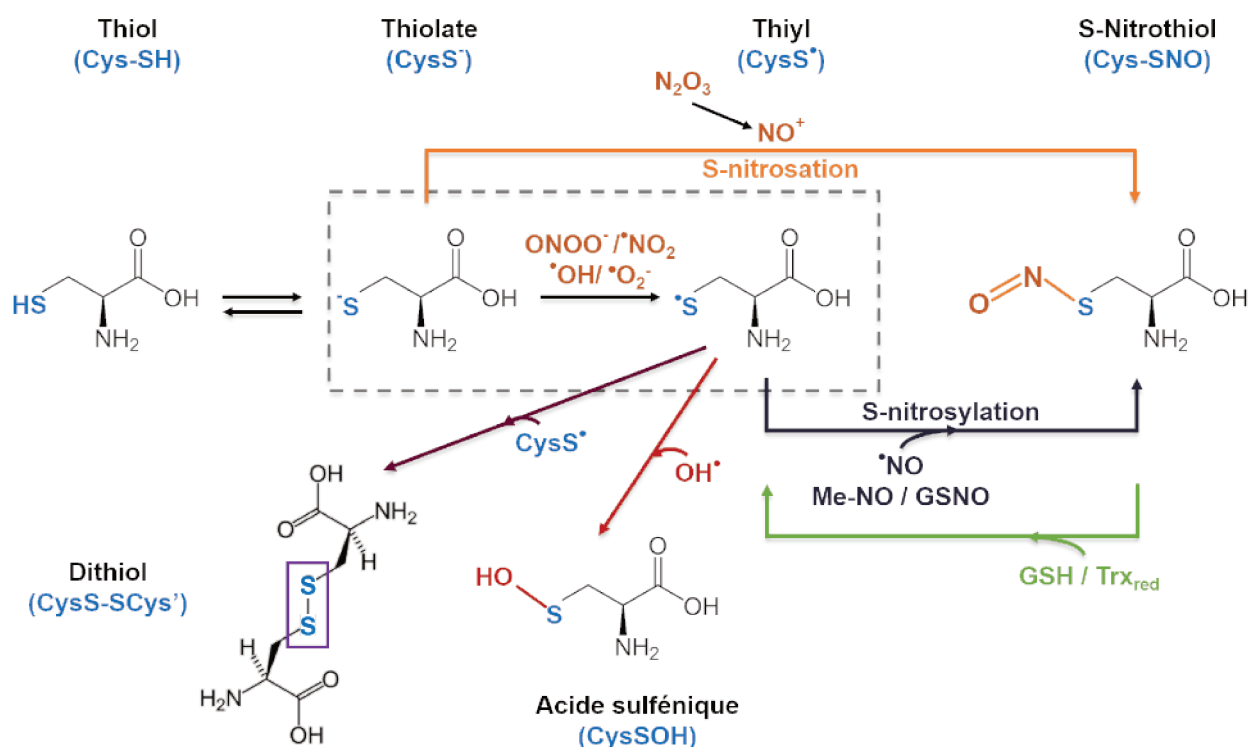


Figure 11 : Principales voies de formation des nitrothiols : exemple de l'acide aminé cystéine (adapté de Zaffagnini *et al.*, 2016).

GSH : glutathion ; GSNO : S-nitrosoglutathion ; Me-NO : complexe métallique nitrosylé ; Trx_{red} : thiorédoxine réduite ; l'encadré violet localise la formation de ponts disulfure.

En effet, de tous les acides aminés précédemment décrits pour leurs réactions avec le peroxy-nitrite, la cystéine est celle qui présente la vitesse de réactivité la plus rapide (Alvarez and Radi, 2003). De plus, ceci a été largement corrélé à des modulations de signalisation et de lutte contre le stress oxydant et nitrosant (*e.g.* GSH, OxyR), décrites ultérieurement (**Chapitre 2, Partie 3**) (Hausladen *et al.*, 1996; Hill and Bhatnagar, 2012). La cystéine est retrouvée sous deux formes : un tripeptide nommé glutathion (γ -L-Glutamyl-L-cysteinylglycine ; GSH) (Meister, 1995) et au sein de nombreuses protéines (*e.g.* OxyR) (Vázquez-Torres, 2012). Ainsi, le groupement sulfhydryle, protoné (thiol : R-SH) ou non (thiolate : R-S⁻), joue deux rôles importants à l'échelle protéique : (i) la structuration 3D via la formation de ponts disulfures (R-S-S-R') et (ii) leur fonctionnalité au niveau du centre actif de la protéine (Thornton, 1981). La forme oxydée des résidus thiolates (R-S⁻) présente une forte réactivité avec de nombreux agents oxydants de type ROS (HO^\bullet , O_2^\bullet et H_2O_2) et RNS (NO , NO_2 et ONOO^\bullet) conduisant à l'apparition de thiyl (R-S[•]) (Zaffagnini *et al.*, 2016). La lacune électronique des thiyls leur confère une réactivité accrue. Ainsi, deux résidus thiyl peuvent alors interagir, générant un pont disulfure. De plus, l'addition de HO^\bullet (oxydation) ou NO (S-nitrosylation) sur les thiyls génèrent respectivement, l'acide sulfénique (R-SOH) et le S-nitrosothiol (R-SNO) (**Figure 11**). La S-nitrosylation de la tyrosine est également médiée par des dérivés métalliques (Me-NO) (Campolo *et al.*, 2014), ou par le S-nitroglutathion (GS-NO)

(Hess *et al.*, 2005). Le R-SNO est également formé par la S-nitrosation de thiolates via un ion nitrosonium NO⁺ (S-nitrosation) (Zaffagnini *et al.*, 2016). Enfin, l'apparition de dérivé nitrocystéine sur le glutathion (G-SNO₂) est observée en présence de peroxy-nitrite (Balazy *et al.*, 1998). L'ensemble de ces réactions illustre une certaine interconnexion dans la réponse au ROS et RNS.

2.3. Les métaux hème et non-hème au centre de la réponse au stress nitrosant

Les métaux, principalement les métaux de transition, sont des constituants inorganiques essentiels à toute forme de vie. À l'échelle cellulaire, le fer (Fe), cuivre (Cu), zinc (Zn) et manganèse (Mn) sont les principaux métaux de transition exploités par la cellule (Ma *et al.*, 2009). La principale caractéristique de ces métaux est leur capacité à présenter différents états d'oxydation. Ceci est lié à la présence d'une orbitale moléculaire *d* partiellement remplie, leur permettant d'accepter un à plusieurs électrons dans cette sous-couche électronique (Schwarz, 2010). Naturellement présents dans l'environnement, l'import intracellulaire de ces métaux représente un point clef, finement régulé, afin d'assurer l'intégrité physiologique à l'échelle cellulaire. Cet import nécessite l'intervention de protéines piégeant et transportant ces métaux à l'intérieur de la cellule (*e.g.* sidérophores) ou permettant leur diffusion membranaire (porines, perméases, ABC transporteurs) (Ma *et al.*, 2009). Cependant, leur concentration intracellulaire doit être finement régulée en raison de leur toxicité (Becker and Skaar, 2014). À l'échelle cellulaire, ces métaux sont retrouvées sous deux formes : hème ou non-hème (libre ou sous forme de cluster) (Kesawat *et al.*, 2015; Outten and Theil, 2009) (**Figure 12A et B**). La forme hème est utilisée comme cofacteur protéique (métalloprotéines) et représente un excellent senseur de différents gaz diatomique. Un hème est constitué d'un anneau porphyrinique et d'un atome métallique, généralement de fer (Shimizu *et al.*, 2015) (**Figure 12A**).

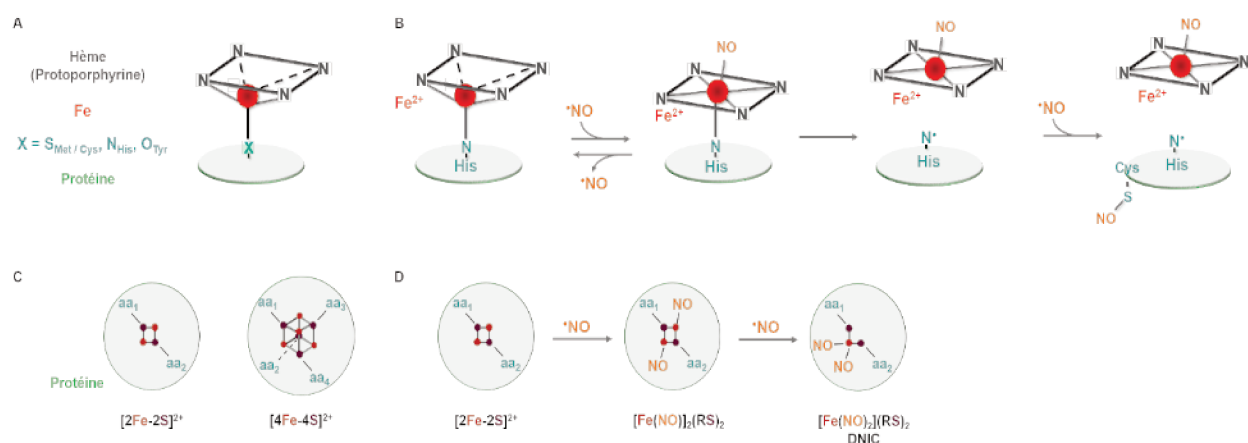


Figure 12 : Simplification de l'interaction entre le fer, sous ses différentes formes, et le NO (adaptée de (Gow *et al.*, 2004) et de Cruz-Ramos *et al.*, 2002).

A : Représentation d'une métalloprotéine appartenant à la famille des H-NOX (heme-nitric oxides/oxygene binding domain protein) B : Activation et désensibilisation de la Guanylate cyclase soluble (GCs) médiée par le NO. C : Représentation des clusters fer-soufre majoritairement retrouvés in vivo ; D : Formation de dérivé nitrosylés de cluster fer-soufre, exemple des DNIC (dinitrosyl iron cluster). Fe³⁺ : ion ferrique ; Fe²⁺ : ion ferreux ; X ou H : résidu d'acide aminé permettant la liaison entre le fer (Fe³⁺) et la protéine d'intérêt ; aa_n : acides aminés ; DNIC : « dinitrosyl iron cluster ».

Il existe différents types d'hèmes, néanmoins dans le contexte de ce travail seuls les hèmes senseurs de l'oxygène et du NO, communément appelés H-NOX (*Heme nitric oxide and/or oxygen binding protein*) (Plate and Marletta, 2013), seront abordés. L'un des exemples les plus étudiés est celui de la guanylate cyclase soluble (GCs) (**Figure 12B**). Cette protéine est largement utilisée pour la transduction de signaux physiologiques chez l'eucaryote (Depayras *et al.*, 2018). La GCs possède un hème ferreux (Fe²⁺) capable de fixer les radicaux NO (Derbyshire and Marletta, 2012). Cette fixation conduit à une modification de la structure de l'hème qui devient alors plan. Ce changement de conformation fragilise la liaison proximale du fer avec l'histidine servant à la coordination hème/protéine. Ce phénomène conduit à la libération de l'hème, puis l'activité de la GCs (apo-forme) grâce au à changement conformationnel de la partie protéique. Dans certains cas, l'excès de NO peut conduire à la S-nitrosylation de résidus soufre présents sur la partie protéique de ce complexe rendant alors la GCs insensible au NO (Sayed *et al.*, 2007). Alors les voies de signalisation engendrées par la GCs active sont abolies. Contrairement à l'oxygène, le NO est également capable de se fixer sur des hèmes ferrique (Fe³⁺) (Soldatova *et al.*, 2010). L'étude de la présence d'H-NOX chez les bactéries par homologie de séquence avec la GCs a permis de montrer la large distribution de ces protéines (Iyer *et al.*, 2003). Le gène codant pour une protéine H-NOX est retrouvé dans un opéron génique constitué généralement de gènes codant pour (i) une histidine kinase, (ii) un domaine de régulation, ou encore (iii) pour une enzyme impliquée dans la formation ou la dégradation du c-diGMP (Plate and Marletta, 2013). Environ 76% des H-NOX sont retrouvées sous forme libre et 24% sont associées à un domaine transmembranaire de protéines liées au chimiotactisme (MCP : *methyl-accepting chemotaxis proteins*) suggérant

leur implication dans la fuite des microorganismes face à un environnement inapproprié à leur développement. La fonction des protéines de type H-NO_x bactériennes a été associée à des processus de vie en communauté de la bactérie tels que la régulation du biofilm (dispersion) et du *Quorum sensing* (Plate and Marletta, 2013). Cette activité peut être directement liée à la protéine H-NO_x seule (système à un composant) ou conjointement à une histidine kinase (système à deux composants) activant diverses cascades de phosphorylation. Récemment, une H-NO_x (NosP), impliquée dans des phénomènes de dispersion du biofilm en condition anaérobie, a été décrite chez *P.aeruginosa* (Hossain and Boon, 2017).

Les clusters [Fe-S] représentent également une cible de choix des NO_x. En effet, le NO démontre une forte réactivité avec les centres fer de ces molécules. Plusieurs formes sont retrouvées *in vivo* telles que le [2Fe-2S], le [3Fe-4S] et le [4Fe-4S] (Crack and Le Brun, 2017) (**Figure 12C**). Ces groupements prosthétiques sont d'importants cofacteurs inorganiques de nombreuses protéines impliquées dans leur structuration sous forme de dimères ainsi que leur bon fonctionnement (Cruz-Ramos *et al.*, 2002). Les clusters fer-soufre interviennent à différents niveaux physiologiques tels que la respiration (ETC) ou la transcription, mais aussi dans les processus catalytiques notamment en réponse au stress oxydant (*e.g.* détoxification, signalisation). Leur importance biologique peut être également soulignée par leur ancestralité et leur ubiquité au sein du règne eucaryote et procaryote. Parmi ces protéines au fonctionnement lié à un cluster Fe-S, de nombreux facteurs transcriptionnels sont trouvés tels que le FNR (Fumarate nitrate regulator) (Cruz-Ramos *et al.*, 2002) IscR (iron sulphur cluster regulator) (Ayala-Castro *et al.*, 2008), OxyR (Kim *et al.*, 2002), SoxR (Gu and Imlay, 2011). Ainsi, ce sont d'importants senseurs des stress oxydant et nitrosant et transducteurs de signaux. La biogénèse des clusters [Fe-S] est réalisée par trois systèmes différents : Nif (Jacobson *et al.*, 1989) Isc (Zheng *et al.*, 1998) et Suf (Takahashi and Tokumoto, 2002). En règle générale, cette biogénèse est constituée d'une étape d'assemblage *de novo*, puis un transfert des groupements à une apo-protéine (inactive) conduisant à la formation d'une holo-protéine (active) (**Figure 13**).

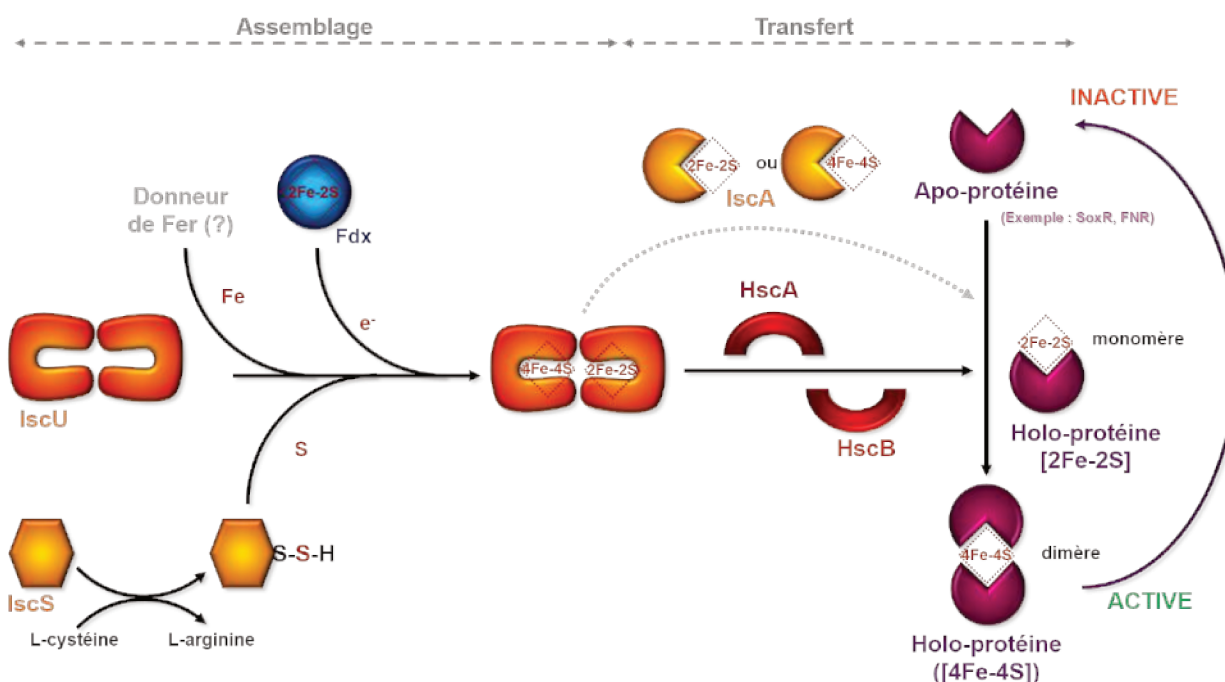


Figure 13 : Biosynthèse de groupement prosthétique fer-soufre par le complexe protéique Isc (adaptée de (Takahashi and Nakamura, 1999)).

IscU: protéine d'échafaudage; IscS: cystéine désulfurase; Fdx : Ferrédoxine ; IscA : protéine de transport; HscA/B : protéines chaperonne dans l'assemblage des groupements Fer-Soufre.

Le complexe Isc est l'un des complexes protéiques des plus étudiés, notamment chez *E. coli* (Ayala-Castro *et al.*, 2008), et des plus conservés (Fontecave and Ollagnier-de-Choudens, 2008). L'étape d'assemblage consiste à l'apport de soufre par une cystéine désulfurase (IscS), à une protéine d'échafaudage (IscU). En parallèle, un transfert concomitant de fer sur IscU est réalisé néanmoins l'origine du métal est actuellement indéterminée. L'étape de transfert nécessite l'intervention de protéines chaperonnes énergie-dépendantes (HscAB), et/ou de façon moins claire, d'une protéine de transport (IscA). L'interaction des clusters fer-soufre avec le NO conduit à la formation d'intermédiaires nitrosylés instables (Fitzpatrick and Kim, 2015). Cette modification entraîne alors une démobilisation des clusters fer-soufre (**Figure 12D**) dont les conséquences protéiques sont (i) une activation (Fur ; (Cruz-Ramos *et al.*, 2002)) ou (ii) une inhibition (SoxR ; (Ding and Demple, 2000)) de la fonction de la protéine suite à une modification conformationnelle.

3. Les RNS à l'origine d'altérations du matériel génétique

Bien que dès leur entrée dans la cellule, les RNS réagissent avec une grande variété de molécules (lipides, protéines), ils sont également capables d'altérer l'ADN (Burney *et al.*, 1999). Cette attaque est localisée sur les bases (purine et pyrimidine) des acides nucléiques et contribue à des détériorations notables de l'ADN (cassures, liaisons covalente). Par

conséquent, les RNS sont considérés comme d'importants agents mutagènes chez de nombreux organismes allant des bactéries (Guillemet *et al.*, 2016; Sidorkina *et al.*, 1997) aux mammifères (Zhuang *et al.*, 1998). Parmi l'ensemble des acides nucléiques attaqués par le stress nitrosant, le cas de la désoxyguanosine reste le plus étudié. Cet intérêt est suscité notamment : (i) par leur sensibilité aux ROS et RNS (Steenken and Jovanovic, 1997) ainsi que (ii) par l'utilisation de la 8-nitroguanine comme marqueur des nitrations sur l'ADN dans les urines (Sawa *et al.*, 2006). Les principaux RNS intervenant dans l'oxydation et la nitration de la guanosine sont le peroxyxynitrite, le trioxyde d'azote (N₂O₃) et l'acide nitreux (HNO₂) (**Figure 14**). Brièvement, les radicaux hydroxyles, notamment issus de l'hydrolyse de l'ONOOH, attaquent en position 8 du cycle de la base purine présente sur une molécule d'ADN simple brin (**Figure 14A**). Cette réaction conduit à la formation d'intermédiaires hydroxylés, puis oxydés de la conformation trans. Néanmoins l'encombrement stérique exercé par l'atome d'oxygène conduit à un changement de conformation de la 8-oxo-2'-désoxyguanosine (conformation syn) (Hamm *et al.*, 2005). Des atomes d'hydrogène sont alors masqués et ne peuvent permettre l'interaction classique inter-brins via des liaisons hydrogènes (Watson and Crick, 1953). Ainsi, deux atomes d'oxygène font face à cette zone d'interactions, à l'origine de liaisons covalentes inter-brins (Shapiro *et al.*, 1977). Ces liaisons covalentes vont nuire par la suite à la réplication et à la transcription de l'information génétique (Caulfield *et al.*, 1998). Un autre mécanisme associé au peroxyxynitrite, à l'origine de la nitration de la guanosine, existe également (**Figure 14A**). En effet, l'ONOO⁻ est capable de réagir en position 8 du cycle de la désoxyguanosine. Cette réaction conduit à la formation de dérivés diazonium instables subissant un changement conformationnel (trans ⇒ syn). Comme décrit précédemment, ces intermédiaires peuvent également être à l'origine de liaisons covalentes entre deux brins d'ADN. À plus long terme, une dépurination est observée, générant ainsi un site abasique et l'apparition de 8-nitroguanine (Yermilov *et al.*, 1995). Ces sites abasiques (squelette désoxyribosique résiduel) peuvent conduire à une cassure des brins d'ADN (Eastman and Barry, 1992) ou encore à des mutations en raison de transversions d'acides nucléiques lors de la réplication (G:C en A:T) (Loeb and Preston, 1986). Chez *E. coli*, le NO accélère également l'apparition de dommages oxydatifs de l'ADN (Woodmansee and Imlay, 2003). En effet, le NO via l'inactivation d'enzymes impliquées dans le cycle du citrate et dans la phosphorylation oxydative (**Figure 22**, **Figure 24**) engendre une accumulation de NADH intracellulaire. Le NADH réagit par la suite avec le FAD pour donner du FADH₂ (Woodmansee and Imlay, 2003). Enfin le FADH₂ est capable de réduire l'ion ferrique en ion ferreux à l'origine des réactions de Fenton en présence de H₂O₂ (**Figure 8**). Ainsi une forte quantité de radicaux hydroxyles formés vont conduire à des altérations de l'ADN.

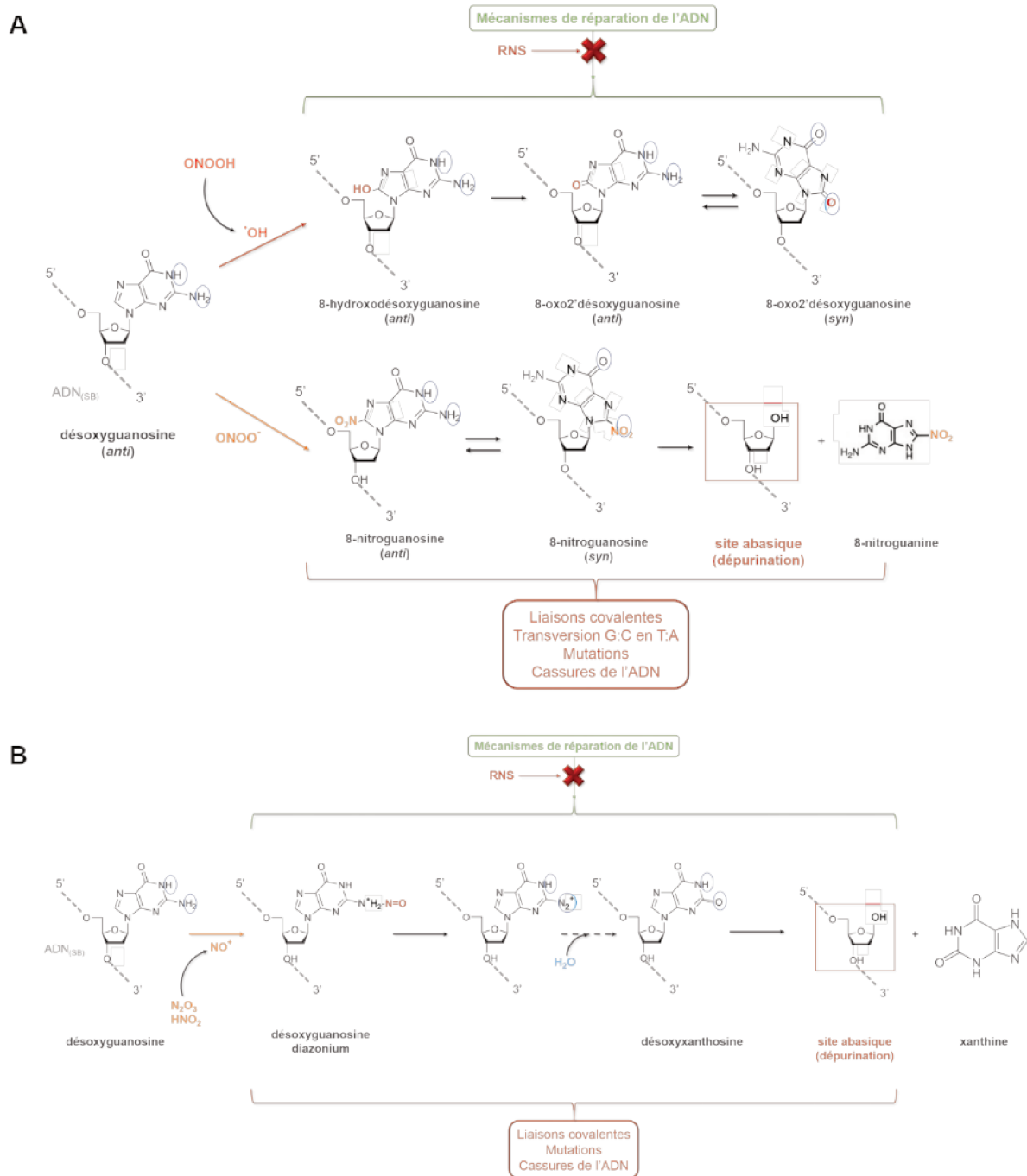


Figure 14 : Détériorations majeures de l'information génétique induites par les RNS : cas de la déoxyguanosine (adaptée de (Bhamra *et al.*, 2012; Nnate and Achi, 2016)).

(A) Mécanismes associés au peroxy-nitrite et conjugué. (B) Mécanismes liés au trioxyde d'azote (N_2O_3) et l'acide nitreux (HNO_2). Les flèches rouges et oranges représentent respectivement les réactions d'oxydation et de nitration de la base purine. Les cercles bleus localisent les sites de liaisons (hydrogènes ou covalentes) entre les bases des brins d'ADN. ADN_(SB) : ADN simple brin ; *anti* et *syn* : type de conformation de l'acide désoxyribonucléique ; G, C, T et A : acides nucléique guanine, cytosine, thymidine ou adénosine.

Enfin le trioxyde d'azote (N_2O_3) (Nnate and Achi, 2016) ou l'acide nitreux (HNO_2) (Hughes, 1999) génèrent, par hydrolyse, l'ion nitrosonium (NO^+), un puissant agent nitrosant. Le NO^+ conduit à la désamination de la déoxyguanosine en position 3 du cycle via la formation d'ion nitrosonium, intermédiaire instable (Caulfield *et al.*, 1998) (Figure 14B). Ainsi, la

désoxyxanthosine apparaît, puis subit rapidement une dépurination pour donner un site abasique et la xanthine (Nnate and Achi, 2016). De nouveau, des cassures des brins d'ADN ou encore des mutations peuvent être formées consécutivement. De plus, les RNS sont directement impliqués dans l'inhibition des mécanismes de réparation de l'ADN. En effet, ils sont à l'origine de modifications post-traductionnelles (S-nitrosylations) d'enzymes essentielles à la réparation de l'ADN modulant subséquemment leurs activités (Tang *et al.*, 2012).

4. La dégradation de matrices extracellulaires de polysaccharides : vers une anarchie du microenvironnement cellulaire

Les polysaccharides, présents au sein des matrices extracellulaires, jouent un rôle important dans la structuration (force, élasticité), le comportement social (adhésion, cohésion) et la protection (filtre) au niveau de divers tissus eucaryotes (Comper, 1996; Raines *et al.*, 2000), tout comme au sein des biofilms chez les procaryotes (Limoli *et al.*, 2015). Chez l'animal, ces polysaccharides sont des polymères anioniques linéaires constitués de motifs de disaccharides (acide uronique ou galactose + glucosamine) reliés par des liaisons osidiques de type β 1-3 et/ou β 1-4 (Mikami and Kitagawa, 2013; Sarrazin *et al.*, 2011). Ils sont retrouvés sous les termes de glycosaminoglycanes (GAG) sous forme libre (acide hyaluronique) ou conjuguée sulfatée (protéoglycanes) par liaison covalente à des protéines (chondroïtine-, héparane- ou kératane sulfate) (Hardingham and Fosang, 1992). L'étude de l'interaction des GAGs (acide hyaluronique, chondroïtine sulfate) avec des RNS, et notamment les dérivés du ONOO⁻/ONOOH (OH, NO₂, CO₃⁻), ont permis d'observer une fragmentation de deux GAGs, l'acide hyaluronique et le chondroïtine sulfate, dépendante du pH et de la concentration en peroxy-nitrite (Kennett and Davies, 2009). Cette fragmentation est principalement attribuée aux radicaux hydroxyles et serait liée à une déshydrogénation du 4^{ème} atome de carbone de l'acide uronique conduisant à la scission spécifique de la liaison osidique β 1-4 (Kennett and Davies, 2007) (**Figure 15**).

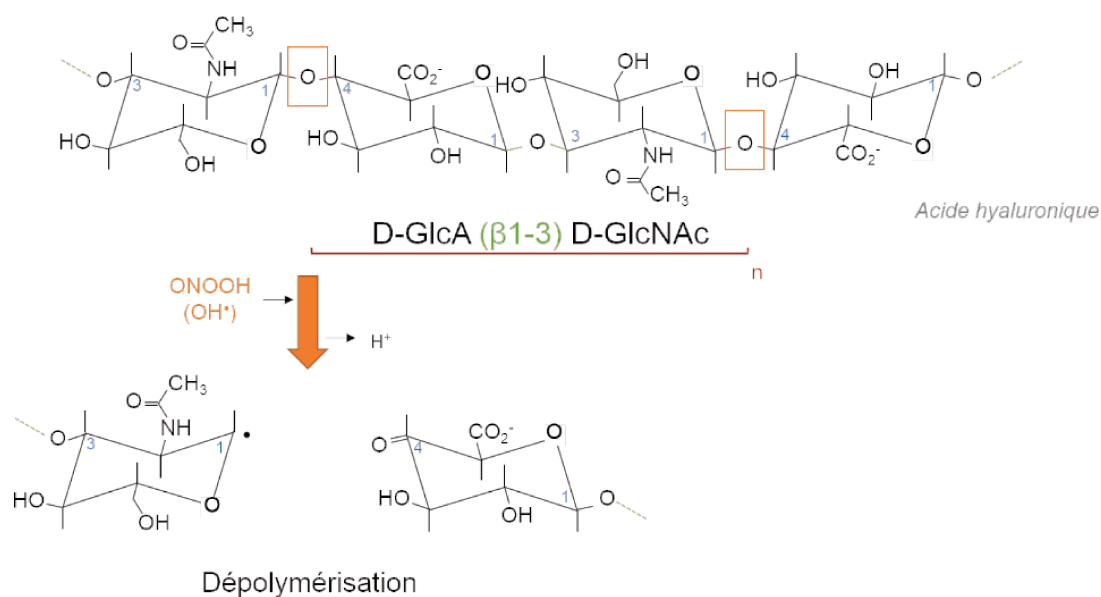


Figure 15 : Mécanisme hypothétique de la fragmentation des GAGs (e.g. acide hyaluronique) induite par le peroxynitrite (adaptée de (Kennett and Davies, 2009)).

En violet et en vert sont représentés respectivement les liaisons β1-4 et β1-3. Les encadrés oranges montrent les sites réactionnels des radicaux hydroxyles. n : sous-unités de disaccharides répétées ; D-GlcA : acide D-glucuronique ; D-GlcNAc : N-acétyl-D-glucosamine.

Ainsi, des radicaux d'oligomères apparaissent et sont constitués d'un nombre variable de sous-unités disaccharides (Kennett and Davies, 2009). Contrairement aux radicaux hydroxyles, l'anion carbonate et le dioxyde d'azote n'engendrent qu'une dépolymérisation limitée, ainsi qu'une extension de ce phénomène faible (Kennett and Davies, 2009). Le NO et l'acide nitreux semblent également impliqués dans ces phénomènes de fragmentation des GAGs (Hassan *et al.*, 1998; Vilar *et al.*, 1997). Bien que d'avantages d'études soient nécessaires, il est envisageable que le NO₂ puisse réagir avec les radicaux issus de cette fragmentation pour donner des nitro-hexoses (Kennett and Davies, 2009). La fragmentation des GAGs extracellulaires joue un rôle important dans le développement de nombreuses pathologies humaines (Rees *et al.*, 2008), notamment à cause de leur activité pro-inflammatoire, angiogénique et leur implication dans la signalisation cellulaire (Stern *et al.*, 2007). Cette fragmentation est notamment exacerbée dans des régions d'inflammation, lieux de forte production de ROS et RNS (Radi *et al.*, 2001).

À l'échelle des procaryotes, les polysaccharides sont des constituants essentiels de la matrice des biofilms bactériens. Il existe une grande variété d'exo-polysaccharides (EPS) classés dans deux familles, les homopolysaccharides (répétition du même ose) ou les hétéropolysaccharides (répétition d'au moins deux motifs osidiques différents), pouvant être ramifiés ou non (Ruas-Madiedo *et al.*, 2002). Dans le cadre de cette étude, seuls les EPS des *Pseudomonas sp.* seront abordés. Le genre *Pseudomonas* est connu pour produire trois types d'EPS : les alginates, Pel et Psl (Franklin *et al.*, 2011) (**Tableau 2**).

Tableau 2 : Principales caractéristiques des EPS produits chez *Pseudomonas sp.*

L-GulUA : acide L-gulonique ; D-O-Ac-ManU : acide O-acétyl-D-mannuronique ; D-Man : D-mannose ; L-Rha : L-Rhamnose ; D-Glc : D-glucose ; D-GalNAc : N-acétyl-D-galactosamine ; D-GlcNAc : N-acétyl-D-glucosamine.

EPS	Charge	Structure des sous-unités	Référence
Alginate	Négative	[L-GulUA] _m (β1-4) [(β1-4) D-O-Ac-ManU] _n	(Franklin <i>et al.</i> , 2011)
Psl	Neutre	[(β1-3) D-Man] _m (β1-3) [L-Rha(α1-3) D-Glc] (α1-2) D-Map	(Byrd <i>et al.</i> , 2009)
PeI	Positive	[D-GalNAc (1-4) D-GlcNAc] <i>(Partiellement déterminée)</i>	(Jennings <i>et al.</i> , 2015)

Selon l'état actuel de mes connaissances, aucune information n'est disponible concernant la réactivité de RNS et ROS avec ces EPS. Il est tout de même envisageable que des mécanismes semblables à ceux décrits précédemment chez les eucaryotes soient observables *in vivo*.

III. De la perception à la réponse au stress nitrosant, un processus d'adaptation et de tolérance

1. Les stratégies de déNOxification : principaux facteurs limitant le stress nitrosant

1.1. Les principaux régulateurs de la lutte anti-« nitro-oxydante »

Les bactéries sont capables de percevoir le stress oxydant par l'intermédiaires de divers facteurs de régulation notamment OxyR, SoxR/S, FNR et Fur largement décrits chez *E. coli* (Hillion and Antelmann, 2015; Seo *et al.*, 2014, 2015). L'ensemble de ces facteurs présentent des sites clefs (résidus thiols, cluster fer-soufre) sensibles aux ROS, pouvant conduire à une activation (*e.g.* OxyR, SoxR) ou désactivation (*e.g.* FNR, Fur) de la protéine. Les gènes ciblés par ces facteurs sont ainsi affectés par ces modifications post-traductionnelles. Conjointement, ces modifications vont conduire à des réadaptation du métabolisme bactérien en faveur d'une augmentation de la détoxification des ROS, de l'influx et du stockage de fer, de mécanismes de réparation (ADN, clusters fer soufre, ponts disulfures), de reprogrammation du métabolisme énergétique (TCA, Phosphorylation oxydative) ainsi que l'apparition de traits de virulence (sidérophore, antibiorésistance)

(Tableau 3). En présence d'un stress nitrosant, ces mêmes facteurs transcriptionnels voient leur activité altérée de manière similaire, illustrant ainsi l'extrême ambiguïté entre la réponse au stress oxydant et nitrosant. Bien que généralement retrouvés chez de nombreux genres bactériens, ces facteurs transcriptionnels présentent des régulons différents. En effet, chez *P. aeruginosa*, il est possible de noter par exemple l'absence de SoxS ainsi que d'importantes différences dans les gènes régulés (Kobayashi and Tagawa, 2004) (Tableau 3). Néanmoins, il semblerait que l'activité conjointe d'OxyR (Wei *et al.*, 2012), Fur (Cornelis *et al.*, 2009) et ANR (homologue de FNR) (Arai, 2011) chez *P. aeruginosa*, induit une réponse au stress oxydant et nitrosant similaire à celle observable chez *E.coli*.

En effet, ces trois facteurs induisent notamment : (i) une détoxification des ROS (catalase, peroxydase, superoxyde dismutase) et RNS (dénitrication), (ii) une reprogrammation du métabolisme énergétique (TCA) et relatif au fer (sidérophores) (iii) des mécanismes de réparation (ADN_{SB}, ponts disulfures, clusters fer-soufre), ainsi que (iv) l'expression de facteurs de virulence (biofilm, antibiorésistance, QS, sidérophores, toxines) (Tableau 3).

Tableau 3 : Comparaison des régulons respectifs d'OxyR et de SoxRS et Fur, et voies métaboliques associées, à la suite d'un stress oxydant et/ou nitrosant, chez *E.coli* et *P. aeruginosa*.

FT : Facteurs de transcription

Souche		<i>E. coli</i>		<i>P.aeruginosa</i>	
FT	Régulations	Gènes cibles	Voies métaboliques	Gènes cibles	Voies métaboliques
OxyR (Résidus cystéine)	Activation par oxydation ou nitrosylation de résidus cystéines	<i>katG, ahpCF</i>	Détoxification des ROS	<i>katA, katB-ankB, ahpB, ahpCF</i>	Détoxification des ROS
		<i>dps</i>	Réparation de l'ADN	<i>dps, recG</i>	Réparation de l'ADN
		<i>grxA, gorA, trxC</i>	Retrait de ponts disulfures	<i>trxA, trxB2</i>	Retrait de ponts disulfures
		<i>fur, hemH</i>	Métabolisme du fer	<i>pf4, ndIA</i>	Formation du biofilm
		<i>sufA-E</i>	Cluster fer-soufre	<i>rsaL</i>	Quorum sensing
		<i>metER</i>	Métabolisme des acides aminés	<i>pvdS</i>	Biosynthèse de sidérophores
		<i>mepM</i>	Synthèse du peptidoglycane	<i>rpsL</i>	Synthèse protéique
		<i>mntH, zinT, znuABC, mgtA</i>	Transport d'ions métalliques	<i>snr1 cyoA</i>	Phosphorylation oxydative
			<i>lpxC</i>	Synthèse de la paroi	

SoxR(S) ([2Fe-2S]) Activation par oxydation ou nitrosylation du cluster fer-soufre	<i>soxRS</i>			
	<i>sodA</i>	Détoxification des ROS	<i>mexGHI-ompD</i>	Antibiorésistance <i>Quorum sensing</i>
	<i>nfo, mutM</i>	Réparation de l'ADN		
	<i>acnA, fumC</i>	Cycle du citrate		
	<i>aroF</i>	Métabolisme des acides aminés	PA2274 (Monooxygénase putative)	Virulence ?
	<i>zwf</i>	Voie des pentoses phosphates		
	<i>acrAB</i>	Antibiorésistance	PA3718 (Pompe à efflux putative)	Virulence ?
	<i>lpxC, mepM</i>	Synthèse de la paroi		
	<i>zinT, znuABC, mgtA</i>	Transport d'ions métalliques		
Fur (Centre Fe ²⁺) Désactivation par diminution en fer ou formation de DNIC	<i>hmpA, sodA, sodC</i>	Détoxification des ROS et RNS	<i>sodA</i>	Détoxification des ROS
	<i>acnA, sucA-D, fumA, icd</i>	Cycle du citrate		
	<i>mutM</i>	Réparation de l'ADN	<i>fumC</i>	Cycle du citrate
	<i>sufA-E, rhyB</i>	Cluster fer-soufre	<i>prfF1, prfF2</i>	<i>Quorum sensing</i>
	<i>entA-F, fhuA-E, fepA-G, fecA-E, feoA-C, tonB, exbBD, cir, fiu</i>	Transport du fer	<i>pvdS, fpvA fpvB fpvI, fpvR pfeR, pfeA, fptA, pchR, brfrB</i>	Biosynthèse de sidérophores
	<i>entA-B</i>	Biosynthèse de sidérophores	<i>toxA, prpL</i>	Facteur de virulence
FNR ([4Fe-4S]) Désactivation par oxydation ou nitrosylation du cluster	<i>hmpA</i>	Détoxification des ROS et RNS	ANR (homologue) régulateur de la dénitrification (Partie régulation de la dénitrification) + <i>katA</i>	
	<i>norVW</i>	Dénitrification		
	<i>ytfE, cyoA-E, cydAB</i>	Respiration anaérobie		

1.2. La prévention de la formation de composés à fort pouvoir « oxydo-nitrosant »

Comme constaté précédemment, un lien très intrigant entre la réponse au stress oxydant et nitrosant existe. De plus, la forte réactivité entre ces espèces est dramatique pour la bactérie comme cela a été notamment reporté pour le peroxy-nitrite et son conjugué (ONOOH) ou encore pour le N₂O₃. Ainsi, il est essentiel pour la cellule de limiter en priorité l'interaction entre les ROS et RNS en diminuant la biodisponibilité de ces composés (e.g. via

des systèmes de chélation ou conversion). Diverses enzymes interviennent dans ce processus notamment la superoxyde dismutase A (SodA) régulée par Fur (Hassett *et al.*, 1996) ainsi que les catalases (KatA, Kat B) et les alkyl hydroxyperoxydases (AhpCF, AhpB) régulées par OxyR chez *P. aeruginosa* (Panmanee and Hassett, 2009; Wei *et al.*, 2012) (**Figure 16**).

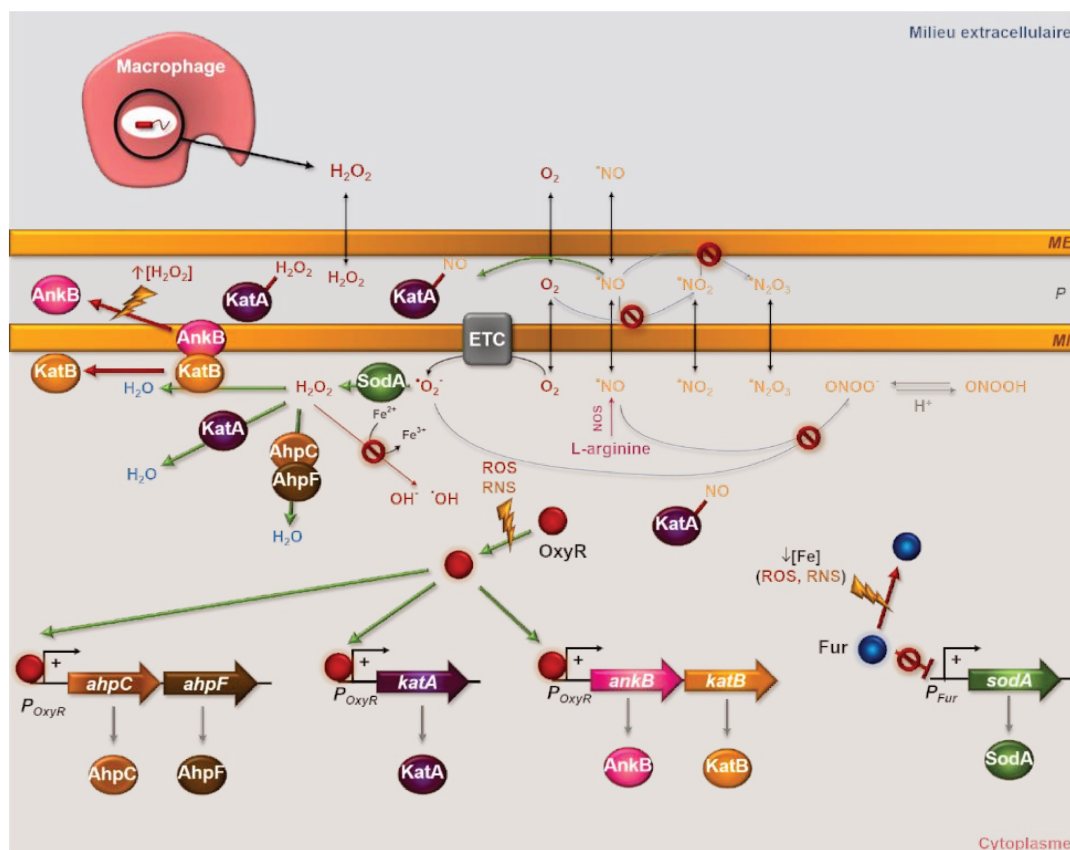


Figure 16 : Récapitulatif des stratégies préventives anti-NOx/ROS chez *P. aeruginosa* (adaptée de (Mishra and Imlay, 2012)).

ETC : chaîne de transfert d'électrons ; KatA, KatB : catalases A et B ; AnkB : ankyrine B ; AhpC, AhpF : alkyl hydroxyperoxydase ; SodA : Mn-superoxyde dismutase ; P_{OxyR} : promoteur inductible par OxyR ; P_{Fur} : promoteur réprimé par Fur, ME : membrane externe ; P : périplasma ; MI : membrane interne ; les éclairs représentent le stress oxydant, nitrosant ou la carence en fer ; les protéines illuminées représentent la forme active de la protéine, les symboles de sens interdit correspondent aux réactions chimiques ou enzymatiques inhibées en présence de ces stress.

L'un des composés les plus inquiétants dans la formation de RNS hautement toxiques est l'anion superoxyde (Radi *et al.*, 2000). Généré lors de la phosphorylation oxydative par l'ETC, l' $O_2^{\cdot-}$ réagit rapidement avec le NO, pour donner le peroxynitrite et son conjugué (Blough and Zafiriou, 1985), à l'origine d'altérations sur les contenus lipidiques, protéiques, métalliques, osidiques et nucléiques (**Chapitre 2, Partie 2**). Il est donc essentiel pour la cellule de détoxifier rapidement l'anion superoxyde. La première étape de cette détoxification consiste en la conversion de l' $O_2^{\cdot-}$ en H_2O_2 catalysée par des superoxyde dismutases dans le cytoplasme (Brunori and Rotilio, 1984). Chez *P. aeruginosa*, il existe deux types de superoxyde dismutases : SodA (cofacteur : Manganèse) et SodB (cofacteur : Fer) (Hassett *et*

al., 1996). En condition aérobie, et en présence de fer, SodB est majoritairement produite par *P. aeruginosa* pour lutter contre le stress oxydant. Néanmoins, en absence de fer, SodA prend le relais sur SodB. En effet, SodA est sous la dépendance du répresseur Fur. En absence de fer, Fur est inactivée, permettant ainsi la levée de répression exercée sur *sodA* (Hassett *et al.*, 1996).

Le peroxyde d'hydrogène est également un puissant agent oxydant, en particulier à l'échelle du contenu métallique (*cf* réaction de Fenton) (Winterbourn, 1995). Un arsenal d'enzyme a été décrit chez de nombreuses bactéries, notamment *P. aeruginosa*, intervenant dans la détoxification du H₂O₂ en H₂O et O₂. Chez *P. aeruginosa*, les catalases KatA et KatB, ainsi que les alkyl hydroxyperoxydases AhpC et AhpF, ont été identifiées pour leur activité peroxydase sous la dépendance du facteur transcriptionnel OxyR (Lee *et al.*, 2005; Ochsner *et al.*, 2000) (**Figure 16**). Les alkyl hydroxyperoxydases AhpC et AhpF sont codées par un opéron de deux gènes *ahpCF* dont l'expression est activée par OxyR en présence d'un stress oxydant (H₂O₂). Ces deux enzymes collaborent dans la catalyse du peroxyde d'hydrogène. En effet, AhpC décompose 2 molécules d'H₂O₂ en 2 H₂O et 2 O₂ à l'aide de son site catalytique constitué de cystéines. AhpF restore l'état d'oxydation d'AhpC via son activité thiorédoxine médiée par un site catalytique composé de cystéine et d'un domaine NAD(P)H oxydase. La catalase cytoplasmique KatB (Brown *et al.*, 1995) forme, tout comme KatA, un tétramère présentant un hème fer sur chaque sous-unité et un domaine NAD(P)H oxydase (Brown *et al.*, 1995). Le gène *katB*, codant cette catalase, est retrouvé en opéron avec *ankB* codant une ankyrine, protéine périplasmique dans la membrane interne, essentielle à l'ancrage et au fonctionnement optimal de KatB (Howell *et al.*, 2000). Néanmoins en présence d'un stress oxydant trop important, AnkB est démobilisée de la membrane cytoplasmique ce qui diminue l'activité de KatB. L'intervention de ces différentes enzymes est dépendante de l'état social dans lequel se trouve *P. aeruginosa*. En effet, à l'état planctonique, OxyR induit l'expression de l'opéron *katB-ankB*, tandis qu'à l'état biofilm l'opéron *ahpCF* est induit (Panmanee and Hassett, 2009). Enfin, KatA représente la catalase majoritaire chez *P. aeruginosa*, exprimée durant l'état planctonique et sessile de la bactérie (Lee *et al.*, 2005). Contrairement à KatB, KatA est présente principalement dans le périplasme et le cytoplasme de *P. aeruginosa* (Brown *et al.*, 1995). Le gène *katA* peut être induit par de multiples facteurs autres qu'OxyR (Lee *et al.*, 2005) : notamment ANR (Trunk *et al.*, 2009), IscR (Kim *et al.*, 2009) et plus récemment AlgR, régulateur des alginates sous la dépendance de AlgT(U) (Malhotra *et al.*, 2018). Enfin KatA est directement impliquée dans le masquage des NOx. En effet KatA pourrait chélater le NO, limitant ainsi sa biodisponibilité (Su *et al.*, 2014). Les mécanismes de régulation et l'activité de KatA illustrent parfaitement cette incroyable interconnexion entre le stress oxydant et nitrosant et plus subtilement l'implication indirecte du métabolisme du fer.

1.3. La conversion des NOx

L'une des premières stratégies pour remédier au stress nitrosant est tout simplement la conversion de ces composés en métabolites, moins, voire, inoffensifs pour la cellule. Le processus de dénitrification est le mécanisme le plus connu dans la conversion des NOx (**Figure 6**). Son expression est finement régulée par divers senseurs du stress nitrosant notamment ANR et DNR chez *Pseudomonas aeruginosa* (Arai, 2011). Cet aspect sera abordé plus en détails ultérieurement. Un autre mécanisme, largement décrit chez *E. coli*, nécessite l'intervention d'une flavohémoglobine, nommée Hmp chez cette espèce (Cruz-Ramos *et al.*, 2002). La protéine Hmp est monomérique et présente une structure particulière. En effet, cette enzyme présente trois domaines distincts et très conservés: (i) un domaine de liaison au FAD (en position N terminal), (ii) un domaine de liaison au NADH, (iii) un domaine globine contenant un hème fer (en position C terminal) (Ilari *et al.*, 2002) (**Figure 17A**). Le fonctionnement de cette enzyme est dépendant de la concentration en O₂. En effet en condition aérobie, la flavohémoprotéine Hmp présente une activité NO dioxygénase (Gardner *et al.*, 1998a) (**Figure 17C**). Brièvement, Hmp fixe une molécule d'oxygène au niveau de son hème ferreux. L'anion superoxyde est ensuite attaqué par le NO pour donner un intermédiaire réactionnel de type peroxyne. Le domaine de liaison au NAD présente une activité NAD(P)H oxydase générant un électron transmis au fer via le domaine FAD. Le dérivé peroxyne formé subit un réarrangement en nitrate (NO₃⁻) plus stable et se dissocie de l'hème fer oxydé (Fe³⁺). L'hème ferrique est converti sous sa forme Fe²⁺ par transfert d'électrons générés à nouveau sous l'activité de la NAD(P)H oxydase. L'activité NO dioxygénase de la Hmp offre ainsi une protection à l'aconitase (Gardner *et al.*, 1998b) et aux protéines impliquées dans la chaîne respiratoire (Stevanin *et al.*, 2000) chez *E. coli* en présence de stress nitrosant.

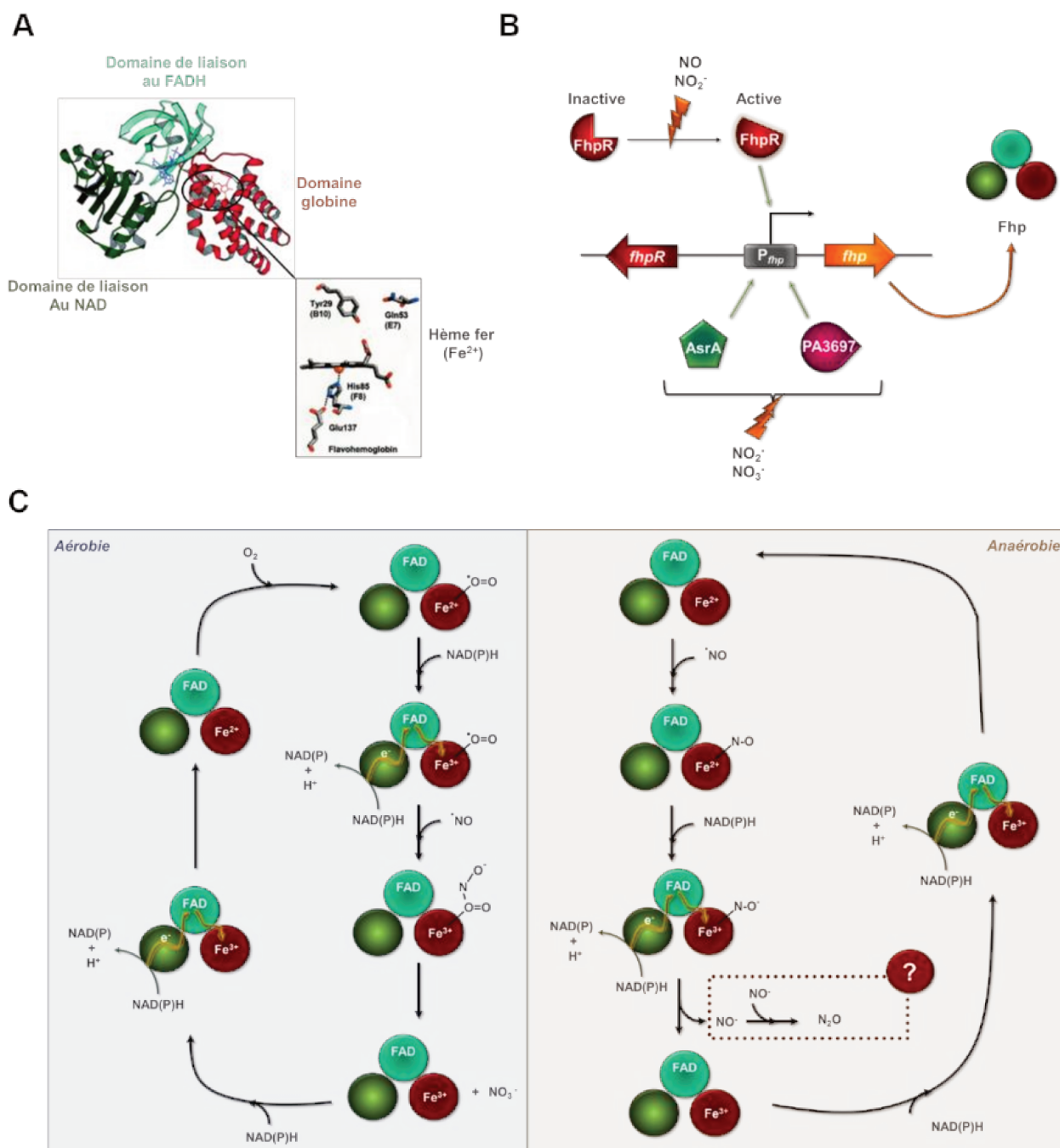


Figure 17 : Structure, régulation et fonctions de la flavohémoprotéine.

A : Structure de la flavohémoprotéine (Hmp) chez *E. coli* (adaptée de (Ilari *et al.*, 2002)) ; B : Régulation du gène codant la flavohémoglobine (Fhp) chez *P. aeruginosa* (adaptée de (Koskenkorva-Frank and Kallio, 2009)) ; C : Simplification des fonctions physiologiques de la flavohémoprotéine (Hmp) chez *E. coli* (adaptée de (Kim *et al.*, 1999)). NAD : nicotinamide adénine dinucléotide ; NAD(P) et NAD(P)H : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate ; FAD : Flavine adénine dinucléotide ; FhpR : facteur transcriptionnel régulant l'expression du gène *fhp* ; P_{fhp} : région promotrice du gène *fhp* ; AsrA ; protéase ATP-dépendante ; PA3697 : Protéine hypothétique intervenant dans la régulation de l'expression du gène *fhp*.

La protéine Hmp présente également une activité NO réductase en condition anaérobie (Kim *et al.*, 1999). Ce processus consiste en la nitrosylation d'hème ferreux en présence de NO. Comme mentionné précédemment, l'activité de la NAD oxydase conduit à un transfert

d'électron jusqu'au fer de l'hème générant par la suite un dérivé de protoxyde d'azote. La suite du mécanisme conduisant au N₂O est encore incertaine. Kim *et al.*, (1999) ont proposé l'hypothèse d'une dissociation du NO⁻ avec l'hème ferrique. Le NO⁻ se dimériserait pour former par la suite le N₂O de manière non enzymatique (Weitzberg and Lundberg, 1998). En plus de la protection offerte contre le NO, la Hmp est également impliquée dans la protection contre les ROS (Koskenkorva-Frank and Kallio, 2009).

Bien que principalement décrite chez *E. coli*, la flavohémoprotéine est largement distribuée dans de nombreux genres bactériens (Poole and Hughes, 2000) notamment chez *P. aeruginosa* (Arai *et al.*, 2005) et également *P. fluorescens* (Frey and Kallio, 2003). Chez les *Pseudomonas sp.* cette flavohémoprotéine, nommée Fhp, présente une identité de 41% avec la protéine Hmp (Koskenkorva *et al.*, 2008). Bien qu'inductible en présence de stress nitrosant, la régulation de la protéine Fhp diffère de celle connue pour Hmp chez *E. coli*. En effet, chez *E. coli*, les facteurs transcriptionnels régulant Hmp sont FNR (Cruz-Ramos *et al.*, 2002), MetR (Membrillo-Hernández *et al.*, 1998) et Fur (Crawford and Goldberg, 1998). Chez *P. aeruginosa*, la régulation de *fhp* (PA2664) est principalement médiée par le facteur transcriptionnel σ 54-dépendant, FhpR, similaire à 50% de NorR chez *E. coli*. Le gène *fhpR* (PA2665) est localisé en amont, dans l'orientation opposée, de *fhp* (Koskenkorva *et al.*, 2008) (**Figure 17B**). Deux autres régulateurs, AsrA (PA0779), une protéase ATP-dépendante ainsi qu'une protéine hypothétique (PA3697), sont également impliquées dans la régulation de *fhp*. Le mécanisme d'activation de ces différents facteurs en condition de stress nitrosant n'est actuellement pas connu. Néanmoins, leur induction serait médiée par le NO et NO₂⁻ pour FhpR, et par les nitrates et nitrites pour AsrA et PA3697 (Koskenkorva *et al.*, 2008). Il est intéressant de noter qu'AsrA est impliquée également dans la protection, à court-terme, contre des fortes doses de tobramycine chez *P. aeruginosa* (Kindrachuk *et al.*, 2011).

2. Les réparations des dommages liés au stress nitrosant

2.1. La réparation des résidus thiols

À l'échelle protéique, les résidus thiols, présents sur la cystéine et la méthionine (Alvarez and Radi, 2003), sont soumis à de nombreuses altérations induites par les stress oxydant et nitrosant (**Chapitre 2, Partie 2**). Ces modifications post-traductionnelles conduisent à une modification fonctionnelle des protéines ciblées dont les répercussions sont ressenties au niveau physiologique. Ainsi il est donc vital pour la cellule de réparer ces dommages. Deux grands systèmes sont connus pour intervenir dans ces processus de détoxification : le glutathion et enzymes associées (Benhar *et al.*, 2009) ainsi que les thiorédoxines (Zeller and

Klug, 2006). Le glutathion est un tripeptide constitué de l'enchainement des acides aminés glutamate-cystéine-glycine (Meister, 1995) (**Figure 18A**).

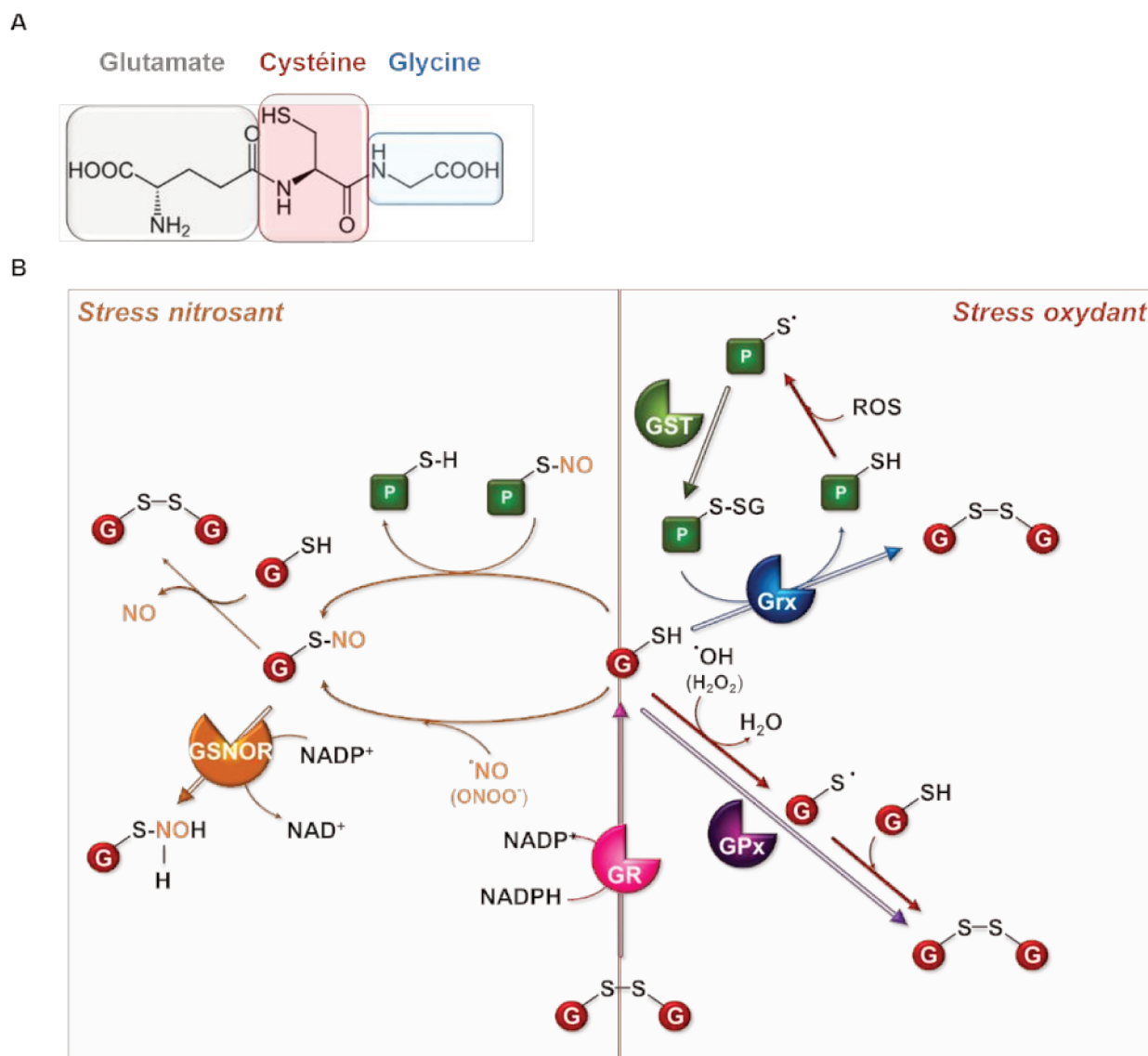


Figure 18 : Simplification du cycle du glutathion et son importance dans la réponse au stress oxydant et nitrosant (adaptée de (Smirnova and Oktyabrsky, 2005)).

A. Structure du glutathion. B. Cycle du glutathion en réponse à divers stress. GSH : glutathion réduit ; GS-SG : disulfure de glutathion ; GS-NO : S-nitrosoglutathion ; GS[•] : glutathion radicalaire; P : protéine ; Grx : glutarédoxine ; GR : glutathion réductase ; GPx : glutathion peroxydase ; GSNOR : S-nitrosoglutathion réductase; GST : glutathion S- transférase ; ROS : espèces réactives de l'oxygène.

Le résidu thiol présent sur la cystéine du glutathion présente un pouvoir réactionnel important avec les ROS et RNS. Cette réactivité est largement exploitée par la cellule via un arsenal de diverses enzymes associées au GSH, impliquées dans la réparation des résidus thiols et la détoxification de composés oxydants et/ou nitrosants (*e.g.* H_2O_2 , ONOO^\cdot) (**Figure 18B**). Bien que largement décrit dans la cellule eucaryote (Benhar *et al.*, 2009), peu de bactéries (Gram négatif en majorité) , sont capables de synthétiser le glutathion, précurseur

de l'ensemble de ces réactions (Fahey *et al.*, 1978). Ces mécanismes, reportés notamment chez *E. coli* (Loewen, 1979), sont néanmoins très conservés (Masip *et al.*, 2006). Brièvement, en présence de stress oxydants (*e.g.* H₂O₂), le glutathion est oxydé et se retrouve sous sa forme radicalaire (G-S[•]) (**Figure 18B**). Ces radicaux peuvent réagir par la suite avec d'autres glutathions générant un dimère de glutathions liés de manière covalente par des ponts disulfures (disulfure de glutathion ; GS-SG). Cette réaction est catalysée par la glutathion peroxydase (Arenas *et al.*, 2010). En parallèle un grand nombre de radicaux thiyl (RS[•]) sont formés sur des protéines en présence du stress oxydant. Ces radicaux thiyl subissent alors une glutathionylation (ajout d'un adduit glutathion) catalysée par la glutathion S-transférase (GST) (Iizuka *et al.*, 1989). Ces produits conjugués sont dissociés par la glutarédoxine (Grx) générant ainsi du GS-SG et une protéine fonctionnelle (P-SH) (Aslund *et al.*, 1994). Le stress nitrosant, principalement médié par le peroxy-nitrite, est également à l'origine de la modification des résidus thiols. En effet les radicaux NO réagissent avec le glutathion pour donner des S-nitrosoglutathions (**Figure 18B**). Le S-nitrosoglutathion peut également être formé par transfert d'un groupement NO, présent sur une protéine S-nitrosylée, permettant ainsi le retour de la protéine sous sa forme fonctionnelle (Jarboe *et al.*, 2008). Deux types de réactions ont été décrits concernant le devenir du GS-NO : (i) la formation de GS-SG via son interaction avec un autre glutathion (ii) sa réduction catalysée par une S-nitrosoglutathion réductase (GSNOR) formant un intermédiaire réactionnel instable (S-hydroxylaminoglutathion, GSNHOH), qui se réarrange en GSSG et hydroxylamine (NH₂OH) (Liu *et al.*, 2001). Enfin, le glutathion réductase catalyse le recyclage du GSSG en GSH (Scrutton *et al.*, 1987). L'ensemble de ces mécanismes permet de limiter l'impact des stress oxydant et/ou nitrosant.

Malgré la faible distribution du mécanisme associé au glutathion, un grand nombre de bactéries sont capables de survivre aux stress oxydant et nitrosant. Cela souligne l'implication d'un autre mécanisme. L'un des systèmes les plus conservés au sein de nombreuses espèces bactériennes est la thiorédoxine (Trx) (Zeller and Klug, 2006). La Trx est une petite protéine dont la séquence du site catalytique (Cys-Gly-Pro-Cys) est très conservée (Martin, 1995). La thiorédoxine est indirectement impliquée dans de nombreuses fonctions physiologiques dont la réponse au stress oxydant en interagissant notamment avec OxyR (Ritz *et al.*, 2000) et SoxR (Ding and Dimple, 1998). Pour plus d'informations concernant les divers rôles physiologiques de la thiorédoxine, le lecteur peut se reporter à la revue de Zeller et Klug (Zeller and Klug, 2006). La thiorédoxine est également impliquée dans la réparation de nombreuses protéines lors de stress oxydant et/ou nitrosant (Monteiro *et al.*, 2017) (**Figure 19**).

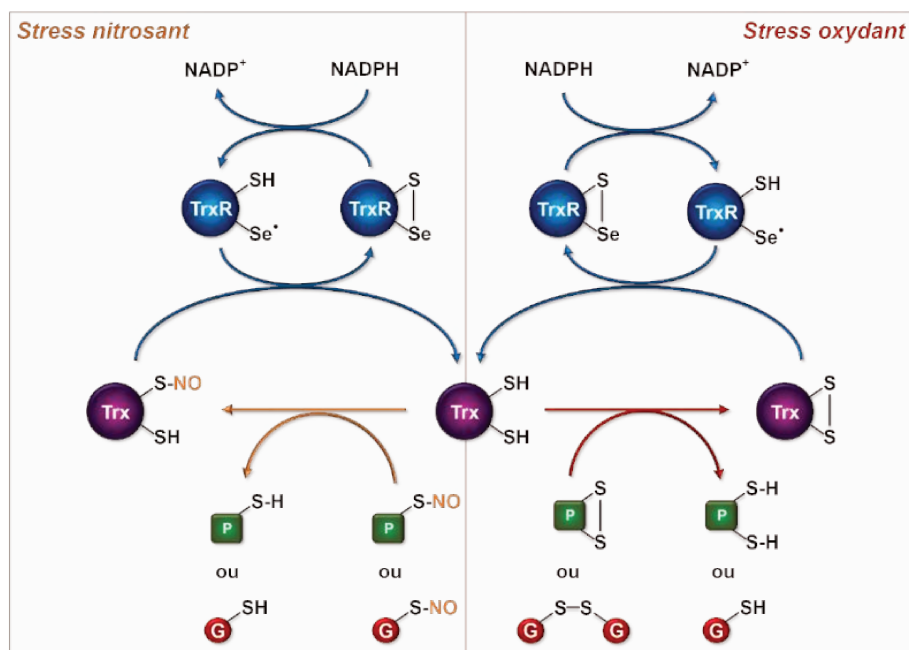


Figure 19 : Implication de la thiorédoxine dans la détoxification des ROS et RNS (adaptée de (Monteiro *et al.*, 2017)).

Trx : thiorédoxine ; TrxR : thiorédoxine réductase, P : protéine ; G : glutathion

La thiorédoxine, par l'intermédiaire de la thiorédoxine réductase, présente un comportement réactionnel proche de celui du glutathion et enzymes associées. En effet, la thiorédoxine est capable de dénitrer ou de retirer des ponts disulfures, rencontrés respectivement lors de stress nitrosant ou oxydant, sur diverses protéines et également le glutathion (Monteiro *et al.*, 2017). Ces réactions conduisent à la formation de thiorédoxine nitrosylée (Trx-SNO) ou de disulfure de thiorédoxine (Trx-S₂). Ces deux formes de thiorédoxine sont recyclées sous une forme réduite (Trx-SH₂) par la thiorédoxine réductase (TrxR) via son résidu sélénocystéine (Monteiro *et al.*, 2017). Enfin la TrxR utilise du NADPH pour revenir à sa forme réduite et être à nouveau opérationnelle. En plus de la superposition de ces deux mécanismes précédemment détaillés, il est intéressant de noter une co-régulation de ces deux systèmes, médiée par le facteur de transcription OxyR en réponse au stress oxydant (Prieto-Alamo *et al.*, 2000; Seo *et al.*, 2015).

2.2. La réparation de l'ADN

Parmi l'ensemble des RNS, deux espèces, l'ONOO⁻ et le N₂O₃, sont connus pour leur fort pouvoir délétère sur l'intégrité de l'information génétique (ADN) (Bartesaghi *et al.*, 2011). En effet, ces dérivés induisent des modifications chimiques au niveau des bases purines et pyrimidines de l'ADN simple brin durant les processus de réplication et de transcription (**Figure 8**). Ces modifications conduisent principalement à la conversion des bases adénine, cytosine et guanine en hypoxanthine, uracile et xanthine respectivement. L'ensemble de ces altérations

de l'information peuvent potentiellement conduire à de nombreuses mutations si non réparées (Caulfield *et al.*, 1998). Chez *E. coli*, trois grands systèmes interviennent dans la réparation des dommages à l'ADN suite à un stress nitrosant : la voie BER (*Base Excision Repair*), la voie SOS et la voie HR (*Homologous recombination*) (Spek *et al.*, 2001) (**Figure 20**). Brièvement, ces bases anormales sont éliminées par hydrolyse spontanée (Gates, 2009) ou par un mécanisme BER de réparation de l'ADN, processus largement conservé au sein des procaryotes (van der Veen and Tang, 2015). La voie BER fait intervenir des glycosylases spécifiques à chaque type de bases endommagées (Laval *et al.*, 1998). L'action des glycosylases sur les bases endommagées conduit à l'apparition de sites AP (apyrimidine, apurique). Les squelettes désoxyribose phosphatés sont ensuite clivés sous l'action d'endonucléases AP (exonucléase III, endonucléase IV). Enfin, les bases délétées sont resynthétisées via une ADN polymérase et liées au brin d'ADN par une ligase (**Figure 20**). Néanmoins, dans l'ensemble de la voie BER, seule l'exonucléase III est essentielle à la résistance face au NO (Spek *et al.*, 2001). Dans le cas de non réparation des fragments d'ADN_(SB) générés par l'endonucléase, un mésappariement entre les brins d'ADN peut avoir lieu. Dans ce cas, la voie HR permet la réparation du brin d'ADN via les recombinaisons (RecBCD) clivant l'extrémité du brin altéré. La recombinaison A et des protéines SSB (*Simple Strand Binding protein*), impliquées dans la stabilisation du brin d'ADN, sont alors recrutées sur la partie d'ADN_(SB). RecA va alors rechercher une homologie de séquence sur l'ADN répliqué. Enfin, les protéines RuvA, RuvB et RecG vont permettre de réparer la séquence endommagée (Bianco *et al.*, 1998) (**Figure 20**). Chez *E. coli*, la voie HR semble être essentielle à la résistance au stress induit indirectement par le NO sur l'information génétique (Spek *et al.*, 2001). De plus, la délétion de RecA conduit à une augmentation de la sensibilité au NO chez *E. coli*. RecA intervient dans une voie supplémentaire, bien spécifique aux procaryotes, dénommée voie SOS qui est induite notamment en présence d'ADN_(SB) lors d'une exposition au NO (Lobysheva *et al.*, 1999). Cette voie fait intervenir également la recombinaison A qui se polymérise au niveau des sites de coupure. Par la suite, RecA déclenche l'autoclivage du répresseur LexA, dont le régulon est ainsi exprimé et est constitué principalement de gènes impliqués dans la réparation de l'ADN (Friedberg *et al.*, 1995) (**Figure 20**).

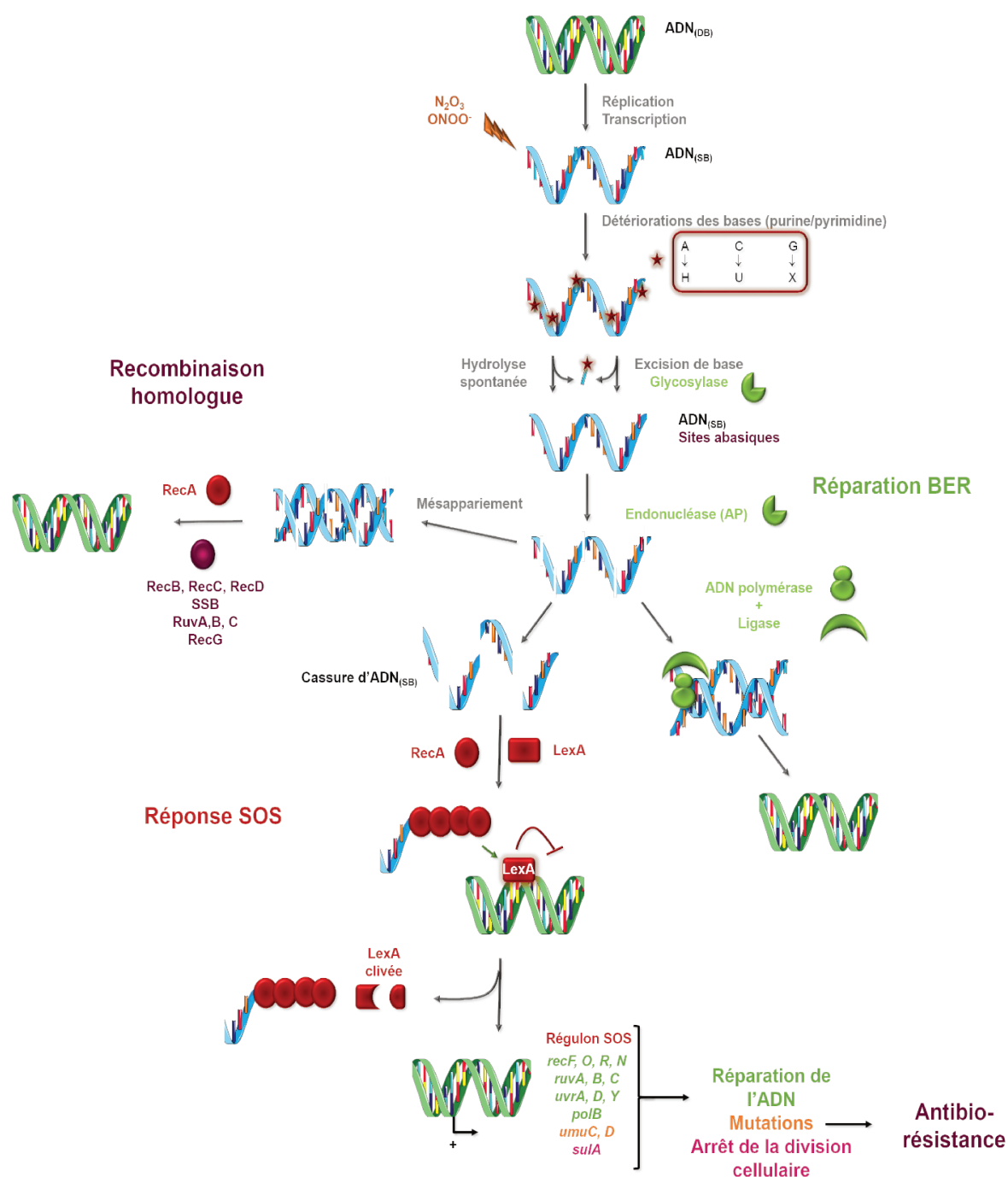


Figure 20 : Mécanismes impliqués dans la réparation de l'ADN_(SB) suite à un stress nitrosant chez *E. coli* (adaptée de (Spek *et al.*, 2001)).

ADN_(DB) : ADN double brin ; ADN_(SB) : ADN simple brin ; H, U, X : hypoxanthine, uracile, xanthine. L'éclair représente les dommages indirectement induits à l'ADN par les RNS (N_2O_3 , ONOO^-). Les étoiles rouges représentent les lésions des bases purines et pyrimidines.

Parmi les gènes régulés par le répresseur LexA, *umuCD* code pour l'ADN polymérase V dont la faible fidélité occasionne de nombreuses mutations (Janion, 2008). Certains antibiotiques, tels que la ciprofloxacine, induisent la voie SOS à l'origine de nombreuses mutations pouvant conduire à l'apparition de phénotypes d'antibiorésistance (Cirz *et al.*, 2005). Chez *P. aeruginosa* le régulon de LexA est encore en cours d'identification (Cirz *et al.*, 2005)

néanmoins l'activation de la voie SOS conduit à la formation de vésicules de membrane externe contenant des facteurs de virulence à l'origine de cytotoxicité (Maredia *et al.*, 2012). Enfin, chez *E. coli*, l'expression de *sulA* est induite lors de l'activation de la voie SOS et conduit à l'arrêt transitoire de la division cellulaire (Trusca *et al.*, 1998).

2.3. La réparation des clusters fer-soufre

Comme abordé précédemment, les NO_x présentent un fort pouvoir réactionnel sur les clusters, notamment de type fer-soufre (**Chapitre 2. Partie 2**). La modification de ces groupements prosthétiques a des conséquences parfois sévères sur le fonctionnement de nombreuses protéines. Il est donc essentiel pour la cellule de réparer ces clusters. Ainsi la cellule présente un grand nombre de protéines senseurs du stress nitrosant, elles-mêmes constituées de clusters fer-soufre tels qu'OxyR (Kim *et al.*, 2002), IscR (Ayala-Castro *et al.*, 2008) et Fur (Cruz-Ramos *et al.*, 2002). Ces trois protéines sont d'importants facteurs transcriptionnels impliqués dans la régulation de la biosynthèse des clusters fer-soufre (Ayala-Castro *et al.*, 2008). Cette biogénèse est co-orchestrée par les complexes protéiques issus des opérons *iscRSUABhscABfdXiscX*, permettant l'acquisition de clusters fer-soufre, (Ayala-Castro *et al.*, 2008; Zheng *et al.*, 1998) et *sufABCDSE* (Takahashi and Tokumoto, 2002), favorisant l'assimilation du soufre, chez *E. coli* (**Figure 21**). Brièvement, en conditions normales, les gènes de l'opéron *isc* sont réprimés par l'holo-forme du régulateur IscR (Giel *et al.*, 2013). En absence de fer, ou en présence de stress oxydant et/ou nitrosant, les clusters fer-soufre sont altérés. Ces différents stress provoquent notamment le passage d'IscR sous son apo-forme (absence de cluster fer-soufre). Ainsi, Apo-IscR n'est alors plus capable d'inhiber la transcription de l'opéron génique *isc* et active en parallèle l'expression de l'opéron *suf* (Yeo *et al.*, 2006). OxyR, en présence de stress oxydant et/ou nitrosant, subit une modification de ces résidus thiol conduisant à une restructuration de la protéine. Cette dimérisation conduit à une activation d'OxyR, ainsi capable d'induire l'opéron *suf* (Zheng *et al.*, 2001). Enfin Fur, protéine senseur impliquée dans le contrôle de la concentration intracellulaire en fer, n'est plus capable d'inhiber l'opéron *suf* en présence de ces divers stress (Outten *et al.*, 2004). Fur est également impliquée dans l'inhibition de l'expression du petit ARNm RhyB connu pour réprimer l'expression d'*isc* (Masse and Gottesman, 2002; Massé *et al.*, 2005).

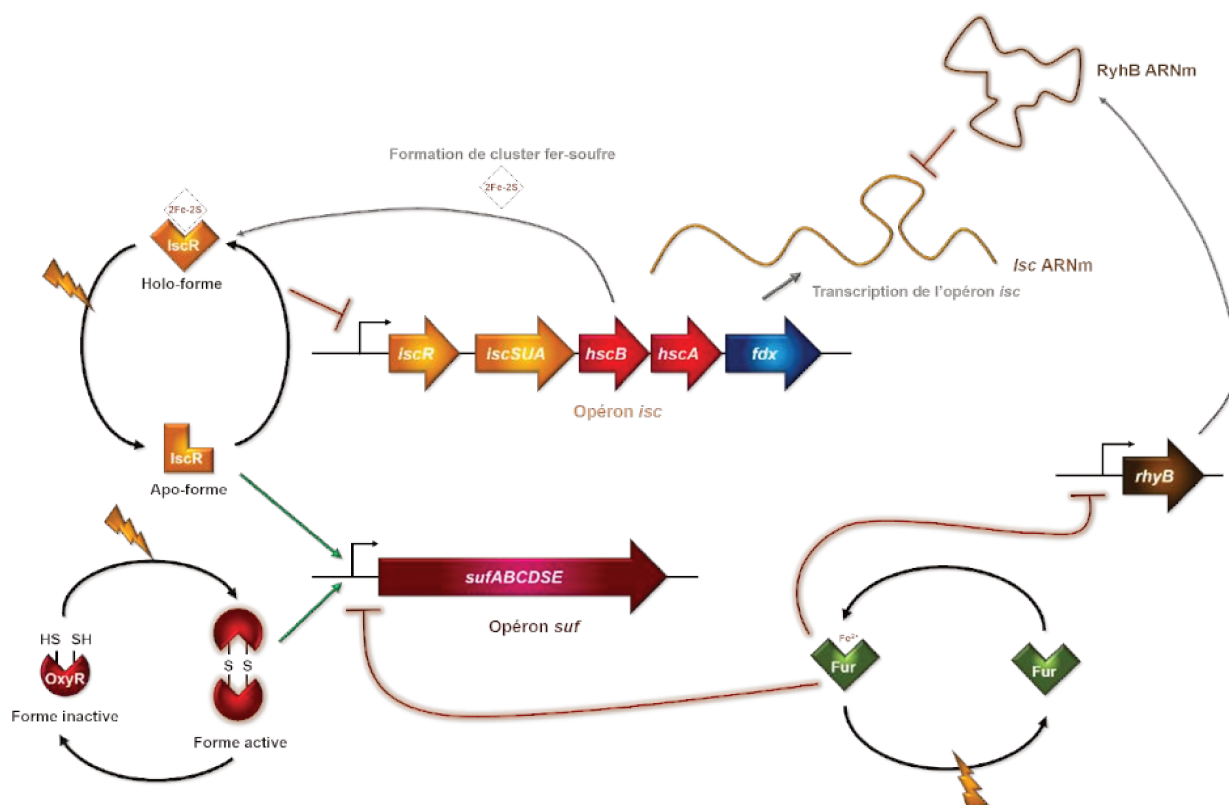


Figure 21 : Inter-régulation des opérons géniques *isc* et *suf* impliqués dans la biosynthèse de groupement fer-soufre chez *E. coli* (adapté de (Ayala-Castro *et al.*, 2008)).

Les éclairs représentent différents stress tels que la diminution de la concentration en fer, le stress oxydant et/ou nitrosant.

Ainsi, d'importants remaniements de la biosynthèse des clusters fer-soufre sont observés en présence de ces différents stress chez *E. coli*. L'ensemble de ces mécanismes permet ainsi la formation *de novo* de clusters fer-soufre afin de réparer les dégâts encourus lors d'un stress oxydant et/ou nitrosant. Néanmoins il est important de noter que *P. aeruginosa* ne possède pas d'opéron *suf* (Stover *et al.*, 2000), mais un opéron *isc* très conservé (Romsang *et al.*, 2014). Par conséquent, cela souligne un mécanisme de régulation de la biosynthèse et de la réparation des clusters fer-soufre différent de ceux connus chez *E. coli*.

3. Le stress nitrosant et la lutte pour la conservation de l'énergie : principales reprogrammations métaboliques

3.1. La phosphorylation oxydative

La phosphorylation oxydative est un processus essentiel à la génération d'énergie sous forme d'ATP dans la cellule. Ce processus est localisé dans la mitochondrie chez l'eucaryote (Gorman *et al.*, 2016) et la membrane interne chez les procaryotes (Melo and Teixeira, 2016). La phosphorylation oxydative est réalisée par une chaîne de cinq complexes protéiques correspondant respectivement à la NADH déshydrogénase (complexe I), la

succinate:ubiquinone oxydoréductase (complexe II), l'ubiquinol:cytochrome c oxydoréductase (complexe III), le cytochrome c:oxygène oxydoréductase (complexe IV) et l'ATP synthase (complexe V) (Melo and Teixeira, 2016). Les complexes I à VI sont des métalloprotéines principalement constituées de clusters fer-soufre (Complexe I à III) et d'hèmes cuivre (complexe VI) (Berg *et al.*, 2002). L'ensemble de ces complexes, communément appelés chaîne de transfert d'électrons, sont capables, par des réactions d'oxydoréduction, de transférer des électrons entre les complexes I à IV jusqu'à une espèce acceptrice d'électrons variable, généralement l'oxygène (Bueno *et al.*, 2012; Kracke *et al.*, 2015). Ce transfert d'électrons est médié par un composé lipophile, Ubiquinone (UQ ; ou Coenzyme Q) du complexe I à III (Ernster and Forsmark-Andrée, 1993). Le transfert d'électrons du complexe III à IV fait intervenir un transporteur d'électrons, soluble dans l'espace périplasmique, le cytochrome c (Capaldi *et al.*, 1982). De plus, les complexes I, III et IV sont des pompes à protons, participant à la génération d'une force protomotrice par un influx d'H⁺ dans l'espace périplasmique. Ce phénomène est permis via l'oxydation de composés donneurs d'électrons (NADH, succinate, FADH₂) principalement issus du cycle du citrate (TCA) (Alberts *et al.*, 2002).

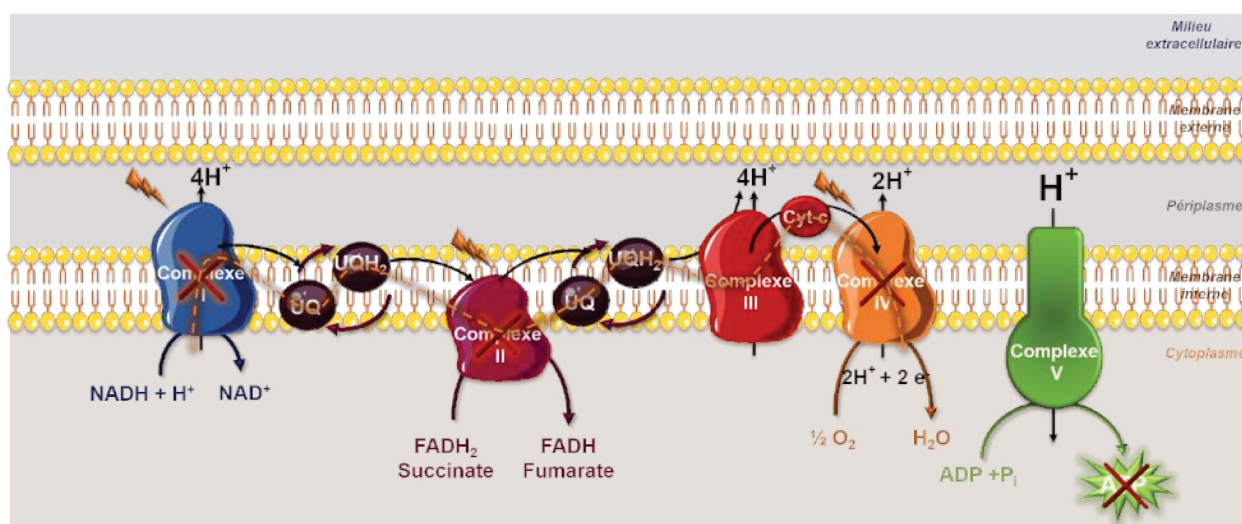


Figure 22 : Simplification de l'altération de la phosphorylation oxydative induite par le NO chez *P. fluorescens* (adaptée de (Auger *et al.*, 2011)).

Complexe I : NADH déshydrogénase ; Complexe II : succinate:ubiquinone oxydoréductase ; Complexe III : ubiquinol:cytochrome c oxydoréductase ; Complexe IV : cytochrome c:oxygène oxydoréductase ; Complexe V : ATP synthase ; UQ : ubiquinone (coenzyme Q oxydée) ; UQH₂ : ubiquinol (coenzyme Q réduit). Les éclairs représentent les modifications post-traductionnelles des complexes I, II et IV en présence de NO.

Cette force protomotrice est essentielle par la suite au fonctionnement du dernier complexe (V), une ATP synthase générant de l'ATP via l'énergie fournie par l'influx de protons dans le cytoplasme. Les clusters fer-soufre représentant une des cibles clefs du NO (**Chapitre 2. Partie 2**), les complexes protéiques de la chaîne respiratoire sont ainsi sensibles au stress nitrosant (**Figure 22**).

En effet, il a été démontré que les complexes I, II et IV sont non-fonctionnels à la suite d'un traitement avec des espèces donneuses de NO chez *P. fluorescens* (Auger *et al.*, 2011). Ainsi, une abolition du métabolisme énergétique médié par le processus de phosphorylation oxydative est alors rencontrée. Néanmoins, des stratégies de reprogrammations métaboliques sont mises en place pour pallier à ce stress et continuer à fournir l'énergie nécessaire à sa survie (dénitrification, contournement du cycle du citrate) décrite ci-après.

3.2. La dénitrification ou respiration anaérobie : une stratégie de déNOxification et d'apport énergétique

Comme évoqué précédemment, la dénitrification est un phénomène conduisant à un recyclage de l'azote. Le passage d'un état aérobie à anaérobie est un élément déclencheur dans la mise en place de la dénitrification. En effet, la dénitrification est couplée à la chaîne de transfert d'électrons. Ainsi, ce processus permet la génération d'énergie nécessaire à la cellule malgré l'absence d'oxygène. Les protéines impliquées dans la dénitrification sont principalement des métalloprotéines (cluster Fe-S ou hème). Chez *P. aeruginosa*, la régulation du processus de dénitrification repose sur trois facteurs de transcription (i) ANR, sensible au taux d'oxygène, (ii) DNR, sensible aux NO et NO₂⁻ et (iii) NarL, appartenant au système à deux composante NarXL sensible aux nitrates (Arai, 2011) (**Figure 23**). NirQ est également pressenti pour réguler l'expression des gènes appartenant aux opérons *nir* et *nor* (Jüngst and Zumft, 1992). Brièvement, ANR (anaerobic regulation of arginine deiminase and nitrate reduction), un régulateur transcriptionnel de la famille des CRP/FNR (cAMP receptor protein/fumarate and nitrate reduction regulatory protein), possède 4 résidus cystéine sensibles à l'oxygène (Zimmermann *et al.*, 1991). Ainsi, en absence d'oxygène ANR est alors sous sa forme active et régule la transcription des gènes *dnr*, *narXL* et l'opéron *nar* (Arai, 2011). Les gènes *narXL* codent pour un système à deux composantes inséré dans la membrane interne de la bactérie (Darwin and Stewart, 1996). NarX est une histidine kinase capable de détecter le NO₃⁻, engendrant ainsi son activation par autophosphorylation (Schröder *et al.*, 1994). NarX active ensuite NarL par phosphorylation (Schröder *et al.*, 1994). La forme active du facteur transcriptionnel NarL régule l'expression des gènes *nirQ*, *dnr* et de l'opéron *nar* (Schreiber *et al.*, 2007). Le gène *dnr* (dissimilatory nitrate reductase) code pour la protéine DNR, facteur transcriptionnel, appartenant aussi aux CRP/FNR, dépourvu des résidus cystéine classiques (Rinaldo *et al.*, 2006).

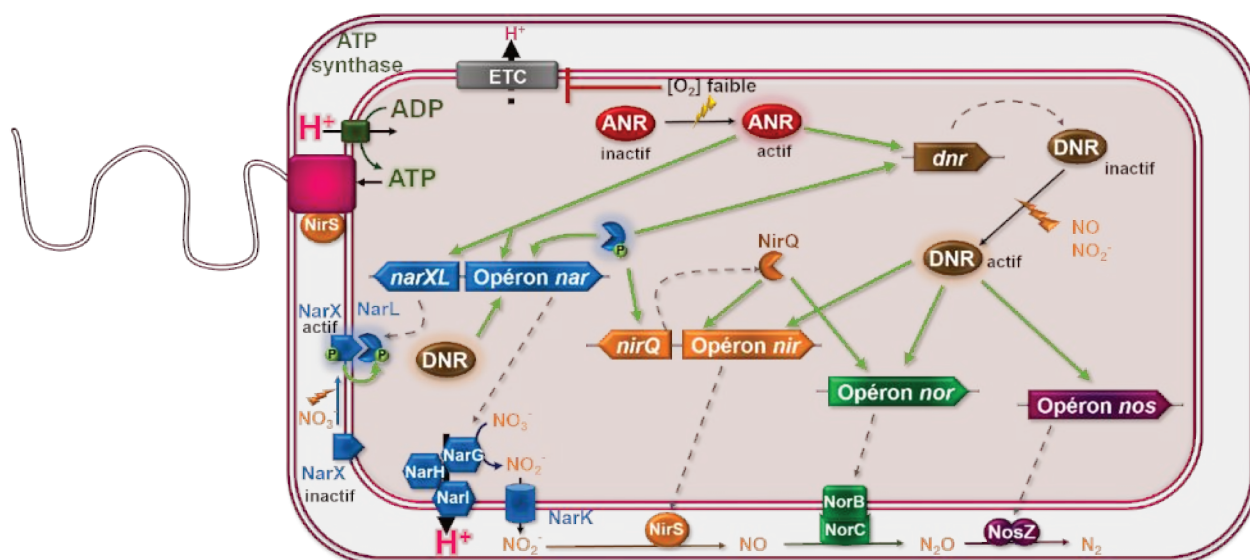


Figure 23 : La reprogrammation du métabolisme respiratoire adéquat à des conditions anaérobies chez *P. aeruginosa* (adapté de (Arai, 2011)).

ANR : anaerobic regulation of arginine deiminase and nitrate reduction ; DNR : dissimilatory nitrate reductase; nar : nitrate réductase ; nir : nitrite réductase ; nor : NO réductase ; nos : N_2O réductase.

Néanmoins DNR est pourvu d'un cofacteur hème (Castiglione *et al.*, 2009) essentiel à l'activation de ce facteur transcriptionnel, *in vivo*, en présence de NO (Arai *et al.*, 2003) et NO_2^- (Hasegawa *et al.*, 1998). DNR régule spécifiquement l'expression de gènes impliqués dans la dénitrification (opérons *nar*, *nir*, *nor*, *nos*) abordés précédemment (**Figure 6**) (Trunk *et al.*, 2009). En absence d'oxygène, l'accepteur terminal de la chaîne de transfert d'électrons n'est plus disponible. De plus, comme déjà évoqué, les complexes protéiques impliqués dans la phosphorylation oxydative sont sensibles au stress nitrosant (notamment NO). Lors de conditions anaérobies, le nitrate peut être utilisé comme accepteur terminal de la chaîne de transfert d'électrons via la nitrate réductase (Kraft *et al.*, 2011). Ainsi le processus de dénitrification joue un rôle crucial, via la nitrate réductase (NarGHI), dans le maintien de la force motrice essentielle à la formation d'énergie (ATP) et permet la détoxification des NO_x (appelée ici déNOxification) (**Figure 23**). Enfin, plus récemment, il a été montré que la NirS assumerait une fonction annexe à la réduction des nitrites. En effet, NirS forme un complexe protéique avec les protéines DnaK et FliC essentielles à la formation du flagelle (Borrero-de Acuña *et al.*, 2017). Cette proximité entre les complexes impliqués dans la dénitrification et le flagelle pourrait être utilisée dans le but d'échapper au stress nitrosant. Néanmoins les gènes impliqués dans la dénitrification ne sont pas tous retrouvés dans l'ensemble des *Pseudomonas spp.*. En effet, ces gènes sont principalement retrouvés chez un grand nombre d'espèces de *P. aeruginosa*, certaines espèces de *P. stutzeri*, et peu de *P. fluorescens* (e.g. F113) (www.Pseudomonas.com).

3.3. Le contournement du cycle du citrate : une lutte pour conserver l'énergie cellulaire

Le cycle du citrate (ou cycle de Krebs) fournit un grand nombre de composés donneurs d'électrons (NADH, FADH₂) largement utilisés dans la phosphorylation oxydative (Alberts *et al.*, 2002). De plus, il fournit de l'énergie à la cellule sous forme de GTP transformé ultérieurement en ATP. Enfin il est connecté au métabolisme du glucose, des acides gras et des acides aminés (Berg *et al.*, 2002).

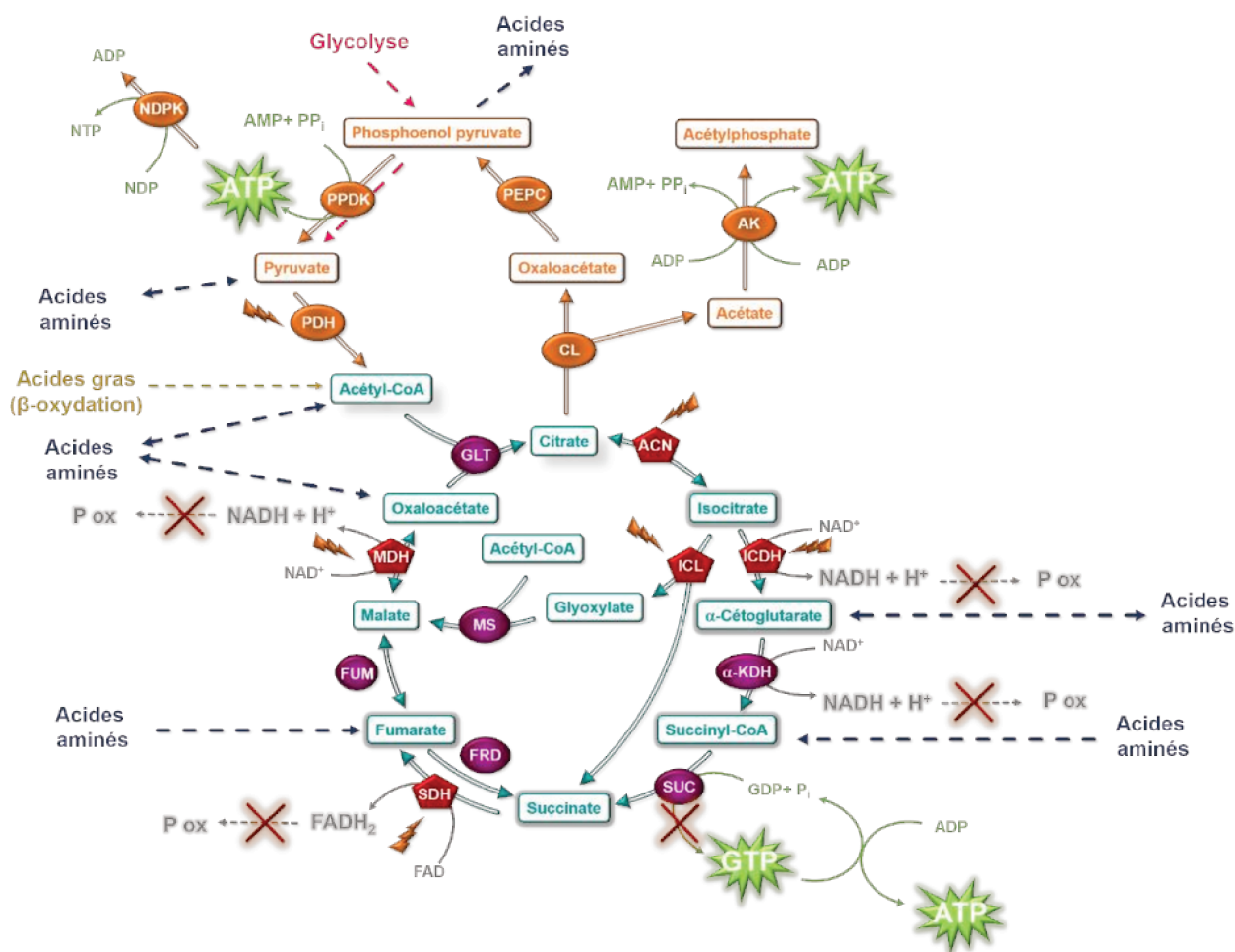


Figure 24 : La reprogrammation du cycle du citrate (TCA) chez *P. fluorescens* en réponse au stress nitrosant (d'après (Auger and Appanna, 2015; Auger *et al.*, 2011)).

ACN : aconitase ; ICDH : isocitrate déshydrogénase ; ICL : isocitrate lyase ; MS : malate synthase ; α-KDH : alpha-cétoglutarate déshydrogénase ; SUC : Succinyl-CoA déshydrogénase ; SDH : succinate déshydrogénase ; FRD : fumarate réductase ; FUM : fumarase ; MDH : malate déshydrogénase ; CS : citrate synthase ; CL : citrate lyase ; AK : acétate kinase ; PEPC : phosphoénolpyruvate carboxylase ; PDK : phosphoénolpyruvate dikinase ; NDPK : nucléoside diphosphate kinase ; PDH : pyruvate déshydrogénase ; P ox : Phosphorylation oxydative. Les éclairs représentent les enzymes ciblées par le stress nitrosant et les croix représentent l'abolissement des réactions impliquées dans le métabolisme énergétique. Les flèches en pointillés gris, bleus, roses et jaunes correspondent respectivement aux interconnexions du TCA avec la phosphorylation oxydative, les acides aminés, la glycolyse et la β-oxydation des acides gras.

Néanmoins, comme évoqué précédemment, le NO altère le fonctionnement d'une des enzymes essentielles au cycle du citrate et à la phosphorylation oxydative : la succinate déshydrogénase (Auger *et al.*, 2011). Chez *P. fluorescens* F113, le NO induit une inactivation totale de l'aconitase (ACN), de l'isocitrate déshydrogénase (ICDH) et de l'isocitrate lyase (ICL), la malate déshydrogénase (MDH), la succinate déshydrogénase (SDH) et de la pyruvate déshydrogénase (Auger *et al.*, 2011) (**Figure 24**). En effet, le NO serait capable d'attaquer directement le cluster fer-soufre de l'aconitase (Gardner *et al.*, 1997). Actuellement, les mécanismes d'inactivation de l'ICDH, de l'ICL, de la MDH et de la PDH via le NO ne sont pas connus chez *Pseudomonas spp.*. Ces modifications d'activité sont principalement observées lors de l'utilisation du citrate comme seule source de carbone (Auger *et al.*, 2011). Ainsi l'activation de nombreuses enzymes en lien avec l'utilisation du citrate dans la génération d'énergie sont secondairement activés. Il s'agit notamment de la citrate lyase (CL), l'acétate kinase (AK), la phosphoénolpyruvate carboxylase (PEPC), la phosphoénolpyruvate dikinase (PPDK) ainsi que de la nucléoside diphosphate kinase (NDPK). Les CL, PEPC et PPDK forment alors un supercomplexe protéique suite à des modifications post-traductionnelles (phosphorylation) (Auger and Appanna, 2015). Ce supercomplexe est à l'origine d'une importante formation d'ATP et de pyruvate. De plus, la NDPK permet la génération d'ADP, utilisé par l'AK pour former de l'ATP (Auger and Appanna, 2015). La déphosphorylation du supercomplexe CL-PEPC-PPDK conduit à leur dissociation et, par conséquent, à l'arrêt de cette reprogrammation métabolique. L'ensemble des protéines illustrées **Figure 24** et intervenant dans la réponse au stress nitrosant ne sont sollicitées simultanément, mais en fonction de la source de carbone utilisée. En effet, lors de l'utilisation de fumarate à la place du citrate, la fumarase (FUM), les MDH, PEPC, PPDK, NDPK et AK sont sur-régulées (Appanna *et al.*, 2014). Ainsi, ces deux exemples illustrent bien la complexité des reprogrammations métaboliques observables chez *P. fluorescens* et son incroyable potentiel d'adaptation à son environnement.

3.4. La réponse stringente induite par le NO : altération de la synthèse des acides aminés ramifiés (BCAA)

Les acides aminés ramifiés (BCAA : « *Branched Chain Amino Acids* »), ou à chaîne latérale ramifiée, possèdent sur leur chaîne latérale un groupement aliphatique (-CH₃). Cette famille d'acides aminés regroupe la L-Isoleucine, la L-Leucine et la L-Valine. Ces trois acides aminés sont protéinogènes, *i.e.* ils sont incorporés dans les protéines lors de la traduction. La synthèse de ces trois acides aminés est largement conservée chez les bactéries à Gram positif et négatif. Deux opérons géniques sont impliqués dans cette voie métabolique : *ilv* et *leu* (Kaiser and Heinrichs, 2018) (**Figure 25**).

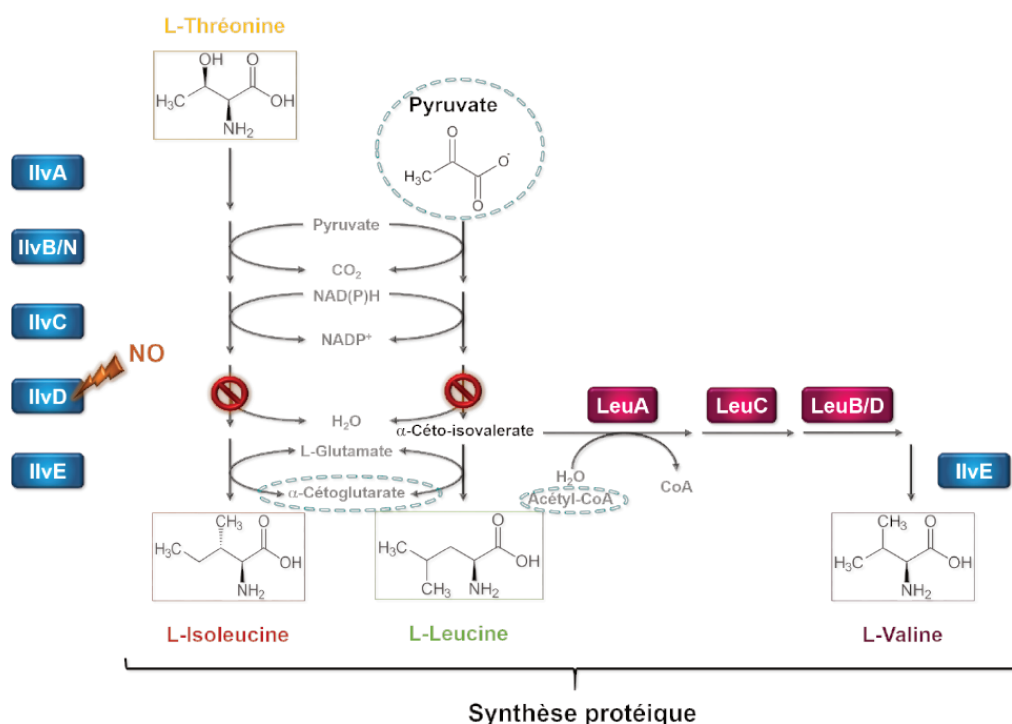


Figure 25 : Origines de la réponse stringente suite à un stress nitrosant chez *E. coli* (adaptée de (Kaiser and Heinrichs, 2018)).

IlvA à IlvN et LeuA à LeuD correspondent aux enzymes intervenant dans la voie de biosynthèse des acides aminés ramifiés. L'éclair représente l'altération de la protéine IlvD en présence de NO. Les symboles de sens interdit symbolisent les voies enzymatiques impactées, les molécules encadrées en pointillés cyan représentent les dérivés communs avec le cycle du citrate.

Les BCAA sont également des effecteurs du régulateur global Lrp (*Leucine – responsive regulatory protein*) impliqué dans les reprogrammations métaboliques adaptées à la phase de croissance et au taux de nutriments biodisponibles (Kaiser and Heinrichs, 2018). Chez *E. coli*, le stress nitrosant (NO) induit une déplétion du contenu en BCAA conduisant subséquemment à une inhibition de la croissance bactérienne (Hyduke *et al.*, 2007). Parmi l'ensemble des enzymes impliquées dans la synthèse des BCAA, IlvD (ou dihydroxyacide déshydrogénase) est altérée par le NO via son cluster fer-soufre (Ren *et al.*, 2008). L'absence de cette enzyme conduit à la déplétion du contenu en L-Leucine et L-Isoleucine à l'origine de la réponse stringente chez *E. coli* (Hyduke *et al.*, 2007). Le NO, par altération de la voie de synthèse des BCAA, exhibe un effet bactériostatique. Les *Pseudomonas spp.* présentent également l'ensemble des gènes nécessaires à la synthèse de ces trois acides aminés essentiels ([KEGG Pathway](#)). Tout comme chez *E. coli*, l'enzyme IlvD présente un cluster fer-soufre. Bien qu'aucune information ne soit actuellement disponible à ce sujet, il est envisageable que le NO, chez *Pseudomonas spp.* conduise également à des effets bactériostatiques BCAA-dépendants.

4. Les pompes à efflux dans la réponse adaptative aux stress oxydant et nitrosant

4.1. La multi-résistance médiée par les pompes à efflux

P. aeruginosa représente une extrême menace au niveau sanitaire en raison de sa multi-résistance à de nombreux antibiotiques (McCarthy, 2015). Ces phénotypes multi-résistants sont liés à des mécanismes intrinsèques impliqués dans (i) la diminution de la perméabilité de la membrane externe, (ii) la modification enzymatique de l'antibiotique, (iii) la modification de la cible aux antibiotiques ainsi que (iv) l'export médié par des systèmes d'efflux (Pang *et al.*, 2019). Ces systèmes de pompes à efflux de la famille RND (*Resistance-Nodulation-Cell Division*) sont d'autant plus intéressants qu'ils permettent l'efflux d'une grande variété de substrats : antibiotiques, biocides, molécules du *Quorum Sensing* (QS) (**Tableau 4**).

Tableau 4 : Les pompes à efflux RND chez *P. aeruginosa* d'intérêts cliniques et la réponse au stress

Les antibiotiques sont écrits en rouge, les biocides sont écrits en orange et les molécules du QS sont écrites en vert. AG, aminoglycosides; BL, β-lactames (exceptés carbapénèmes); CHL, chloramphénicol; COL, colistine; CP, carbapénèmes (sauf imipénème); CV, crystal violet; DA, diamide; EB, bromure d'éthidium; ERY, érythromycine; FQ, fluoroquinolones; HHQ, 4-hydroxy-2-heptylquinoline; ID, indoles; ML, macrolides; SO, solvants organiques; AQ, ammonium quaternaires; QL, quinolones; QS, molécules/inhibiteurs du *Quorum Sensing*; SDS, sodium dodécyl sulfate; TC, tétracyclines.

Caractéristiques générales			Réponse au stress		
Pompe à efflux	Expression	Substrats (liste non exhaustive)	Type	Régulateurs spécifiques	Références
MexAB-OprM	Constitutive	BL, CHL, COL, CP, FQ, ML, QL, TC CV, EB, ID, SO, SDS QS	Oxydant (ROS)	MexR	(Chen <i>et al.</i> , 2008)
				NalC	(Ghosh <i>et al.</i> , 2011)
MexXY-OprM/OprA	Constitutive	AG, FQ, ML, TC EB	Oxydant (ROS)	ArmZ	(Fraud and Poole, 2011; Masuda <i>et al.</i> , 2000a)
MexCD-OprJ	Quiescente	CHL, COL, FQ, QL, TC, TRI SO, QAC	Enveloppe	AlgU	(Fraud <i>et al.</i> , 2008)
			Nitrosant (NO)	MexT	(Fetar <i>et al.</i> , 2011)
MexEF-OprN	Faible	CHL, FQ, QL, TC DA HHQ	Disulfides	MexT	(Fargier <i>et al.</i> , 2012)
			Electrophile (RES)	CmrA	(Juarez <i>et al.</i> , 2017)

Les pompes à efflux sont constituées de trois parties codées sous la forme d'opérons (Li and Nikaido, 2009). Ces systèmes polymériques traversent l'enveloppe des bactéries à Gram négatif. Cela est possible grâce à une architecture particulière permettant ainsi l'export de substances généralement toxiques pour la bactérie à l'aide de la force protomotrice (Poole, 2000). Ces pompes RND sont constituées d'une protéine de fusion membranaire (MFP), enchassée dans la membrane interne (*e.g.* MexF), d'un facteur de la membrane externe (OMF), enchassé dans la membrane externe et traversant le périplasme (*e.g.* OprN), et d'un transporteur transmembranaire (RND), localisé dans le périplasme (*e.g.* MexE) (Lister *et al.*, 2009) (**Figure 26A**). Cette macrostructure permet l'efflux de composés amphiphiles ou lipophiles parfois toxiques pour la bactérie provenant du cytoplasme et également du périplasme.

Chez *P. aeruginosa*, 12 opérons codant des systèmes tripartites de pompe à efflux RND ont été décrits (Lee *et al.*, 2006; Stover *et al.*, 2000) dont 4 systèmes sont d'intérêt clinique : MexAB-OprM, MexXY-OprM (ou MexXY-OprA), ainsi que MexEF-OprN (Li *et al.*, 2015). Bien que ces systèmes à trois composantes soient finement régulés, les antibiotiques ne sont pas des inducteurs directs de leur expression. De plus, divers stress sont à l'origine de l'expression de ces pompes à efflux (**Tableau 4**). Ainsi les pompes à efflux jouent un rôle majeur dans la réponse adaptative au stress (Poole, 2014).

4.1. MexAB-OprM et MexXY-OprM en réponse au stress oxydant

Comme abordé précédemment, le stress oxydant, médié par les ROS, est largement interconnecté avec le stress nitrosant. Ces ROS voient leur origine provenir du métabolisme intracellulaire (respiration cellulaire) ou de divers facteurs environnementaux (UV, polluants atmosphériques, métaux lourds, hôte) (Fang *et al.*, 2016). Ces ROS influencent l'expression des pompes à efflux MexAB-OprM (Chen *et al.*, 2008) et MexXY-OprM (Masuda *et al.*, 2000b).

La pompe MexAB-OprM présente une expression constitutive et un large éventail de substrats : antibiotiques (*e.g.* fluoroquinolone, β -lactames), biocides (*e.g.* bromure d'éthidium, SDS), molécules du QS dont une liste non exhaustive est compilée dans le **Tableau 4**. Ces paramètres confèrent un rôle majeur de cette pompe dans la résistance naturelle de *P. aeruginosa* (Yang *et al.*, 2011). De plus, l'inactivation de l'un des constituants de cette pompe engendre une importante diminution de la résistance aux antibiotiques spécifiques à celle-ci (Li *et al.*, 1995). L'expression de l'opéron *mexAB-oprM*, est principalement régulée par le répresseur de la famille MarR nommé MexR situé en amont de cet opéron (Poole *et al.*, 1996a). Toutefois un grand nombre d'autres régulateurs sont impliqués dans cette régulation comme, par exemple, ArmR (NalC dépendant) (Cao *et al.*, 2004), MexT (Maseda *et al.*, 2004)

ou encore AmpR (Balasubramanian *et al.*, 2012). Chez PAO1, le H₂O₂ induit l'oxydation des résidues cystéine 30 et 62 sur le régulateur MexR à l'origine de l'apparition de ponts disulfures rendant MexR inactif (Chen *et al.*, 2010). MexR est alors incapable d'inhiber l'expression de *mexAB-oprM*, qui est ainsi surexprimé. Plus récemment, la surexpression de cet opéron, en présence de pentachlorophénol (PCP), générant un stress oxydant, a été associée indirectement au régulateur NalC (Ghosh *et al.*, 2011). NalC contrôle l'expression de l'anti-répresseur *armR* levant la répression exercée par MexR sur *mexAB-oprM*. Toutefois, l'activation de NalC à l'origine de la surexpression de *mexAB-oprM* n'est pas encore élucidée (mécanismes directs du PCP ou sous-jacents ?) (Starr *et al.*, 2012).

Tout comme MexAB-OprM, MexXY-OprM est exprimée de manière constitutive et joue un rôle majeur dans la résistance aux antibiotiques chez les souches sauvages de *P. aeruginosa* (Poonsuk and Chuanchuen, 2014). Dans la plupart des souches, seuls les gènes *mexXY* sont en opéron et la composante membranaire OprM provient de l'expression de l'opéron *mexAB-OprM* (Aires *et al.*, 1999). Toutefois, dans le cas de la souche PA7, la porine OprA fait partie intégrante de cet opéron (Morita *et al.*, 2012) et possède un profil de substrats similaires à OprM (*e.g.* aminoglycosides, macrolides, tétracyclines) (Masuda *et al.*, 2000b). MexZ, un régulateur de la famille TetR et localisé en amont de cet opéron, est le principal régulateur de l'expression de cette pompe à efflux (répresseur) (Aires *et al.*, 1999). D'autres régulateurs interviennent également dans le contrôle de l'expression de cet opéron tels que notamment AmrZ (Yamamoto *et al.*, 2009), AmgRS (Lau *et al.*, 2013) ou encore ParRS (Muller *et al.*, 2011). L'exposition de PAO1 au H₂O₂ induit une augmentation de l'expression de *mexXY* ainsi qu'une augmentation de la résistance aux substrats spécifiques à cette pompe (Fraud and Poole, 2011). Cette réponse au stress oxydant serait médiée par ArmZ, répresseur de MexZ (Yamamoto *et al.*, 2009). Toutefois les mécanismes moléculaires impliqués dans l'induction d'*amrZ* par les ROS sont actuellement peu claires (Fraud and Poole, 2011).

4.2. MexCD-OprJ en réponse au stress d'enveloppe

L'expression de la pompe à efflux MexCD-OprJ est supposée quiescente dans les souches sauvages de *P. aeruginosa* puisque une inactivation de l'opéron *mexCD-oprJ* n'affecte pas la sensibilité de *P. aeruginosa* aux antibiotiques (Poole *et al.*, 1996b; Srikumar *et al.*, 1997). De plus, cette pompe est co-produite avec MexAB-OprM ou MexXY dans des isolats cliniques résistants aux fluoroquinolones et/ou aux carbapénèmes suggérant des effets additionnels sur la résistance partagée pour certains substrats tels que les fluoroquinolones (Li and Plésiat, 2016). Parmi les facteurs régulant l'expression de *mexCD-oprJ*, deux répresseurs situés en amont et en aval de l'opéron nommés respectivement NfxB et EsrC ont été décrits (Purssell *et al.*, 2015). Le régulateur transcriptionnel VqsM, impliqué dans l'expression de facteurs de

virulence et le *Quorum Sensing* a été également associé à l'expression de *mexCD-oprJ* (Liang *et al.*, 2014). Enfin, le facteur Sigma AlgU, impliqué dans la réponse au stress d'enveloppe, a été décrit comme activateur transcriptionnel de cet opéron (Fraud *et al.*, 2008).

4.3. MexEF-OprN en réponse à divers stress

La pompe à efflux MexEF-OprN est exprimée de manière faible dans les souches sauvages de *P. aeruginosa* et ne contribue pas à la résistance intrinsèque aux antibiotiques ou biocides (Kohler *et al.*, 1997). Toutefois la surexpression de cette pompe, notamment chez des mutants de type *nfxC*, conduit à une résistance accrue à un panel restreint de substrats spécifiques à cette pompe (chloramphénicol, fluoroquinolone, tétracycline) (Li and Plésiat, 2016). En parallèle une diminution de la sensibilité aux carbapénèmes associée à une sous-expression du gène *oprD* est également observée (Kohler *et al.*, 1997). Deux facteurs régulateurs situés en amont de l'opéron : MexT (Kohler *et al.*, 1997) et MexS, une oxydoréductase putative (Sobel *et al.*, 2005) ont été décrits comme activateur dans l'expression de cette pompe (Maseda *et al.*, 2000) (**Figure 26B**). D'autres régulateurs ont été observés *in vitro*. En effet, le système à deux composantes ParRS (Wang *et al.*, 2013), mais également NmoR, facteur présentant un rôle dans la défense face aux nitro-composés (Vercammen *et al.*, 2015) induisent l'expression de *mexEF-oprN*. Enfin, MvaT (Westfall *et al.*, 2006), un régulateur de nombreux gènes de virulence (Diggle *et al.*, 2002), et AmpR (Balasubramanian *et al.*, 2012) répriment l'expression de cet opéron.

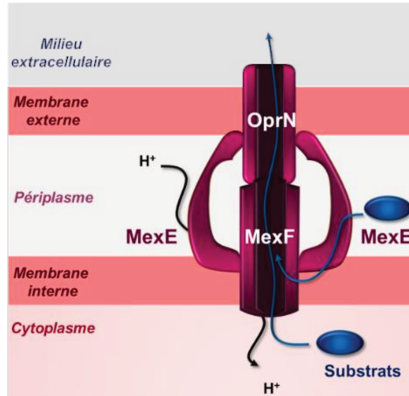
4.3.a. La réponse au stress nitrosant

Un grand nombre d'études ont prouvé l'impact du NO sur la modulation de l'antibiorésistance chez de nombreuses souches pathogènes pour l'Homme (Ghaffari *et al.*, 2005, 2006; Miller *et al.*, 2004). Des études précliniques sont actuellement en cours afin de déterminer l'utilisation potentielle du NO gazeux comme prétraitement, associé à la prise d'antibiotiques (Deppisch *et al.*, 2016; Miller *et al.*, 2009). Chez *P. aeruginosa*, la pompe à efflux RND MexEF-OprN est fortement surexprimée impliquant ainsi une augmentation de la résistance au chloramphénicol, quinolone, tétracycline et autres antibiotiques associés à cette pompe (Köhler *et al.*, 1997)..

En présence d'un stress nitrosant, MexS, une potentielle oxydoréductase (Sobel *et al.*, 2005), semble être impliquée dans la régulation indirecte de l'expression de *mexEF-oprN* (Fetar *et al.*, 2011) (**Figure 26B**). En effet une mutation du gène *mexS* altère la fonctionnalité de cette protéine. Ainsi le substrat de MexS s'accumulerait et agirait comme cofacteur de MexT, la rendant alors active. Pour mémoire, MexT active permet la sur-expression de l'opéron *mexEF-oprN* en présence d'un stress nitrosant. Toutefois l'impact de la surexpression de cette

pompe sur l'antibiorésistance n'a pas été mis en évidence (Fetar *et al.*, 2011). En parallèle, le gène *xenB*, codant pour une xénobiotique réductase, est surexprimée via MexT (Fetar *et al.*, 2011).

A



B

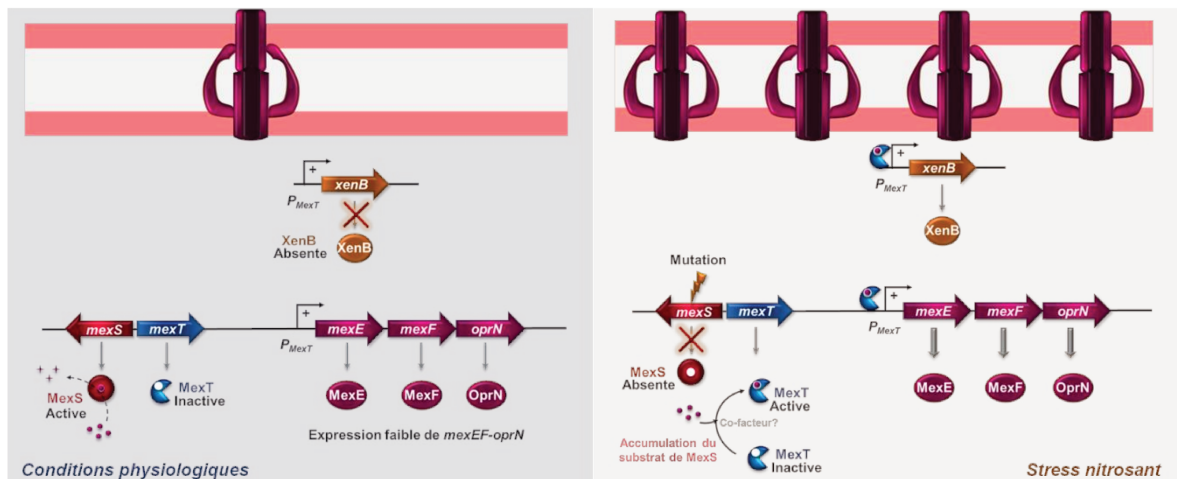


Figure 26 : Mécanismes hypothétiques impliqués dans la surexpression de *mexEF-oprN* en présence d'un stress nitrosant chez *P. aeruginosa* (adaptée de (Fetar *et al.*, 2011)).

A. Structure et fonctionnement de la pompe à efflux RND MexEF-OprN. B. Régulation de *mexEF-oprN* médiée par MexT. MexS : potentielle oxydoréductase, MexT : régulateur transcriptionnel de *mexEF-oprN* ; MexEF-OprN : pompe à efflux RND (résistance nodulation cell division) ; XenB : xénobiotique réductase ; P_{MexT} : promoteur inducible par MexT. L'éclair représente la mutation du gène *mexS*. La croix rouge représente l'absence de production de la protéine MexS.

Cette co-régulation de *xenB* et *mexEF-oprN* souligne un lien intrigant entre cette pompe à efflux et le stress nitrosant. En effet, XenB est une enzyme connue pour éliminer des groupements (-NO₂) sur la nitroglycérine et la TNT (Blehert *et al.*, 1999; Pak *et al.*, 2000). Ainsi, l'un des rôles de MexEF-OprN supposé par Fetar et ses collaborateurs serait son implication dans l'efflux de nitrates (Fetar *et al.*, 2011). Plus récemment, il a été montré qu'en présence d'un stress nitrosant (gNO₂), la pompe MexEF-OprN est fortement surexprimée chez deux souches de *P. fluorescens* : MFAF76a (isolat aéroporté) et MFN1032 (isolat clinique) (Kondakova *et al.*, 2016).

4.3.b. La réponse au stress lié aux ponts disulfures

La perturbation du taux de résidus thiol et pont disulfure crée un stress pour la bactérie à l'origine notamment de mauvais repliements protéiques (Masip *et al.*, 2006). Ce stress apparaît lorsque des espèces réactives avec les résidus thiol s'accumulent dans le cytoplasme (Liebeke *et al.*, 2008). Ce stress engendre l'augmentation de glutathion sous sa forme oxydée alors incapable de réduire la formation aberrante de ponts disulfures sur des protéines cytoplasmiques (Masip *et al.*, 2006). L'exposition de PA14 au diamide, éliciteur de ce stress, conduit à une augmentation de l'expression de *mexEF-oprN*, MexT dépendante (Fargier *et al.*, 2012). En effet, en présence de conditions oxydantes (GS-SG), MexT est majoritairement retrouvée sous sa forme d'oligomère (active) (Fargier *et al.*, 2012; Tian *et al.*, 2009). Toutefois, la délétion du gène *oprN* n'a pas d'effet sur la CMI associé au diamide suggérant l'implication d'une autre porine (Fargier *et al.*, 2012).

4.3.c. La réponse au stress électrophile

Le stress électrophile se définit par un déséquilibre entre la formation et la dégradation d'espèces réactives électrophiles (RES). Ces RES correspondent à des dérivés carbonyles α,β -insaturés (*e.g.* glyoxal, méthylglyoxal) et autres groupes électrophiles (Lee and Park, 2017). Les sources générant ces RES sont multiples telles que la dégradation du glucose, la peroxydation des lipides et l'oxydation de l'ADN (Kosmachevskaya *et al.*, 2015). Dans des conditions de stress, les RES peuvent affecter le potentiel redox à deux niveaux : (i) en perturbant directement la chaîne de transfert d'électrons favorisant ainsi la formation des ROS ou (ii) en déplaçant les cofacteurs redox tels que le glutathion et le NADP(H) (Kosmachevskaya *et al.*, 2015; Lee *et al.*, 2013). Chez *P. aeruginosa*, les RES sont notamment détectés par ANR et DNR (Lee and Park, 2017).

Récemment démontré, que le stress électrophile induit la surexpression de *mexEF-oprN* médié par le régulateur CmrA (*Chloramphenicol Resistance Activator*) de type AraC. En effet, l'exposition au glyoxal et autres RES chez PA14 conduit à l'activation de CmrA permettant l'expression de PA2048 codant une protéine homologue à la quinol monooxygénase YgiN d'*E. coli*. Cette enzyme est requise pour l'activation MexS/T dépendante de *mexEF-OprN* (Juarez *et al.*, 2017). Ainsi, PA2048 en collaboration avec MexS produirait des métabolites oxydés activant MexT et permettant l'expression de l'opéron *mexEF-oprN*.

4.4. Le NO, un médiateur dans la déstructuration des communautés microbiennes : un potentiel agent anti-biofilm

Un biofilm est défini comme étant une communauté de microorganismes attachés à une surface (ou interface) et enchassés dans une matrice (Costerton, 1995). Chez *P. aeruginosa*, cette matrice est principalement composée d'exopolysaccharides (EPS ; alginate, Pel, Psl, levan), de composés tensioactifs appelés biosurfactants (rhamnolipides) et d'ADN extracellulaire (Mann and Wozniak, 2012). Cette matrice confère une certaine protection à la communauté microbienne indigène contre divers xénobiotiques en limitant la diffusion et la biodisponibilité de ces composés au sein du biofilm (Hoyle *et al.*, 1992; Sadovskaya *et al.*, 2010). Ainsi les biofilms représentent une réelle menace dans divers domaines, notamment agroalimentaire et hospitalier (Costerton *et al.*, 1999; Shi and Zhu, 2009). Afin de lutter contre cette menace, une étude intensive du biofilm a permis de déterminer 3 phases essentielles à sa formation : (i) l'adhésion, (ii) la maturation et (iii) la dispersion (Kostakioti *et al.*, 2013). L'adhésion, ou phase d'initiation, est une étape réversible correspondant au premier contact de micro-organismes planctoniques (mobiles via une structure flagellaire) avec une surface via des interactions de Van der Waals (Bos *et al.*, 1999). Percevant ainsi ce contact les bactéries génèrent divers facteurs d'adhésion (adhésines, fimbriae, pili, LPS), rendant cet attachement irréversible (Costerton, 1995). Puis les bactéries se multiplient et sécrètent les constituants matriciels afin de former un biofilm mature (mode de vie sessile) (Mann and Wozniak, 2012). Enfin, en présence de divers stress (*e.g.* carence de nutriments, hypoxie, biosurfactants), les bactéries se dispersent du biofilm, retournant ainsi à un état planctonique (Kaplan, 2010). Cette dispersion est possible grâce à la sécrétion d'enzymes dégradant la matrice d'EPS et l'ADN extracellulaire (Fleming and Rumbaugh, 2017). L'ensemble de ces mécanismes est sous le contrôle du c-di-GMP, médiateur secondaire dans la transition de l'état sessile à planctonique (Valentini and Filloux, 2016). La concentration intracellulaire de ce messager est régie par deux types de protéines : les guanylates cyclases (GC), présentant un motif particulier GGDEF (Ryjenkov *et al.*, 2005), et les phosphodiésterases (PDE) au motif EAL ou HD-GYP (Schmidt *et al.*, 2005), sur leurs sites catalytiques respectifs. Ainsi la concentration du taux de c-di-GMP doit être finement régulée en fonction de l'état de maturation du biofilm et des différents stress subis par la bactérie. Une des voies intervenant dans cette régulation est la voie GacA/GacS (**Figure 27**).

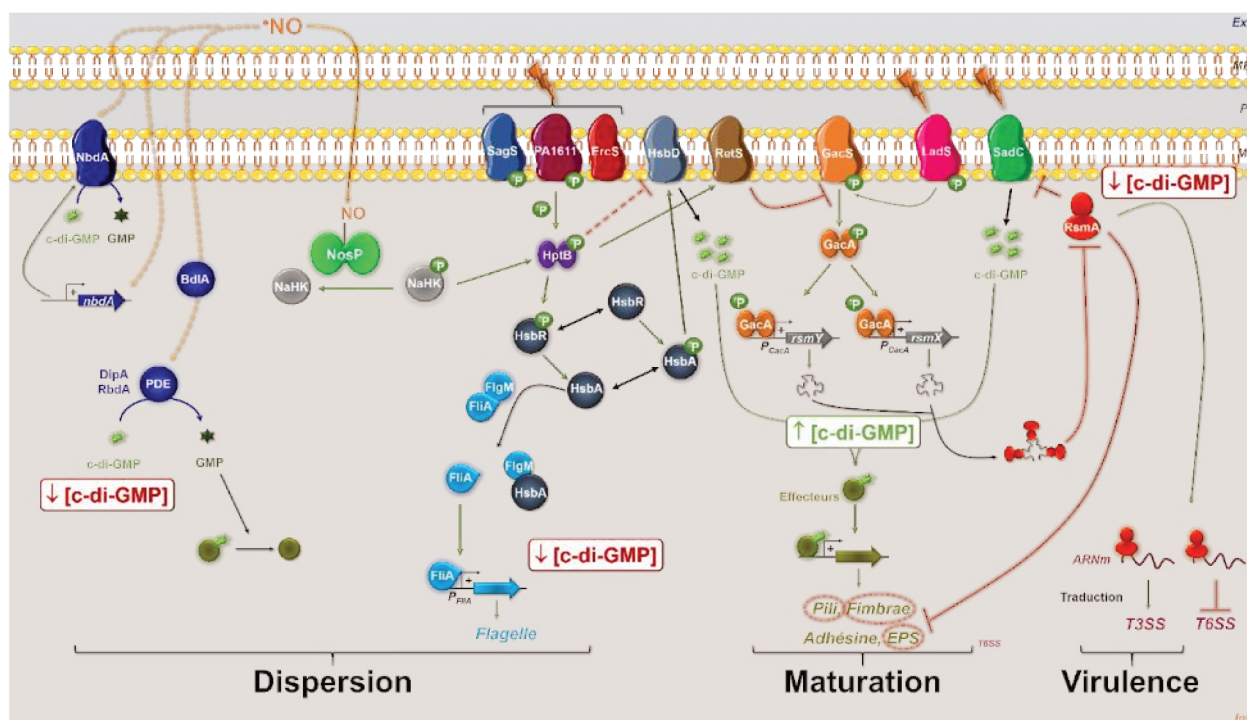


Figure 27 : Mécanismes impliqués dans la dispersion du biofilm de *P. aeruginosa* médiée par le NO (adaptée de (Barraud *et al.*, 2015; Hossain and Boon, 2017)).

SagS, Pa1611, ErcS : Histidines Kinases activant HptB par phosphorylation ; NbdA, DipA, RbdA : phosphodiésterases, SadC, HsbD : guanylates cyclases, GacA/GacS : système à deux composants ; RsmZ/RsmY ; petits ARNm non codants P_{GacA} : promoteur inducible par GacA ; Les P représentent l'ajout d'un groupement phosphate ; GMP :Guanosine monophosphate ; les flèches en vert indiquent une activation ; les flèches barrées en rouge les inhibitions ; les éclairs représentent différents stimuli activateurs ; les flèches en pointillés représentent des voies indirectes ou encore non déterminées ; Ext : milieu extracellulaire ; ME : membrane externe ; P : périplasme ; MI : membrane interne ; Int : milieu intracellulaire.

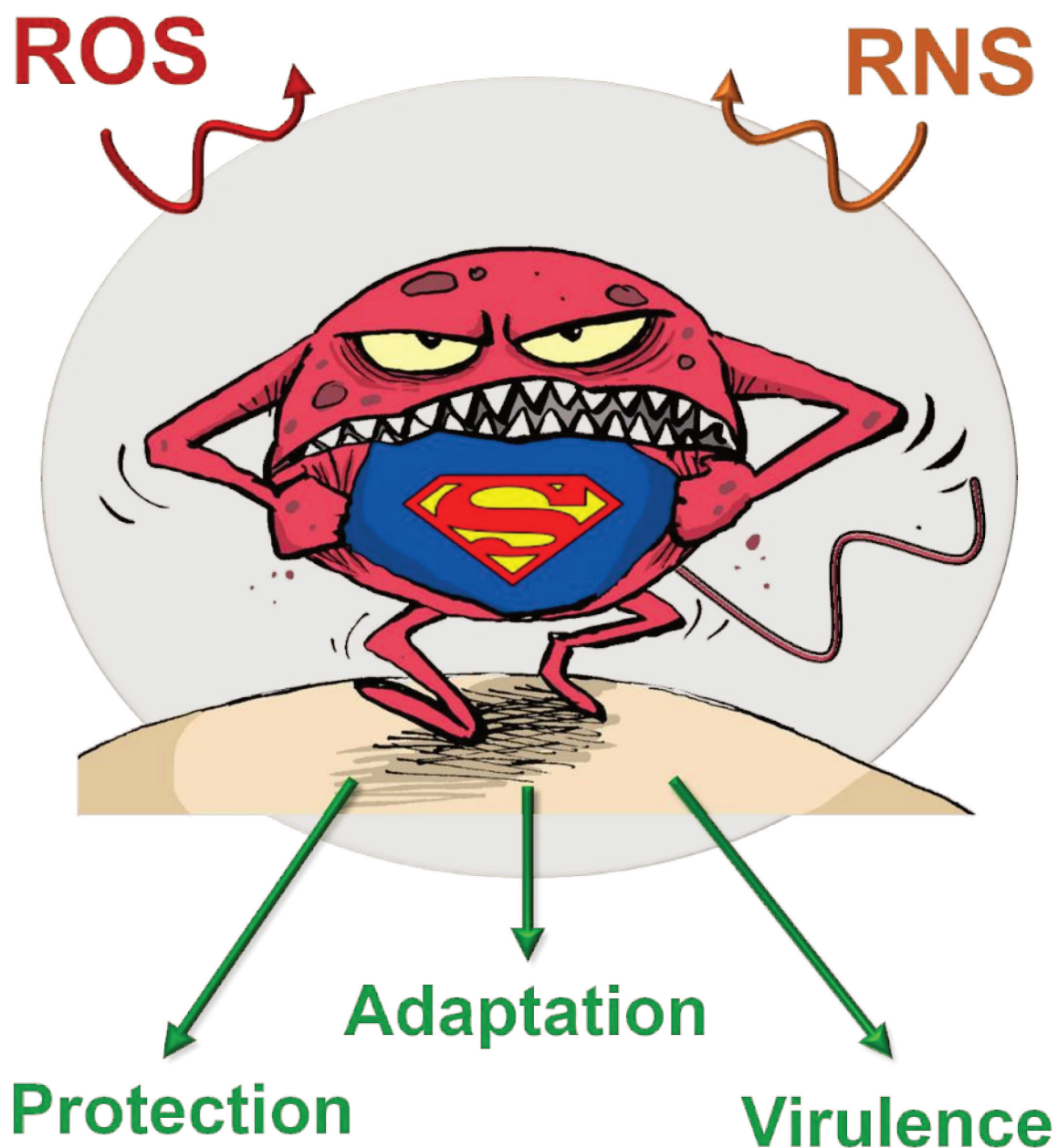
Chez *P. aeruginosa* la formation du biofilm est permise grâce aux guanylate cyclases, SadC et HsbD, présentes dans la membrane cytoplasmique (Valentini *et al.*, 2016). Le c-di-GMP, produit par ces deux enzymes, active de nombreux effecteurs (facteurs transcriptionnels liant le c-di-GMP) impliqués dans la formation de constituants matriciels (pili, flagelles fimbriales, EPS) favorisant la maturation du biofilm (Kulasakara *et al.*, 2006). Néanmoins ces deux GC voient leur activité finement régulée par la voie HptB/RetS (Figure 27). En effet, en présence de divers stimuli encore non identifiés, trois histidines kinases (SagS, PA1611, ErcS), présentes dans la membrane cytoplasmique, sont autophosphorylées. HptB est ensuite activée par phosphorylation (HptB-P) via l'une de ces protéines. Puis, HptB-P phosphoryle HsbR (HsbR-P) et inhibe indirectement la GC HsbD (Valentini *et al.*, 2016). HsbR-P présente une activité phosphatase, tandis que HsbR non phosphorylée présente une activité kinase. HsbR-P induit donc la déphosphorylation de HsbA. Ainsi HsbA est capable de séquestrer l'anti-sigma FlgM (Bhuwan *et al.*, 2012). Ce complexe FlgM-HsbA permet de libérer le facteur sigma 28 (FliA) induisant à son tour l'expression de gènes impliqués dans la formation du flagelle (Starnbach and Lory, 1992), favorisant ainsi la dispersion du biofilm. En revanche, HsbA-P est

capable d'interagir avec la GC HsbD induisant ainsi une augmentation du taux de c-di-GMP. Enfin HptB-P induit RetS (Bordi *et al.*, 2010), répresseur de la protéine GacS. La protéine membranaire PA1611 est également capable d'inhiber GacS par interaction directe en absence de stimuli (Kong *et al.*, 2013). GacS est une protéine enchâssée dans la membrane cytoplasmique appartenant au système à deux composants GacA-GacS. GacS est activée par phosphorylation via la protéine LadS. GacS phosphoryle par la suite GacA qui, devenue active, induit l'expression de deux petits ARNm non codants RsmZ et RsmY (Mikkelsen *et al.*, 2011). Ces deux ARNm séquestrent alors la protéine RsmA. RsmA n'est alors plus capable d'inhiber la GC SadC, permettant ainsi la formation de c-diGMP qui contribue, comme évoqué précédemment, à la maturation du biofilm. Une boucle d'autorégulation (non présentée dans la figure 27), médiée notamment par HapZ et PilZ (protéines exprimées via des effecteurs c-di-GMP dépendants) et le c-di-GMP, lui-même, est également observé. RsmA est une petite protéine de régulation post-traductionnelle globale capable d'induire la traduction de gènes impliqués dans le système de sécrétion de type 3 (SST3) et d'inhiber ceux impliqués dans le système de sécrétion de type 6 (SST6) ou encore dans la maturation du biofilm (Pili, fimbriae, EPS) (Brencic and Lory, 2009). Cela conduit à l'apparition de facteurs de virulence et favorise la dispersion du biofilm.

L'étape de dispersion représente ainsi une étape clef dans la lutte anti-biofilm. En effet, les bactéries, sous leur état planctonique, deviennent à nouveau biodisponibles à un éventuel traitement antibactérien, habituellement inefficace sur le biofilm. La recherche de composés déstructurant le biofilm a permis de découvrir un grand nombre d'agents dispersifs très prometteurs, dont le NO fait partie intégrante (Fleming and Rumbaugh, 2017). Ainsi un grand nombre d'études ont permis de décrypter le rôle indirect du NO dans ces mécanismes de dispersion : activateur de PDE (Barraud *et al.*, 2009) et inhibiteur de GC (Hossain and Boon, 2017) (**Figure 27**). Concernant l'inhibition de l'activité de GC, *P. aeruginosa* possède NosP, une protéine de la famille des H-NOx (Hossain and Boon, 2017). Cette protéine possède un hème fer capable de fixer le NO. La nitrosylation de NosP empêche alors la phosphorylation, et par conséquent, l'activation du domaine histidine kinase présent sur la protéine NaHK (Hossain and Boon, 2017). NaHK est une protéine impliquée dans une cascade de phosphorylation à l'origine de l'activation de l'histidine kinase HptB (*Histidine-containing Phosphotransfer Protein-B*). Ainsi, NaHK, sous sa forme inactive, est incapable d'activer HptB. Le NO modulerait également l'activité de PDE telles que NbdA et le complexe DipA/RbdA. En effet, en présence de NO la transcription du gène *nbdA* est fortement induite (Li *et al.*, 2013). NbdA est une PDE possédant un domaine membranaire au motif MHYT, ainsi qu'un domaine GGDEF, EAL. Le domaine MHYT contient un ion cuivre permettant de fixer le NO et d'induire une cascade de signalisation encore mal définie. Néanmoins l'activation de NbdA par le NO

conduit à une diminution du taux de c-di-GMP et par conséquent à la dispersion du biofilm. Finalement, BdlA, une protéine intervenant dans la régulation du chimiotactisme semble être impliquée dans les mécanismes de dispersion du biofilm induits par le NO (Barraud *et al.*, 2009). BdlA, ne possède aucun des motifs classiques impliqués dans la modulation du c-di-GMP suggérant le recrutement de PDE. En effet, BdlA est phosphorylée par une guanylate cyclase, GcbA. Cette modification post-traductionnelle permet d'assurer un clivage ciblé d'un domaine PAS (Per-Arnt-Sim) impliqué dans la signalisation de la protéine BdlA (Petrova *et al.*, 2014). Une fois clivée, BdlA interagit avec la PDE DipA. BdlA transfère son groupement phosphate à DipA conduisant à l'activation de la PDE. DipA recrute également une deuxième PDE, RbdA, induisant collectivement une forte diminution du c-di-GMP intracellulaire à l'origine de la dispersion du biofilm (Roy *et al.*, 2012).

Chapitre III. Les microorganismes aéroportés : exemple de *Pseudomonas fluorescens*, un contaminant omniprésent à l'adaptabilité hors du commun



I. Les microorganismes aéroportés : origines, types et menaces

Les microorganismes aéroportés, ou bioaérosols, sont des microorganismes en suspension dans l'air retrouvés principalement sous la forme d'agrégats, de regroupements, associés à des particules fines (*e.g.* pollen, poussière, débris végétaux) ou dans des gouttelettes d'eau (Alghamdi *et al.*, 2014). L'aérosolisation des microorganismes a deux origines : naturelle (*e.g.* vents, pluies, décomposition de végétaux ou animaux) et suite aux activités anthropogéniques (*e.g.* systèmes de ventilation, agriculture, laboratoires) (Fuzzi *et al.*, 2006). Lors de l'aérosolisation, les microorganismes sont retrouvés sous deux formes : vivante ou morte. De nombreux paramètres environnementaux influencent l'aérosolisation et l'état physiologique de ces microorganismes tels que : les conditions météorologiques (pluies, vent), le taux d'humidité, la température (Jones and Harrison, 2004), les UVs (Hwang *et al.*, 2010) ainsi que les polluants atmosphériques (**Partie II**).

Les bioaérosols sont constitués d'un large panel de microorganismes tels que des virus, bactéries, champignons, microalgues ou protozoaires (DeLeon-Rodriguez *et al.*, 2013; Morin *et al.*, 2013) mais également des produits de ces microorganismes (spores, endotoxines, mycotoxines, ADN). La population bactérienne représente une concentration moyenne de l'ordre de 10⁴ bactéries/m³ (Burrows *et al.*, 2009). Toutefois la composition de cette communauté est variable en fonction des différents paramètres précédemment évoqués (Cáliz *et al.*, 2018; Després *et al.*, 2012). Ces bioaérosols peuvent par la suite être dangereux à l'échelle sanitaire suite à leur inhalation ou lors d'un contact cutané (plaies ouvertes, brûlures). Parmi les bactéries pathogènes aéroportées les plus étudiés on retrouve notamment : *L. pneumophila* (Légionellose), *B. anthracis* (Anthrax), *M. tuberculosis* (Tuberculose), *S. aureus* (infection de plaies) ou encore *P. aeruginosa* (infection de plaies et pulmonaire) (<https://www.atzlabs.com/pdf/Airborne-microbe-list.pdf>). Toutefois, l'étude de la qualité de l'air sur trois sites distincts : la zone portuaire de Rouen (silos céréaliers) et dans les régions suburbaines de Rouen et d'Évreux (Normandie, France) a permis de collecter plus de 3000 bactéries (AFFSET, 2010). Environ 10% de cette population appartient au genre *Pseudomonas* et plus précisément uniquement au groupe fluorescent (*fluorescens* et *syringae*) (Morin *et al.*, 2013). Ce même pourcentage a été également retrouvé lors de l'échantillonnage au sein d'habitations sur une période de 7 ans (Remold *et al.*, 2015) suggérant ainsi leur omniprésence et la stabilité de cette communauté dans notre environnement proche. De plus, ce genre bactérien présente une adaptabilité hors du commun ainsi que des traits de virulence soulignés par son implication, bien que faible, dans des

infections humaines (Scales *et al.*, 2014) comme l'illustre le cas de *P. fluorescens* MFN1032 (Chapalain *et al.*, 2008).

II. *Pseudomonas fluorescens* une espèce en perpétuel remaniement

Le genre *Pseudomonas sp.* a été décrit pour la première fois en 1894 par Migula, comme des cellules présentant des organes polaires impliqués dans la mobilité (Migula, 1894). Cette description très succincte a conduit à des erreurs d'affiliation à ce genre bactérien. L'origine du nom *Pseudomonas*, bien que non abordée par Migula, dérive du grec « *pseudes* » faux et « *monas* » unité (Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 1957). Ainsi ce nom demeure assez ironique au vue de l'importante hétérogénéité et du remaniement encore actuel de la classification de ce genre bactérien. En effet, *Pseudomonas sp.* a fait l'objet de nombreux remaniements phylogénétiques. Dans un premiers temps, les bactéries associées au genre *Pseudomonas* ont été principalement classées en fonction de leurs caractéristiques physiologiques et biochimiques (Stanier *et al.*, 1966). Par la suite, cette classification a été confirmée par des techniques de biologie moléculaire (tests d'hybridations ADN-ADN et ARNr-ADN) et sub-divisée en cinq groupes (I à V) (Palleroni, 1984). Ces 5 sous-groupes ont été associés à la classe des Protéobactéries où les *Pseudomonas sensu stricto* ont été affiliées au sous-groupe I (γ-Protéobactéries) et les *Pseudomonas sensu lato* aux autres groupes (II-V) (De Ley, 1992; De Vos and De Ley, 1983). Le développement des techniques de biologie moléculaire a permis d'affiner la définition de ce genre bactérien via l'étude de la séquence de l'ARNr 16S (Anzai *et al.*, 2000) complétée ensuite par de nombreux autres gènes de ménage (*atpD*, *gyrB*, *rpoB*, *recA* et *rpoD*) (Hilario *et al.*, 2004; Tayeb *et al.*, 2008). Enfin, la technique de MLSA (*Multiple Locus sequense analysis*) basée sur le séquençage simultané de 4 gènes de ménage (ARNr 16S, *gyrB*, *rpoB* et *rpoD*) (Bodilis *et al.*, 2012; Mulet *et al.*, 2012), ainsi que des études portant sur l'analyse de génome complet (Gomila *et al.*, 2015) ont permis une meilleure délimitation du genre *Pseudomonas*. Il dénombre actuellement près de 254 espèces selon la LPSN (*List of prokariotic names with standing nomenclature*, <http://www.bacterio.net/Pseudomonas.html>). Le genre *Pseudomonas sensu stricto* a été divisé en deux grandes lignées représentées par deux espèces types bactériens: *P. aeruginosa* et *P. fluorescens*. A l'issue de l'étude de régions hypervariables de l'ARNr 16S, *P. fluorescens* a été subdivisée en 2 grands r-cluster : *putida* et *fluorescens* (Bodilis *et al.*, 2012). Le cluster *fluorescens* est constitué de *P. fluorescens* et d'espèces apparentées (*P. syringae* et *P. lutea*). Enfin, l'étude MLSA couplée au séquençage de l'ARNr 16S a également permis de séparer l'espèce *P. fluorescens* en trois clades (I-III) (Loper *et al.*, 2012).

III. L'omniprésence de *P. fluorescens* dans l'environnement et la santé

L'ensemble de ces caractéristiques, ainsi que la versatilité entre les différentes espèces de *P. fluorescens* confèrent à la bactérie une importante adaptabilité à divers environnements. En effet, *P. fluorescens* est une bactérie ubiquitaire retrouvée notamment dans le sol (Couillerot *et al.*, 2009), en particulier dans la rhizosphère où elle joue un rôle de phytoprotecteur grâce à la production d'antifongiques exploités en biotechnologie (Raaijmakers *et al.*, 2010; Walsh *et al.*, 2001). Ce germe est également localisé dans l'eau (Mena and Gerba, 2009) et l'air (Duclairoir Poc *et al.*, 2014; Morin *et al.*, 2013). De plus, *P. fluorescens* représente une réelle menace au niveau des industries agroalimentaires (Rajmohan *et al.*, 2002) ou encore hospitalières (Mulet *et al.*, 2017; Wong *et al.*, 2011) (**Figure 28**). En effet, ce germe est extrêmement surveillé dans ces milieux en raison de sa capacité à se développer à des températures basses.

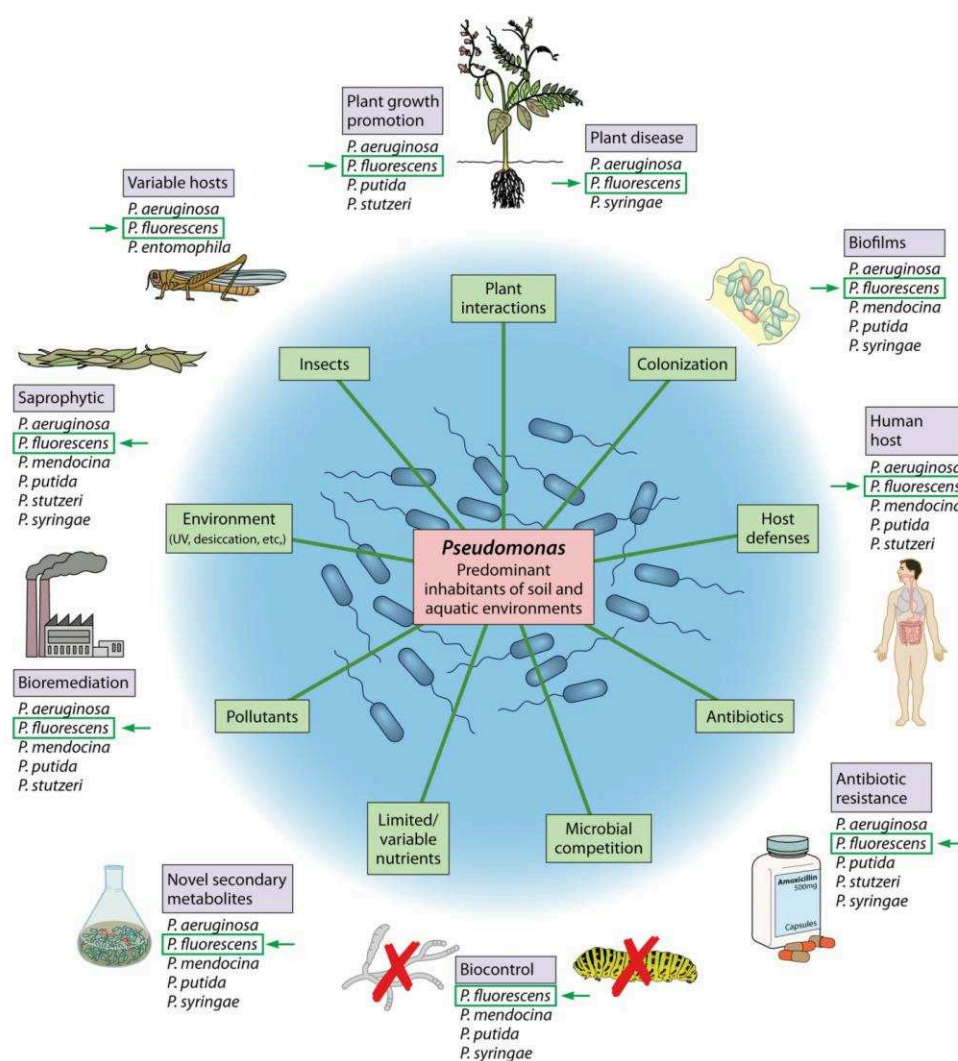


Figure 28 : Distributions et implications de *P. fluorescens* dans différentes niches écologiques (Scales *et al.*, 2014).

La diversité des *P. fluorescens* et leur adaptabilité à différentes niches écologiques peuvent s'expliquer en partie par la grande taille des génomes de ses membres (6 à 6,8 Mpb) (Loper *et al.*, 2012). De plus, dans certaines conditions (*e.g.* température supérieure à l'optimum de croissance) *P. fluorescens* présente la capacité à passer dans un état viable, mais non cultivable (VBNC) (Bunker *et al.*, 2004). L'état VBNC favoriserait ainsi la survie de *P. fluorescens* à un environnement inadéquat, via l'arrêt de la division et de la réplication en parallèle d'un métabolisme encore actif, mais restreint (Ramamurthy *et al.*, 2014).

À l'échelle eucaryote, *P. fluorescens* a longtemps été considérée comme non pathogénique bien que comprise dans le microbiome cutané (Hillion *et al.*, 2014), intestinal (Patel *et al.*, 2013) et pulmonaire (Dickson *et al.*, 2014). En effet, le principal pathogène opportuniste pour l'Homme issu de ce genre bactérien est *P. aeruginosa*. Cette espèce est notamment impliquée dans les infections de patients atteints de mucoviscidose (Silva Filho *et al.*, 2013; Young and Armstrong, 1972), mais également au niveau des brûlures et des plaies chroniques (Pruitt *et al.*, 1998). Cependant, la présence de *P. fluorescens* a été démontré dans un certain nombre de pathologies intestinales (maladie de Crohn) (Wei *et al.*, 2002) cutanées (Dalamaga *et al.*, 2005) ou encore pulmonaires, comme le démontre l'isolat clinique MFN1032 provenant du sputum d'un patients atteints de pneumopathies (Chapalain *et al.*, 2008) ou encore lors de transplantation pulmonaires (Dickson *et al.*, 2014). Ainsi, le développement de nouvelles techniques d'analyse du microbiome pulmonaire suite à des lavages bronchoalvéolaires, ont permis de montrer que le genre *P. fluorescens* a été retrouvé principalement associé aux cellules eucaryotes, soit sous forme de biofilm, soit internalisé dans la cellule hôte (phagocytose) dans des cas de pneumopathies (Dickson *et al.*, 2014).

IV. Principales caractéristiques de *P. fluorescens* et facteurs de virulence associés

1. Aspects généraux

Ainsi, les bactéries appartenant au genre *Pseudomonas fluorescens* sont des bacilles (droits ou légèrement incurvés) à Gram négatif non sporulants appartenant à la famille des γ -Protéobactéries et mesurant entre 1,5 et 5 μm de long pour 0,5 à 1 μm de large (Palleroni, 1984). Ces bactéries sont des chimiotrophes à aérobie stricte présentant une activité catalase et oxydase (Brenner *et al.*, 2005). Toutefois, certaines souches de *Pseudomonas fluorescens* (*e.g.* F113) sont capables d'utiliser le nitrate comme accepteur final de la chaîne de transfert d'électrons (Muriel *et al.*, 2015). Ces germes possèdent une ciliature polaire monotriche ou lophotriche (Migula, 1900) (**Figure 29A**). Le nom *fluorescens* leur a été attribué en raison de leur capacité à produire un sidérophore chromophore (pyoverdine), fluorescent sous

rayonnement UV et important médiateur dans l'assimilation du fer (Cornelis and Matthijs, 2002; Meyer, 2000) (**Figure 29B**). Les *P. fluorescens* sont des bactéries psychrotrophes, *i.e.* pouvant vivre à des températures comprises entre 4°C et 42°C, dont la température optimale de croissance est comprise entre 25 et 30°C.

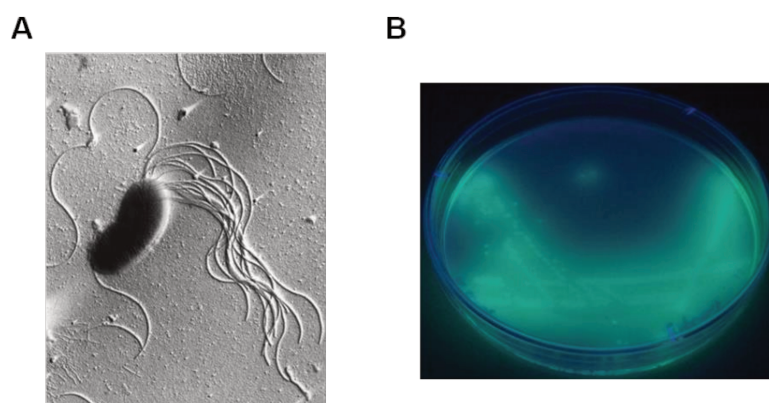


Figure 29 : Caractéristiques physiologiques et morphologiques de *P. fluorescens*

A : Observation de la ciliature et de la morphologie de *P. fluorescens* par microscopie électronique à balayage (Scales *et al.*, 2014). B : Observation de la fluorescence émise par la pyoverdine sécrétée par *P. fluorescens* (https://commons.wikimedia.org/wiki/File:P-aeruginosa_fluoreszenz.jpg).

Les *Pseudomonas fluorescens* sont également reconnues pour leur production de diverses molécules antimicrobiennes telles que les phénazines (McDonald *et al.*, 2001), les cyclolipopeptides, aux propriétés tensioactives (viscosinamide) (Duclairoir-Poc *et al.*, 2011; Raaijmakers *et al.*, 2002) ainsi que des composés volatiles toxiques, tels que le cyanure d'hydrogène (Askeland and Morrison, 1983). De plus, certaines souches de *P. fluorescens*, telles que MFAF76a, présentent une activité hémolytique, protéolytique ou encore estérase au pouvoir pathogène pour l'Homme (Duclairoir Poc *et al.*, 2014).

P. fluorescens est également capable de former des biofilms (Scales *et al.*, 2014) notamment grâce à la synthèse d'adhésines (système Lap) (Smith *et al.*, 2018) et la production d'exopolysaccharides de type alginate (Ertesvåg *et al.*, 2017). Enfin, ces germes possèdent des systèmes de sécrétion impliqués dans la virulence de la bactérie telle que le SST3 (spécifique aux eucaryotes) (Preston *et al.*, 2001; Sperandio *et al.*, 2012), et le SST6 (antibactérien) (Gallique *et al.*, 2017). Ces deux systèmes de sécrétions sont des structures protéiques complexe traversant l'enveloppe bactérienne pouvant être décrit comme des « seringues » pouvant injecter directement dans leurs cibles (SST3 et SST6), ou dans leur micro-environnement proche (SST6), des effecteurs (ou toxines), à l'origine de leur virulence (Coburn *et al.*, 2007; Gallique *et al.*, 2017).

2. Cas particulier du modèle aéroporté MFAF76a et avancé des recherches

La souche *P. fluorescens* MFAF76a a été isolée du port de Rouen (silos céréaliers) à l'issue d'une étude sur la qualité de l'air de Rouen (Normandie, France) (AFFSET, 2010, Morin *et al.*, 2013). L'analyse biochimique et physiologique de cette souche a permis d'observer l'expression de nombreux traits de virulence à 37°C (Duclairoir Poc *et al.*, 2014). Ces caractéristiques sont également partagées avec le modèle clinique MFN1032 isolé du sputum de patient atteint de pneumopathie (Chapalain *et al.*, 2008) (**Tableau 5**).

Tableau 5: Profils biochimiques et physiologiques des souches *P. fluorescens* MFAF76a (aéroportée) et MFN1032 (clinique) adapté de Duclairoir-Poc *et al.*, 2014

++ : activité importante ; + : activité faible ; α : hémolyse partielle; A549 : lignée cellulaire d'épithélium alvéolaire ; test LDH : test mesurant la cytotoxicité du surnageant de culture bactérien.

Tests physiologiques et biochimiques (à 37°C)		MFAF76a (aéroportée)	MFN1032 (clinique)
Activité enzymatique (37°C)	Estérase	++	++
	Lécithinase	++	++
	Lipoprotéolytique	++	+
	Protéolytique	++	++
	Hémolytique	α	α
Production de molécules actives	Pyoverdine	++	++
	Biosurfactant	-	+ (Viscosinamides)
Mobilité	Swim	++	++
	Swarm	+	+
	Twitch	-	-
Formation de biofilm	24h	+	+
	48h	+	-
Virulence	A549 (test LHL)	Très virulent (60-80%)	Très virulent (60-80%)
	<i>C. elegans</i>	Avirulente (léthalité 21j)	Avirulente (léthalité 17j)
	<i>D. discoideum</i>	Avirulente	Avirulente

Par la suite l'étude du système de sécrétion de type 6 (SST6), associée à l'activité antimicrobienne *in silico*, couplée à des tests physiologiques a permis de mettre en évidence la présence et la fonctionnalité d'un SST6 chez MFAF76a dont MFN1032 est dépourvu. Toutefois l'étude *in silico* a révélé la présence d'un SST3, associé à la virulence de la souche sur modèle eucaryote chez MFN1032, mais pas MFAF76a (communication personnelle). En

parallèle, l'étude de molécule du *Quorum Sensing* spécifique (N-acyl homosérine lactone) n'a pas permis d'observer la production de ces molécules signal chez les deux souches d'intérêt (communication personnelle). Plus récemment l'étude du lipidome de ces deux souches a permis d'observer des profils similaires (Kondakova *et al.*, 2015) comprenant deux glycérophospholipides majoritaires : la phosphatidyléthanoline (73%) et le phosphatidylglycerol (14%) et de deux espèce minoritaires : la phosphatidylcholine (10%) ainsi qu'un GP inconnu nommé UGP (3%) (% issus d'une communication personnelle).

Enfin, l'exposition de ces deux germes à 45ppm de NO₂, concentration permettant d'observer des effets délétères chez l'Homme et visibles chez *P. fluorescens*, a mis en évidence une augmentation de l'épaisseur du biofilm de 2,4 et 1,1 fois respectivement chez les souches MFAF76a et MFN1032. Toutefois aucune modification significative de la biomasse n'a été notée. En parallèle, une augmentation de l'antibiorésistance pour la ciprofloxacine et le chloramphénicol d'un facteur 2 a été observée après exposition pour les deux souches. Cette antibiorésistance a été notamment attribuée à la pompe à efflux MexEF-OprN spécifique à ces deux antibiotiques. En effet, une surexpression de *mexE* d'un facteur 14 et 100, *mexF* d'un facteur 3,5 et 47 et *oprN* d'un facteur 4,6 et 73, a été observée respectivement pour MFAF76a et MFN1032 après exposition à 45 ppm (Kondakova *et al.*, 2016). De plus, une surexpression d'un facteur 25 chez MFAF76a et 23 chez MFN1032 du gène homologue à *hmp* chez *E. coli* (codant une flavohémoprotéine impliquée dans la déNOxification) a été constatée.

Ainsi, l'ensemble de ces données valide l'utilisation de MFAF76a en tant que modèle bactérien aéroporté pour mesurer l'impact de la pollution atmosphérique sur l'adaptation et la virulence de *P. fluorescens*.

Contexte d'étude et objectifs

Traditionnellement, les épidémiologistes associent l'augmentation de pneumopathies d'origine bactérienne au caractère irritant des polluants atmosphériques, tels que les NO_x (dont le NO₂ est le représentant majoritaire), sur les tissus pulmonaires. Ce phénomène peut conduire à une immunodépression humaine, facilitant ainsi la colonisation bactérienne (Silveyra *et al.*, 2017). Toutefois, les microorganismes sont continuellement « agressés » par ces mêmes polluants, omniprésents dans leur microenvironnement proche, y compris leurs hôtes, où ils sont exploités comme agents antibactériens (Bogdan, 2015). Malgré l'aspect menaçant de ces NO_x, notamment lié à leur forte interconnection avec les ROS (Bartasaghi and Radi, 2018), un grand nombre de microorganismes, dont *Pseudomonas aeruginosa*, possèdent un arsenal d'enzymes, aux régulations complexes, impliquées dans la réponse aux stress oxydant et nitrosant (Arai, 2011; Arai *et al.*, 2005; Wei *et al.*, 2012). Ainsi, une hypothèse alternative à l'origine de nos travaux de recherche serait que les polluants atmosphériques de types NO_x induiraient une augmentation de la virulence bactérienne. Lors d'une étude au sein de services d'urgences européens, les *Pseudomonas spp.* s'avèrent l'un des genres bactériens prépondérants (14%) dans le cas de pneumopathies et accroissent le taux de mortalité (Vincent *et al.*, 2006). Au Laboratoire de Microbiologie Signaux et Microenvironnement (LMSM, EA 4312, Université de Rouen), de précédents travaux ont permis d'observer le caractère virulent (croissance à 37°C, production d'enzymes hémolytiques et protéolytiques) d'une souche aéroportée de *Pseudomonas fluorescens* MFAF76a, et de son congénère clinique MFN1032 (Duclairoir Poc *et al.*, 2014).

Lors de ses travaux doctoraux, le Dr T. Kondakova a finalisé un système original, permettant l'exposition directe et concomitante de bactéries issues de la même culture en présence ou non de polluants, à l'état gazeux (Kondakova *et al.*, 2016). De plus, ces travaux ont mis en évidence l'augmentation de caractères impliqués dans la virulence (*e.g.* antibiorésistance, biofilm), chez ces deux souches de *P. fluorescens* (Kondakova *et al.*, 2016).

Ainsi, dans la continuité de ces précédents travaux, les objectifs de ce projet doctoral ont été:

- D'évaluer l'**impact du stress nitrosant**, notamment sur l'enveloppe bactérienne de *P. fluorescens* MFAF76a, rencontré à l'issue d'une exposition au NO₂.
- D'identifier de **nouveaux bio-marqueurs** du stress nitrosant.
- De décrypter les mécanismes impliqués dans la **réponse et l'adaptation au stress nitrosant**, et l'apparition de phénotypes virulents via l'élaboration de mutants d'intérêts.

Ces travaux ont pour but d'établir un lien entre le polluant automobile NO₂ gazeux et les infections pulmonaires d'origine bactérienne.

Matériel et méthodes

I. Physiologie bactérienne

1. Souches bactériennes

Dans le cadre de cette thèse une souche environnementale aéroportée de *Pseudomonas fluorescens* : MFAF76a a été utilisée. Cette bactérie est psychotrope présentant une température optimale de croissance à 28 °C. Il a été néanmoins démontré lors d'une étude précédente qu'elle est également capable de se développer à 37 °C (Chapalain *et al.*, 2008; Duclair Poc *et al.*, 2014). Des mutants de délétion et de complémentation ont été réalisés. L'ensemble des souches et plasmides utilisés sont référencés dans les **Tableau 6** et **Tableau 7**.

Tableau 6 : Liste des souches utilisées.

CFBP : Collection française de bactéries associées aux Plantes

Souches	Caractéristiques	Références
<i>Pseudomonas fluorescens</i>		
MFAF76a	Isolée de l'air	(Morin <i>et al.</i> , 2013)
MFAF76a+EV	MFAF76a avec le plasmide pPSV35 vide, Gm ^R	Cette étude
MFAF76a+ <i>fliA</i>	MFAF76a avec le plasmide pPSV35 contenant le gène <i>fliA</i> , Gm ^R	Cette étude
MFAF76a+ <i>hmp</i>	MFAF76a avec le plasmide pPSV35 contenant le gène <i>hmp</i> , Gm ^R	Cette étude
MFAF76a+ <i>oprN</i>	MFAF76a avec le plasmide pPSV35 contenant le gène <i>oprN</i> , Gm ^R	Cette étude
MFAF76aΔ <i>hmp</i>	Mutation du gène <i>hmp</i> par délétion centrale (823 pb)	Cette étude
MFAF76aΔ <i>oprN</i>	Mutation du gène <i>oprN</i> par délétion centrale (1032 pb)	Cette étude
MFAF76aΔ <i>hmp</i> + <i>hmp</i>	MFAF76aΔ <i>hmp</i> avec le plasmide pPSV35 contenant le gène sauvage <i>hmp</i> , Gm ^R	Cette étude
MFAF76aΔ <i>oprN</i> + <i>oprN</i>	MFAF76aΔ <i>oprN</i> avec le plasmide pPSV35 contenant le gène sauvage <i>oprN</i> , Gm ^R	Cette étude

<i>Escherichia coli</i>		
S17.1	RP4-2-Tc ::Mu, <i>aph</i> ::Tn7, <i>recA</i> , <i>smR</i> , souche donneuse pour conjugaison	(Simon <i>et al.</i> , 1983)
Top 10®	F- <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr</i> - <i>hsdRMS</i> - <i>mcrBC</i>) φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74</i> <i>recA1</i> <i>araD139</i>	Collection LMSM

Tableau 7 : Liste des plasmides utilisés

Plasmides	Caractéristiques	Références
pAKE604	Vecteur plasmide conjugatif, Ap ^R , Km ^R , oriT, <i>lacZ</i> , <i>sacB</i>	(El-Sayed <i>et al.</i> , 2001)
pAKE604-Δ <i>hmp</i>	pAKE604 portant le gène <i>hmp</i> délété de sa partie centrale (823 pb)	Cette étude
pAKE604-Δ <i>oprN</i>	pAKE604 portant le gène <i>oprN</i> délété de sa partie centrale (1032 pb)	Cette étude
pME6032	Vecteur d'expression pVS1-p15A, <i>lac</i> ^q -Ptac ; Tc ^R	(Heeb <i>et al.</i> , 2000)
pPSV35	<i>P. aeruginosa</i> oriV, <i>lacIq</i> <i>mob+</i> , PlacUV5, pUC18 MCS, vecteur d'expression, Gm ^R	(Rietsch <i>et al.</i> , 2005)
pPSV35- <i>fliA</i>	pPSV35 portant le gène <i>fliA</i> (741 pb) de <i>P. fluorescens</i> MFAF76a (<i>EcoRI/XbaI</i>)	Cette étude
pPSV35- <i>hmp</i>	pPSV35 portant le gène <i>hmp</i> (1182 pb) de <i>P. fluorescens</i> MFAF76a (<i>EcoRI/XbaI</i>)	Cette étude
pPSV35- <i>oprN</i>	pPSV35 portant le gène <i>oprN</i> (1422 pb) de <i>P. fluorescens</i> MFAF76a (<i>EcoRI/XbaI</i>)	Cette étude

2. Milieux de culture

Dans le cadre de cette étude, les différentes souches utilisées (**Tableau 6**) ont été cultivées en milieu Luria Bertani (LB) supplémenté ou non d'antibiotiques. Le milieu LB est composé pour 1 litre de 10 g de tryptone, 5 g d'extraits de levure, 5 g de NaCl et le pH est ajusté à 7. Pour les étapes de sélection des mutants, le LB a été supplémenté de 10% de sucrose, de 40 µg/mL de 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside (Xgal) (Promega, France) et/ou d'antibiotiques. L'induction des gènes d'intérêt portés sur le plasmide pPSV35 a été réalisée par ajout d'Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside à 1 mM (IPTG) (Promega, France). Le milieu Cétrimide, composé pour 1 litre de 45,3 g de milieu deshydraté Cétrimide (Solabia, France) et de 10 mL de glycérol, a été utilisé pour la sélection des *Pseudomonas* après conjugaison avec *E. coli* S17.1. Enfin un milieu minimum *Davis Medium Broth* (DMB) a été utilisé lors de l'exposition de *P. fluorescens* au NO₂. Ce milieu a été choisi à la suite d'une étude préliminaire pour son faible pouvoir oxydant en présence du stress nitrosant comparé à un milieu riche. Le DMB est composé

pour 1 litre de 10,45 g de K₂HPO₄, 3,81 g de KH₂PO₄, 2,01 g de (NH₄)₂SO₄, 0,049 g de MgSO₄, 2,16 g de glucose et de 1 mL de solution trace (**Tableau 8**).

Tableau 8 : Composition de la solution trace constituant le DMB

Composants	Quantité (pour 1L)
CoCl ₂	20 mg
H ₃ BO ₃	30 mg
ZnSO ₄	10 mg
CuSO ₄	1 mg
NiCl ₂	2 mg
Na ₂ MoO ₄	3 mg
FeSO ₄	10 mg
MnSO ₄	2,6 mg

Afin d'obtenir du LB ou du DMB gélosés (LBg, DMA respectivement), l'ajout de 15 g/L d'agar est nécessaire.

L'ensemble de ces milieux est stérilisé par autoclavage à 121°C pendant 15 minutes. Les antibiotiques, l'IPTG ou le Xgal, étant thermosensibles, sont stérilisés, si nécessaire par filtration sur 0,22µm puis ajoutés extemporanément aux milieux stériles.

3. Conditions de culture

Toutes les pré-cultures bactériennes des différentes souches ont été réalisées dans 5mL de milieu Luria Bertani (LB) à partir du souchier. Les précultures sont incubées sur la nuit à 28°C pour *P. fluorescens* ou 37°C pour *E. coli* sous agitation orbitale à 180 rpm.

Des cultures bactériennes de *P. fluorescens* ont alors été réalisées par inoculation d'un milieu minimum *Davis Medium Broth* (DMB) à une densité optique de 580 nm (DO_{580nm}) égale à 0,08. Les cultures sont incubées à 28°C sous agitation orbitale à 180 rpm pendant 16 heures pour atteindre la phase stationnaire de croissance (2.10⁹ CFU/mL).

4. Cryo-conservation des souches

Les souches sont isolées sur gélose, supplémentée en antibiotiques si nécessaire afin de vérifier l'absence de contamination. Une suspension bactérienne est réalisée, puis mélangée à une solution cryo-protectrice fournie dans des tubes à cryo-billes (Fisher Scientific, France). Les tubes sont ensuite conservés en souchier à -80 °C.

5. Étude de la cultivabilité

Des tests de cultivabilité ont été effectués après exposition au NO₂ afin de mesurer la survie de la souche. Une gamme de dilution en eau physiologique stérile a été réalisée à

partir de la solution de resuspension des filtres. Un volume de 100 µL des dilutions est étalé en triplicat techniques sur LBG, puis incubé à 28 °C pendant 24h. Les unités formant des colonies (UFC) sont alors dénombrées, puis rapportées à une concentration moyenne en UFC/mL.

6. Suivi de croissance

Le suivi de la croissance bactérienne a été réalisé par mesure de l'absorbance à 580nm à l'aide de l'appareil Bioscreen C MBR (Oy Growth Curves Ab Ltd., Helsinki, Finlande). Brièvement, les cultures ont été resuspendues dans du DMB à une DO_{580nm} de 0,08, puis 200µL de la suspension bactérienne ont été déposés par puits dans une plaque 100 puits (HoneyComb[®]) en six réplicats techniques. Un témoin négatif a été réalisé à l'aide du milieu seul. La plaque a été incubée à 28 °C sous une agitation continue moyenne. La mesure a été effectuée toutes les 30 minutes pendant 24h. Enfin le temps de génération a été calculé à l'aide de la formule suivante :

$$G = \frac{T_{exp}}{\frac{\log N_t - \log N_o}{\log 2}}$$

Dans cette formule, T_{exp} représente le temps de la phase exponentielle, N_t et N_o : le nombre d'unités formant une colonie (UFC), à la fin et au début de la phase exponentielle, respectivement. Les cinétiques de croissance ont été réalisées en quatre réplicats expérimentaux indépendants.

7. Mesure de la perméabilisation membranaire

La perméabilité de la membrane bactérienne a été évaluée après exposition au stress nitrosant via le kit BacLight (L7012, Thermofisher, Leiden, Pays-Bas) selon les recommandations du fournisseur. Brièvement, 1mL de suspension bactérienne est marqué avec 5µM de SYTO9 (marqueur cellulaire) et 20µM d'iodure de propidium (IP, marqueur des cellules perméabilisées) pendant 10 minutes à température ambiante et à l'obscurité. Après marquage 5µL des échantillons sont déposés en duplicat sur lamelle. Le montage est stabilisé par l'utilisation de Prolong Diamond (Thermofisher) servant à maintenir la fluorescence. Les échantillons sont stockés à 4 °C pendant un mois si nécessaire avant observation au microscope confocal. Le reste des échantillons est étudié en duplicat par une technique de cytométrie en flux (CytoFLEX S, Beckman Coulter).

8. Microscopie confocale à balayage laser

L'observation de la perméabilisation membranaire a été effectuée à l'aide du microscope à balayage laser LSM 710 (Zeiss, Marly le Roi, France) avec l'objectif à

immersion à huile (63 x). Les paramètres d'acquisition pour les différents marqueurs utilisés sont indexés dans le tableau ci-dessous (**Tableau 9**).

Tableau 9 : Paramètres d'acquisition utilisé pour les différents marqueurs

Marqueur	Longueur d'excitation	Longueur d'émission
IP	535 nm	617 nm
Syto9	485 nm	498 nm

L'intensité de fluorescence, sa répartition et son homogénéité est calculé à l'aide du logiciel COMSTAT v2.1 2015 (Université technique du Danemark, Lyngby) (Heydorn *et al.*, 2000, 2002).

9. Cytométrie en flux phase liquide

La perméabilité des échantillons marqués à l'IP et au SYTO9 après exposition a été mesurée par une technique de cytométrie en flux CytoFLEX S (Beckman Coulter, Roissy, France). Dans un premier temps, l'appareil a été calibré à l'aide d'un standard (CytoFLEX Daily QC Fluorospheres, Beckman Coulter, Roissy, France). L'appareil est paramétré à l'aide du logiciel CytExpert v2.3.0.84 de 2018 (Beckman Coulter, Roissy, France) comme décrit ci-dessous (**Tableau 10**)

Tableau 10 : Paramètres utilisés sur le logiciel CytExpert

Paramètres d'acquisition	
Laser	IP : laser Bleu Excitation 488nm, canal de fluorescence 690/50nm Ou laser violet Excitation 405 nm, canal de fluorescence 610/20 nm SYTO9 : laser Bleu Excitation 488nm, canal de fluorescence 525/40 nm
Seuil du nombre d'évènement	10 000 évènements
Vitesse	Low (10 µL/min)

Deux témoins sont réalisés pour calibrer les seuils de *fluorescens* : un témoin négatif - suspension bactérienne en eau physiologique non marquée - et positif de perméabilité membranaire – suspension bactérienne traitée pendant 10 minutes à l'éthanol 100% (v/v) puis marquée. Chaque mesure ont été réalisées en duplicat techniques. Les expérimentations ont été réalisées en quadruplat biologiques.

II. Méthodes de physico-chimie

1. Exposition au NOx

Les cultures bactériennes ont été récupérées en début de phase stationnaire de croissance, puis étalées sur des membranes d'acétate de cellulose (diamètre des pores : 0,2µm, diamètre des membranes : 47mm, Sartorius Biolab, Dourdan, France) préalablement déposées sur du milieu DMA. Les bactéries sont ensuite incubées pendant 4 heures à 28°C afin d'obtenir une couche mince et homogène de bactéries sur filtre. Les membranes sont alors transférées sur un milieu constitué uniquement d'agar dans des boîtes rectangulaires (12,78 cm x 8,55 cm, Nunc, Thermo Scientific, Montigny le Bretonne, France). Les boîtes sont placées immédiatement dans un montage dédié à l'exposition des bactéries pendant 2 heures à 28°C (Ghaffari *et al.*, 2005; Kondakova *et al.*, 2016). Brièvement, le système d'exposition est constitué de deux chambres cylindriques en Plexiglas stériles permettant de contenir chacune 12 filtres. Un système d'injection et d'évacuation des gaz est connecté à chaque chambre. Deux conditions d'exposition sont ainsi réalisées en parallèle : « témoin » et « exposé » à partir de la même culture bactérienne. La condition « témoin » est réalisée à l'aide d'air synthétique constitué de 80% d'azote (N₂) et 20% d'oxygène (O₂). La condition « exposé » est réalisée par ajout d'une concentration de 45 ppm de dioxyde d'azote (NO₂) tout en maintenant le ratio N₂/ O₂. L'ensemble des bouteilles de gaz utilisées (Air Liquide GMP Europe, Grand-Couronne, France) sont reliées à des débitmètres (Alicat Scientific, Inc., Eybens, France.) afin d'ajuster le débit final d'exposition à 2 L/min. Au minimum, trois réplicats biologiques ont été réalisés pour chaque condition. Après exposition, les bactéries ont été récupérées des filtres dans 20 mL d'eau physiologique stérile et l'absorbance à 580nm a été mesurée. Différents tests physiologiques ont été réalisés immédiatement après exposition, puis la suspension est centrifugée 20 minutes à 13000g à 4°C pour récupérer séparément le culot et le surnageant. Des tests biochimiques et de biologie moléculaire ont été réalisés ultérieurement sur les culots congelés.

III. Méthodes de biochimie

1. Extraction des protéines totales

Les protéines totales ont été extraites à partir des culots bactériens obtenus après exposition conservés par congélation à -20°C. Les culots sont lavés trois fois avec 5 mL de tampon Tris-HCl à 20mM pH 7,4. Les bactéries sont ensuite lysées par 6 cycles successifs de sonication composés d'une minute de sonication en courant alternatif et 2 minutes de latence. Les débris cellulaires sont ensuite éliminés par centrifugation 15

minutes à 10000g à 4°C. Les extraits sont traités par des inhibiteurs de protéase (88666, Thermofisher, Illinois, Etats Unis) et de la Benzonase nucléase (E1014, Sigma Aldrich, St. Quentin Fallavier, France) pendant 30 minutes sur glace. Les protéines sont alors quantifiées par un dosage de Bradford (#500-0205, Bio-Rad, Marnes La Coquette, France) à l'aide d'une gamme étalon d'albumine de sérum bovin (W384A, Promega, Madison, Etats Unis) comprise entre 0 et 1 mg/mL. Brièvement, les échantillons et la gamme étalon sont dilués au 50^{ème} avec la solution de Bradford, puis incubés à température ambiante pendant 30 minutes à l'abri de l'obscurité. L'absorbance à 595 nm est ensuite mesurée et la concentration en protéine peut être évaluée à l'aide de la gamme. Les échantillons ont été concentrés à 30µg avant d'être identifiés et quantifiés de manière relative (condition exposé/témoin) par l'intermédiaire d'une collaboration avec la plateforme de protéomique PISSARO (Rouen). La technique utilisée pour cette étape est la chromatographie liquide couplée à de la spectrométrie de masse (LC-MS, Orbitrap)

2. Étude du profil de glycérophospholipides (GPs)

2.1. Extraction des GPs

L'extraction des lipides a été réalisée selon la méthode de Bligh et Dyer (Bligh *et al.*, 1959). Brièvement, une culture de 100mL de *Pseudomonas fluorescens* en LB est lavée trois fois successives avec de 2 mL d'eau physiologique stérile après centrifugation à 13000g 4°C pendant 10 minutes. Puis le culot est resuspendu dans 2mL d'eau milliQ stérile avant d'être transféré dans des vials en verre. Le culot est alors lyophilisé à l'aide du programme suivant : 3h à -30 °C, 3h à -5 °C. Les échantillons sont alors conservés à température ambiante. Environ 1g de cellules lyophilisées est resuspendu avec 3 mL d'un mélange Chloroforme/Méthanol (1/2, v/v) afin de lyser les cellules. Le mélange est complété de 1 mL de chloroforme et 1,8 mL d'eau HPLC successivement. La phase chloroforme contenant les extraits lipidiques est ensuite collectée et évaporée sous un flux d'azote (N₂) avant d'être stockée à -20 °C.

2.2. Analyse des GPs

2.2.a. Séparation sur chromatographie couche mince (CCM)

Les GPs ont été séparés à l'aide d'une chromatographie sur couche mince (CCM) en utilisant une méthode adaptée de Fuchs *et al.*, 2007. Les plaques de CCM (1.05556.0001, HPTLC Silica gel 60 F₂₅₄, Merck, Allemagne) ont dans un premier temps été conditionnées à l'aide du solvant d'élution constitué de : Chlorofome/Éthanol/Eau/Triéthylamine

(35/35/7/35, v/v/v/v) et activées à 100°C sous vide pendant 2 heures. Les extraits de GPs ont été déposés en triplicat sur CCM et séparés à température ambiante. Les spots de GPs ont ensuite été révélés à l'aide d'un spray à la primuline (206865, Sigma Aldrich, France) 0,05% dans un mélange acétone/eau (8/2, v/v) puis visualisés par *fluorescens* UV à 365 nm. Ce colorant se lie de manière non covalente aux résidus apolaires d'acides gras et n'affecte pas l'analyse MS ultérieure des CCM (Richter *et al.*, 2008). Les facteurs de rétention (R_i) ont été calculés en utilisant le logiciel Sweday JustTLC (v. 4.0.3, Lund, Suède).

2.2.b. Identification des GPs

Les GPs ont été directement identifiés après séparation sur chromatographie couche mince par spectrométrie de masse à temps de vol et désorption ionisation laser assistée par matrice (MALDI-TOF MS) (MS : Autoflex III, laser : Optibeam™ Nd/YAG 355nm, fréquence triple de 200 Hz; Bruker Daltonics) selon les conditions décrites par Kondakova et collaborateurs (Kondakova *et al.*, 2015). L'acide 2,5-Dihydroxybenzoïque (DHB, 85707, Sigma Aldrich, Allemagne) a été utilisé comme matrice (200 g/L dans un mélange d'acétonitrile et d'acide trifluoro-acétique à 0,1% (90 :10, v/v). Le voltage d'excitation utilisé est de 19,5 kV et le voltage du réflecteur de 21 kV. La puissance du laser a été maintenue à 30%. Les spectres MS ont été acquis avec le réflecteur en mode ion positif. Chaque acquisition a été réalisée grâce à 200 coups de laser sur un même point. Pour chaque GPs détectés une analyse par MS-MS a été réalisée afin d'identifier précisément la composition chimique de ces molécules par analyse *Post source Decay* (PSD) comme décrit précédemment (Fuchs *et al.*, 2007).

IV. Méthodes de bio-informatique

1. Identification de séquences d'intérêt

La souche d'intérêt de *Pseudomonas fluorescens*, MFAF76a, ayant été préalablement séquencée et partiellement assemblée, son génome a pu être annoté à l'aide du logiciel automatisé *Rapid Annotation using Subsystem Technology* (RAST) v2.0 2015 (<http://rast.theseed.org/FIG/rast.cgi>). L'annotation de contigs d'intérêts a été également vérifiée à l'aide du serveur CDSEasy (http://db-mml.sjtu.edu.cn/STEP/STEP_CDSeasy.php). En parallèle, une étude *in silico* sur la présence de gènes d'intérêt a été également effectuée à l'aide du logiciel Blast+ v2.7.1 de 2017 (NCBI, <ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/blast/executables/blast+/LATEST/>) par comparaison des séquences nucléiques (blastn) et traduites en protéines (blastx) aux bases de données disponibles sur *Pseudomonas.com* (<http://www.Pseudomonas.com/>), le KEGG (<https://www.genome.jp/kegg/pathway.html>), Uniprot (<https://www.uniprot.org/>) et

PATRIC (<https://www.patricbrc.org/>). Les souches de référence de *Pseudomonas fluorescens* actuellement disponibles (A506, SBW25, SS101, PF01) sur ces différentes bases de données ont permis une meilleure identification des gènes d'intérêt.

2. Élaboration des amorces pour la RT-qPCR

Les paires d'amorces utilisées pour l'étape de RT-qPCR (**Tableau 11**) ont été dessinées à l'aide du logiciel Primer express[®] version 3.0.1 de 2015 (Applied Biosystem[®], ThermoFisher Scientific, France) permettant de s'assurer de l'absence de structure secondaires ou d'homo- et hétérodimérisation des amorces. La température de fusion choisie pour ces amorces est de 60°C, la taille des amorces est comprise entre 15 et 25 nt et la région amplifiée est comprise entre 50 et 150 nt.

Tableau 11 : Amorces de RT-qPCR utilisées pour la souche *P. fluorescens* MFAF76a

Gène	Accession	Amorce sens (5' → 3') (F)	Amorce antisens (3' → 5') (R)
<i>algD</i>	MH937712	AAAGCCCGCTGGTCGAA	TCGTAGATGCTCAGGTCGTAACC
<i>algU</i>	MH937713	CCATGAAGCCAGGACGTT	ATTCCAAGTGCCCGATACG
<i>mexS</i>	MH937719	GATCGCGGCGACCAAAT	TTCCTCTTCGGTGACGATGAC
<i>mexT</i>	MH937720	CTCGCTGAGCCTGGATGAC	TTCCAGCTCTTCATCGATAAACC
<i>mvaT</i>	MH937721	TTGTCCAGACTCGCTGAATTC	GCCCGGCATCGTTCTTC
<i>oprF</i>	MH937723	CCCATCCACCACCACTACTGTT	CGCTCGGACAGTTTCTGGTT
<i>recA</i>	MH937724	ATCGCCCATACGCATTACG	CGGCCCTGGGTCAGATC
<i>sigX</i>	MH937725	GATTTGTCGCAGAGCTGGAGTT	TGTCGCACTCAAACCCATGT
<i>ahpC</i>	MK305853	GCCTATCATCAACAGCCAAGTAA	AGCATCCGAGACTTGAACGAA
<i>ahpF</i>	MK305854	CGAACACCGATTGGCTGAA	ATCCCCGCAATCGAAGTCT
<i>anr</i>	MK305855	CAGTTGATGCGGGTGATGAG	CGACAGCAGCAGCATCATTT
<i>fur</i>	MK305856	CCTGCCACGGGTCAAGAT	GCTTCCATCAACGCCTTGTAG
<i>hmp</i>	KT070325	AAACCGCGATCTATGACCAG	GCTTCATGCCGATGTACTGA
<i>iscA</i>	MK305857	ACGAGGTAGTGGCGGAAGATC	TCGGTGCCGTCCAGGTA
<i>iscR</i>	MK305858	CATCTCCCTGTCCTACCTCGAA	ACCGCGAACGCTGGAA
<i>iscS</i>	MK305859	AATTGCCGATTTACCTTGATTACTCT	GACCAGCAGGCATTCACTCA
<i>katA</i>	MK305860	CAAGCGGCGGCTCATT	CGATCAACGGAACTCCTTCTG
<i>sodA</i>	MK305861	ATGCCTACGATGCCCTTGAG	GATGCTTGGTGTAATGGATTTC

3. Élaboration des amorces pour la création de mutants

Les séquences des amorces utilisées pour élaborer les différents mutants ont été dessinées sur le site web <http://primer3.ut.ee/>. Les régions à amplifier sont de l'ordre de 700-850 pb. Les températures d'hybridation des amorces sont ensuite calculées sur le site <https://tmcaculator.neb.com/#!/main> pour l'enzyme Taq Phusion® High Fidelity (NEB Ipswich, Angleterre) et ne doivent différer au plus de 5 °C entre couples d'amorces (**Tableau 12**).

Tableau 12 : Liste des amorces utilisées pour la mutagenèse.

Les lettres en rouge correspondent à une extension de l'amorce permettant la fixation des enzymes sur leurs sites de restriction ; les lettres en violet, bleu et vert correspondent respectivement aux sites de restriction pour les enzymes NdeI, XbaI et XhoI ; Les lettres noires correspondent aux séquences faisant partie des séquences flanquantes ou internes du gène à muter.

Gène	Amorce sens (5' → 3')	T _m (°C)
Mutant de délétion du gène <i>hmp</i>		
Muta1- <i>hmp</i> -F	CATCGACGAATAAAGGACAG	60
Muta2- <i>hmp</i> -R	TAATAACATATGATGATTTTGGCCACCA	58
Muta3- <i>hmp</i> -F	TAATAACATATGCTATTGCTATGCCGAAGAAG	58
Muta4- <i>hmp</i> -R	TAATAATCTAGACGGCAGATCATCGACAAT	62
Mutant de délétion du gène <i>oprN</i>		
Muta1- <i>oprN</i> -F	AGAAACTGCTCAAGGAAGAA	58
Muta2- <i>oprN</i> -R	TAATAACTCGAGAACGGTCTGAAGTTCTTTTG	59
Muta3- <i>oprN</i> -F	TAATAACTCGAGGTCAGCAACGTTTGATCTC	58
Muta4- <i>oprN</i> -R	TAATAATCTAGACGATTCGTTCTATGTCAGTG	58

Deux couples d'amorces ont été dessinés pour les mutants de délétion notés Muta 1 à 4. Les amorces 1 et 2 permettent la formation d'un amplicon comprenant la région flanquante en amont du gène d'intérêt et le début de sa séquence en 5'. Les amorces 3 et 4 permettent la formation d'un amplicon comprenant la région flanquante en aval du gène d'intérêt et la fin de sa séquence en 3' (**Figure 30**).

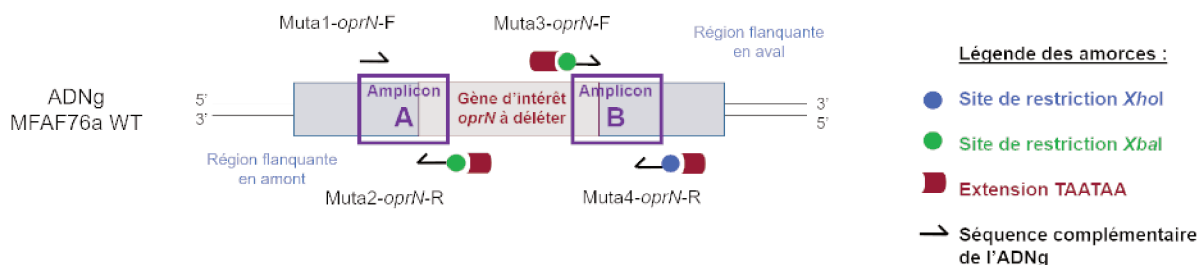


Figure 30 : Exemple des amorces dessinées pour le mutant de délétion du gène *oprN*

La séquence nucléique du gène d'intérêt déléte est vérifiée *in silico* afin de s'assurer que le cadre de lecture (Open Reading Frame, ORF) n'est pas décalé par rapport à la séquence du gène sauvage. La structure 3D de la protéine recombinante obtenue à partir de

cette séquence est également vérifiée à l'aide du site <http://www.cathdb.info/> pour s'assurer de l'absence du site actif présent sur la protéine sauvage.

Concernant les amorces dessinées pour les mutants de complémentation, la même stratégie a été utilisée. Dans ce cas, le couple d'amorces a été créé afin d'amplifier la totalité du gène d'intérêt. La région à amplifier, à définir sur l'outil <http://primer3.ut.ee/>, est donc dépendante de la taille du gène d'intérêt (*hmp* : 1182 pb, *oprN* : 1422 pb) (**Tableau 13**).

Tableau 13 : Liste des amorces utilisées pour la complémentation.

Les lettres en rouge correspondent à une extension de l'amorce permettant la fixation des enzymes sur leurs sites de restriction ; les lettres en orange et bleu correspondent respectivement aux sites de restriction pour les enzymes EcoRI, XbaI ; Les lettres noires correspondent aux séquences faisant partie des séquences flanquantes ou internes du gène à muter.

Gène	Amorce sens (5' → 3')	T _m (°C)
Mutant de complémentation du gène <i>hmp</i>		
Comp- <i>hmp</i> -F	TAATAAGAATTCCAGTCACCTTATGCTTAGCG	57
Comp- <i>hmp</i> -R	TAATAATCTAGATTGCCTTTCCTTTGTAAGTC	58
Mutant de délétion du gène <i>oprN</i>		
Comp- <i>oprN</i> -F	TAATAAGAATTCCGCAACAATGAGTCTGAAA	60
Comp- <i>oprN</i> -R	TAATAATCTAGAAAGGAGCTCTTAAACAACCTT	56

4. Vérification de la séquence nucléotidique

Le séquençage des produits de PCR et des constructions plasmidiques contenant l'insert d'intérêt a été réalisé par le prestataire de service Beckman Coulter Genomics (Royaume-Uni, <http://www.beckmangenomics.com/>). Les séquences ont été analysées par alignement de séquence à l'aide du logiciel *BioEdit Sequence Alignment Editor* (Hall, 1999) ainsi que par Blast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

5. Étude de la séquence protéique et de la structures 3D

Une étude prédictive de la structure 3D de la protéine Hmp a été réalisée à l'aide du logiciel RaptorX (<http://raptorx.uchicago.edu/>). L'homologie des séquences protéiques de Hmp et HmpR avec celles de *P. aeruginosa*, respectivement Fhp et FhpR a été étudié en utilisant Blast (blastp).

6. Analyse statistique

L'ensemble des données ont été analysées à l'aide d'un test non paramétrique de Mann-Whitney à l'aide du logiciel GraphPad Prism v6.

V. Méthodes de biologie moléculaire

1. Extraction d'ADN génomique

L'ADN génomique des souches d'intérêts a été extrait dans le but de vérifier les amorces dessinées pour la RT-qPCR ainsi que la réalisation de différents mutants. Ainsi 1mL de préculture bactérienne a été lavé à deux reprises avec 1mL d'eau physiologique stérile froide après centrifugation à 8000g 4°C pendant 5 minutes. Le culot est ensuite repris dans 500µL d'eau distillée stérile froide et chauffé à 100°C pendant 10 minutes afin de lyser les cellules. Les débris cellulaires sont éliminés par centrifugation 8000g 5 minutes à température ambiante. Le surnageant, contenant l'ADN génomique, est quantifié par lecture de l'absorbance à 260nm et conservé à -20°C.

2. Extraction de plasmides

Les plasmides bactériens ont été extraits à l'aide du kit *PureLink Quick Plasmid Miniprep* (Invitrogen™, Vilnius, Lituanie) selon les recommandations du fournisseur à partir d'une culture bactérienne en phase stationnaire.

3. Séparation d'acides nucléiques

Les fragments d'acides nucléiques (ARNm, produits de PCR) et les plasmides d'intérêt sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose (de 1% pour les fragments de grande taille, 2% pour ceux de petite taille) dans un tampon Tris-Acétate EDTA (TAE) 1X. Le TAE est composé pour un litre de 40mM de Tris, 0,1 % d'acide acétique, 2mM d'acide éthylènediaminetétraacétique (EDTA) et le pH est équilibré à 8,5. Du tampon de charge (30% glycérol, 0,25% bleu de bromophénol) est ajouté aux échantillons à un ratio 1/5 (v/v) avant dépôt sur gel. La migration a été réalisée à 130V pendant 20 minutes. Les échantillons sont visualisés sous UV à 280nm après coloration des gels pendant 30 minutes dans un bain de Sybr® Safe DNA Gel (Invitrogen™, Etats Unis). La taille des fragments d'acides nucléiques est mesurée à l'aide du marqueur de taille GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (ThermoFisher™, Bleiswijk, Pays Bas).

4. Quantification des acides nucléiques

Les extraits nucléiques (ADN, ARN) ont été quantifiés à l'aide du NanoDrop 2000c™ (Thermo Scientific™, Etats Unis) par lecture de l'absorbance à 260 nm. Les rapports d'absorbance $A_{260/230}$ et $A_{260/280}$ ont également permis de s'assurer de l'absence de contamination de type solvant organique (230nm) ou protéique (280nm) respectivement.

5. Construction des séquences nucléiques pour les mutants

5.1. Amplification par polymérase chain reaction (PCR)

Les séquences d'intérêt pour la conception des mutants (délétion et complémentation) ont été amplifiées par PCR à l'aide de la polymérase : Taq Phusion® High Fidelity DNA polymerase (NEB, Ipswich, Angleterre). Les conditions de PCR utilisées sont adaptées selon les recommandations du fournisseur. Le mélange réactionnel de PCR est constitué de tampon HF à 1X, d'amorces à 0,8 µM, DNTP à 0,2 mM, d'ADN chromosomique à environ 0,6 ng, d'enzyme Taq Phusion® DNA polymerase à 0,5U pour un volume réactionnel de 50µL. Le cycle de PCR est composé d'une étape de dénaturation à 98°C pendant 30 secondes, puis 30 cycles de dénaturation (98°C, 10 secondes), hybridation (T_m référencé dans les **Tableau 12** et **Tableau 13**, 30 secondes) et d'élongation (72°C, 1 min/kb) suivie d'une dernière étape d'élongation à 72°C pendant 5 minutes. Les échantillons sont vérifiés sur gel d'agarose et quantifiés, puis conservés à -20°C.

5.2. Purification des produits de PCR

Les produits de PCR sont purifiés à l'aide du kit PureLink® PCR Purification (Invitrogen™, Vilnius, Lituanie) selon les recommandations du fournisseur.

5.3. Digestion enzymatique

La sélection des enzymes de restriction utilisées dans le cadre de la construction de mutants dépend de deux critères : présence dans cassette de multiclonaage (MCS) du plasmide et absence au sein des fragments d'ADN d'intérêt. La localisation des sites de restriction sont vérifiés à l'aide de l'outil RestrictionMapper v3 (<http://www.restrictionmapper.org/>). Les enzymes de restriction sont utilisées dans les conditions optimales décrites par le fournisseur *New England Biolabs Inc.* (NEB® Ipswich, Angleterre) et, dans le cas de double digestion, de l'outil en ligne *Double Digest Finder* (<https://nebcloner.neb.com/#!/redigest>) comme décrit ci-dessous dans le **Tableau 14**.

Tableau 14 : Liste des enzymes de restriction et conditions utilisées

Enzyme	Site de restriction	Tampon	Digestion		Inactivation	
			Température	Durée	Température	Durée
<i>EcorI</i>	G▼AATTC CTTAA▲G	CutSmart® Buffer	37 °C	1 h	65 °C	20 min
<i>NdeI</i>	CA▼TATG GTAT▲AC	CutSmart® Buffer	37 °C	1 h	65 °C	20 min
<i>SmaI</i>	CCC▼GGG GGG▲CCC	CutSmart® Buffer	25 °C	1 h	65 °C	20 min
<i>XbaI</i>	T▼CTAGA AGATC▲T	CutSmart® Buffer	37 °C	1 h	65 °C	20 min
<i>XhoI</i>	C▼TCGAG GAGTC▲T	CutSmart® Buffer	37 °C	1 h	65 °C	20 min

5.4. Ligature des fragments d'acides nucléiques

Les constructions de plasmides recombinants à partir d'inserts digérés et de plasmides linéarisés ont été réalisées à l'aide de la T4 DNA Ligase (NEB, Ipswich, Angleterre) selon les recommandations du fournisseur. Afin d'optimiser la ligature, un ratio de 3/1 a été utilisé pour le mélange insert/plasmide respectivement en fonction des quantifications d'acides nucléiques réalisées préalablement. L'outil NEB BioCalculator (<https://nebiocalculator.neb.com/#!/ligation>) a été également utilisé pour adapter les concentrations de plasmide et d'insert en fonction de leurs tailles respectives.

6. Transformation des souches d'*Escherichia coli*

6.1. Préparation de cellules compétentes

Les souches d'*E. coli* S17.1 et Top 10[®] sont cultivées à 37 °C dans 50mL de LB sous agitation orbitale de 180 rpm. Une fois la phase exponentielle atteinte (DO_{580nm} 0,6 à 0,8), les cellules sont centrifugées à 2000g à 4 °C pendant 10 minutes. Le culot bactérien est conservé pendant 10 minutes dans la glace, puis repris dans 5 mL de tampon TSB froid. Le TSB est constitué pour 50 mL de 5 g de polyéthylène Glycol 8000, 2,5 mL de diméthylsulfoxyde (DMSO), 101,5 mg de MgCl₂ (H₂O) et de 60,15 mg de MgSO₄. Les bactéries sont stockées à -80 °C en aliquot de 100µL pour des transformations par choc thermique ultérieurement.

6.2. Transformation par choc thermique

Un mélange constitué de 20µL de KCM 5 X froid (1,86g de KCl, 1,1g de CaCl₂ (H₂O), 2,54 g de MgCl₂ (H₂O) et d'eau milliQ qsp 50 mL), 10µL de produit de ligature ou 5 µL d'une extraction

plasmidique et d'eau distillée froide (qsp 100 µL) sont ajoutés à 100 µL de bactéries rendues préalablement compétentes. Le mélange est incubé 20 minutes sur glace, puis chauffé à 42 °C pendant 45 secondes avant d'être incubé à nouveau sur glace pendant 5 minutes. Un volume de 500 µL de LB est ajouté à la suspension bactérienne, puis incubé à 37 °C pendant 1h30. Les cellules sont alors étalées sur LBG supplémenté de l'antibiotique approprié (**Tableau 7**).

Dans le cas de la construction pour le clonage, du X-gal est ajouté à 40 µg/mL au LBG afin de sélectionner les clones ayant intégré le fragment. En effet, l'ajout de l'insert dans le MCS du plasmide situé dans le gène *lacZ* inactive la synthèse de β-galactosidase. Ainsi, la dégradation du X-gal par cette enzyme en composé bleu étant impossible, les clones ayant bien intégré la construction d'intérêt apparaîtront blancs. Ces derniers sont néanmoins vérifiés par PCR afin de s'assurer de la construction.

7. Transformation des souches de *Pseudomonas fluorescens*

7.1. Préparation de cellules compétentes

La biomasse issue d'une culture fraîche sur LBG est resuspendue dans de l'eau distillée stérile froide. Le culot est lavé successivement à l'aide d'eau distillée stérile froide après des étapes de centrifugation à 10000g à 4 °C pendant 1 minute. Le culot bactérien est alors repris dans 100 µL d'eau distillée stérile froide.

7.2. Transformation par électroporation

Environ 150 ng d'ADN plasmidique sont ajoutés aux souches rendues préalablement compétentes. Cette suspension est transférée dans une cuve d'électroporation (1 mm, Thermo Scientific™) puis une décharge électrique de 1800 V pendant 5 millisecondes est fournie au système (Gene transformer GTF100, Savant). Un volume de 500µL de LB préchauffé à 28 °C est ajouté immédiatement à la suspension bactérienne puis le mélange est incubé à 28 °C pendant 1h30 sous une agitation orbitale de 180 rpm. Enfin les bactéries sont étalées sur LBG supplémenté de l'antibiotique spécifique au plasmide transféré dans la bactérie afin de sélectionner les transformants (**Tableau 7**).

7.3. Transformation par conjugaison

Le plasmide pAKE604 contenant la version du gène d'intérêt avec une délétion centrale (**Tableau 7**) est transféré par conjugaison biparentale entre la souche *E.coli* S17.1 et *P. fluorescens* MFAF76a. La croissance des bactéries est arrêtée en phase stationnaire pour *P. fluorescens* et *E. coli* S17.1 (contenant le plasmide recombinant) en phase exponentielle.

Les cultures sont centrifugées à 7500g pendant 5 minutes à température ambiante et les culots sont repris dans 100 µL d'eau physiologique stérile. Un mélange équivolume des deux souches est réalisé puis étalé sur LBg avant incubation à 37°C pendant 24h. A cette température les deux souches sont capables de croître et MFAF76a est incapable d'exercer son activité antibactérienne médiée par son système de sécrétion de type VI. Les clones de *P. fluorescens* MFAF76a ayant effectué la première recombinaison homologue sont sélectionnés sur Cétrimide complémenté de kanamycine à 50 µg/mL à 28°C pendant 48 h. Les souches de *P. fluorescens* MFAF76a ayant réalisé la deuxième recombinaison homologue sont par la suite sélectionnées par repiquage des clones sur LBg supplémenté de 10% de sucrose. En effet, le plasmide intégré au sein de l'ADN génomique de MFAF76a contient le gène *sacB* conférant une sensibilité au sucrose. Ainsi la présence de sucrose favorise la sélection des clones ayant éliminé le plasmide par recombinaison homologue. Les clones positifs contenant la version du gène délété de sa partie centrale sont vérifiés par PCR à l'aide de l'amorce sens Muta1-F et de l'amorce antisens Muta4-R (**Tableau 12**), en fonction de la taille des amplicons.

8. Étude d'expression de gènes par RT-qPCR

8.1. Extraction des ARN totaux

Afin de déterminer les modifications d'expression génétique à la suite de l'exposition au stress nitrosant, une étude transcriptomique ciblée sur des gènes d'intérêts a été réalisée par une technique de RT-qPCR. Dans un premier temps les échantillons après exposition sont arrêtés métaboliquement par ajout d'un volume de mélange acétone/éthanol froid (v/v) à la suspension bactérienne. Les échantillons sont stockés à -80 °C sous forme de culot après centrifugation à 4 °C pendant 10 minute à 13000 g avant de réaliser une extraction d'ARN par phénol acide chaud. Brièvement, les cellules sont lysées à l'aide de 300µL de tampon constitué de sodium dodécyl sulfate (SDS) à 0,5 %, d'EDTA à 1 mM, de sodium acétate pH 5,5 à 0,02 M et d'eau traitée contre les RNAses au diéthylpyrocarbonate (DEPC) qsp 10 mL. Les échantillons sont ensuite ajoutés à un mélange de 100µL d'eau DEPC et 600µL de phénol acide chaud (pH 4,3) et incubés 3 minutes à 60 °C. La phase organique est ensuite récupérée après centrifugation à 13000 g pendant 4 minutes à température ambiante, puis une deuxième étape d'extraction au phénol acide chaud est réalisée. La phase organique est ensuite mélangée à 500µL de chloroforme-isoamyl (24/1, v/v) puis immédiatement centrifugée à 13000 g pendant 4 minutes à température ambiante. Enfin les ARN totaux sont précipités sur la nuit à -20°C par ajout de 2 volumes d'éthanol glacial 100% et 1/10 de volume de sodium acétate à la

phase aqueuse. Les culots d'ARN sont récupérés par centrifugation à 13000 g pendant 4 minutes à 4 °C, puis lavés à l'aide d'éthanol 75 % avant d'être séché. Ces derniers sont ensuite resuspendus dans 43µL d'eau DEPC puis traités avec 10U de TurboDnase I (AM2238, Life technology) dans un mélange réactionnel contenant 6,25 mM de MgCl₂ pendant 2 heures à 37°C afin d'éliminer toutes traces d'ADN. L'absence d'ADN résiduel est contrôlé par PCR en utilisant le couple d'amorce *recA-R/recA-F* (**Tableau 11**). Les échantillons sont traités à nouveau à la DNase si besoin pendant 1h. Enfin l'enzyme est inactivée par ajout d'EDTA à 0,01M suivi d'une incubation à 75°C pendant 10 minutes. La qualité des ARN totaux est évalué par migration des échantillons par électrophorèse (130 V, 20 minutes) sur gel d'agarose 2% dans du Tris-Acetate EDTA (TAE) 1X. La concentration en ARN totaux est quantifiée par lecture de l'absorbance à 260 nm via un spectrophotomètre.

8.2. Réaction de transcription inverse (RT-PCR)

Les ARN totaux sont convertis par transcription inverse (*reverse transcription*, RT) en ADN complémentaire (ADNc) à l'aide du kit « *High capacity cDNA RT* » (Applied Biosystem®, Life technology) selon les recommandations du fournisseur. Brièvement, 25 µL d'échantillon concentré à 50 µg/mL sont ajoutés à un mélange réactionnel constitué de Tampon à 2X, de dNTP à 8 mM, d'amorces aléatoires à 2X, d'enzyme à 5U et d'eau DEPC qsp 25 µL (RT⁺). Des contrôles sont réalisés (RT⁻) sans ajout d'enzyme. Le cycle de RT-PCR est composé d'une étape à 25°C pendant 10 minutes et d'une étape à 37°C pendant 120 minutes. L'enzyme est enfin inactivée par incubation du mélange à 85°C pendant 5 minutes. Le contrôle de la qualité des ADNc est réalisé par électrophorèse (130 V, 20 minutes) sur gel d'agarose 2% dans du TAE 1X. Les échantillons RT⁺ et RT⁻ sont stockés à -20°C.

La qualité des amorces a été vérifiée par PCR sur un extrait d'ADN génomique de la souche d'intérêt (PCR Master Mix 2X, K0171, Thermofisher). Le mélange réactionnel est constitué de 1X de PCR master mix, 0,5µM d'amorces sens et antisens, 1µg d'ADN génomique et d'eau qsp 50µL. Le cycle de PCR est composé d'une étape de dénaturation à 95°C pendant 3 minutes, suivie de 30 cycles : de dénaturation à 95°C pendant 30s, d'hybridation à 60°C pendant 30s et d'élongation à 72°C pendant 30s. Enfin une étape de dénaturation finale à 72°C pendant 5 minutes est réalisée avant de faire migrer les échantillons sur un gel d'agarose 1% dans du TAE 1X.

8.3. Étape de PCR quantitative (qPCR)

L'étape d'amplification en temps réel (qPCR) a été réalisée en utilisant l'appareil 7500 Fast Real Time PCR (Applied biosystem®, ThermoFisher Scientific, California, Etats Unis). Le mélange réactionnel de PCR est constitué de 6,5µL de Fast SYBR™ Green Master Mix (4444557 Thermofisher, Vilnius, Lituanie) - contenant la polymérase, les dNTPs et dUTPs – de 300nM de chaque amorces d'intérêt et d'eau DEPC qsp 10µL auquel est rajouté 3µL d'ADNc. Le programme d'amplification utilisé comprend une étape de dénaturation à 95 °C pendant 20 minutes, suivie de 40 cycles de dénaturation (95 °C, 10 s), hybridation (60 °C, 30 min) et élongation (72 °C, 6 s). Enfin une étape à 72°C pendant 5 minutes a permis d'obtenir la courbe de fusion pour chaque amorces révélant ainsi la présence d'homo- ou hétéro-dimères d'amorces ou encore l'amplification de sites aspécifiques. Une gamme standard a été réalisée afin de déterminer l'efficacité de PCR pour chaque amorces. Pour cela, un mélange équivolume des différentes conditions (témoin, exposé et/ou sauvage et mutant) est réalisé puis dilué au 20^{ème} (ND). Une gamme de dilution au tiers est effectuée à partir de cette solution jusqu'au 1/27. Chaque dilutions ont été analysées en duplicat. Les résultats obtenus pour chaque points de la gamme d'ADNc via l'utilisation d'une équation linéaire ont permis de déterminer l'efficacité de PCR (E) :

$$E=10^{(1/a)}$$

où a représente le coefficient directeur ou pente de la courbe.

9. Analyse de l'expression de gènes cibles

La quantification relative de l'expression de chaque gènes étudiés, entre la condition témoin et exposée sur la souche sauvage et les mutants, a été réalisée par comparaison des cycles seuil (Cycle threshold, Ct) ($2^{-\Delta\Delta Ct}$). Le gène *recA* codant la recombinase A a été utilisé comme gène de référence (Alqarni *et al.*, 2016).

Résultats

I. Partie 1 : Le NO₂ et la membrane : une perméabilisation à l'origine de l'apparition de phénotypes antibiorésistant ?

1. Article 1 : Impact of gaseous NO₂ on *P. fluorescens* strain in the membrane adaptation and virulence

S. Depayras, T. Kondakova, N. Merlet-Machour, H.J. Heipiepper, M. Barreau, C. Catovic, M.G.J Feuilloley, N. Orange, C. Duclairoir-Poc

Publié dans *International Journal of Environmental Impacts*, Volume 1, N°2 (2018), pp.183-192, DOI : 10.2495/EI-V1-N2-183-192

Contributions : J'ai conçu, réalisé et écrit ce travail avec le Dr Duclairoir-Poc. Les professeurs Merlet-Machour et Heipiepper ainsi que le Docteur Kondakova et Mme Catovic ont contribué à l'étude du lipidome de *P. fluorescens* MFAF76a. L'ensemble des co-auteurs ont participé à la relecture constructive de cet article.

1.1. Contexte d'étude

Les oxydes d'azotes sont des composés menaçants, à forte concentration, que ce soit chez les eucaryotes ou les procaryotes. Le NO est un agent à double facette pouvant réguler un grand nombre de fonctions vitales chez l'Homme, tels que la vaso-relaxation, la neurotransmission, ou encore l'élimination de pathogènes. Ce dernier axe a soulevé un grand intérêt dans le développement de prétraitements pour lutter contre des germes pathogènes multi-résistants. De nombreuses études ont montré l'impact de ce gaz sur la physiologie bactérienne notamment le métabolisme énergétique, la mise en place de mécanismes de réparation et de détoxification. Largement diffusible au travers des membranes biologiques, le NO gazeux démontre néanmoins un fort pouvoir délétère sur les constituants membranaires : lipides, protéines chez l'eucaryote. De plus, l'enveloppe bactérienne comme tel est le cas de *P. aeruginosa*, présente des grosses différences morphologiques après traitement au NO (**Figure 31**).

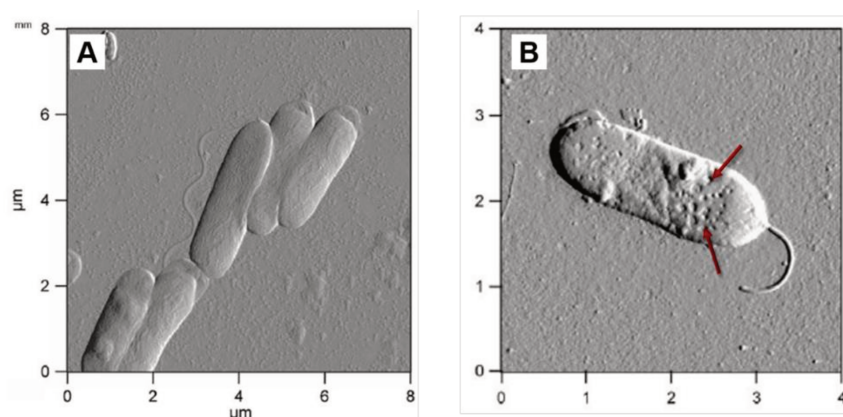


Figure 31 : Observation de *P. aeruginosa* à la suite d'une exposition au NO par microscopie à force atomique (adaptée de (Deupree and Schoenfisch, 2009)).

(A) Observation de la morphologie de *P. aeruginosa* en absence de NO ; (B) Observation de la morphologie de *P. aeruginosa* en présence de NO. Les flèches rouges indiquent la formation de pores induite, au niveau de l'enveloppe de *P. aeruginosa*, par le NO.

Ainsi l'enveloppe bactérienne de *Pseudomonas sp.*, est sensible au stress nitrosant. Cette enveloppe fournie à la bactérie une première barrière de protection contre son environnement. Des altérations de cette structure peuvent engendrer un stress d'enveloppe à l'origine d'importants changements physiologiques chez la bactérie (adaptation et virulence) voire être délétères si aucun mécanisme d'adaptation et/ou de réparation ne sont mis en place. Bien que moins étudié, le NO₂ reste un polluant atmosphérique majeur, issu principalement de l'auto-oxydation du NO dans l'air. Ce gaz est très diffusible au sein de membranes artificielles et présente un fort pouvoir réactionnel également. Par conséquent ce travail c'est principalement intéressé à étudier l'impact du NO₂, à forte concentration (45ppm) sur la membrane d'un isolat aéroporté de *P. fluorescens*, MFAF76a, ainsi que les potentielles répercussions physiologiques.

IMPACT OF GASEOUS NO₂ ON *P. FLUORESCENS* STRAIN IN THE MEMBRANE ADAPTATION AND VIRULENCE

SÉGOLÈNE DEPAYRAS¹, TATIANA KONDAKOVA², NADINE MERLET-MACHOUR³, HERMANN J. HEIPIEPER⁴, MAGALIE BARREAU¹, CHLOÉ CATOVIC¹, MARC FEUILLOLEY¹, NICOLE ORANGE¹ & CÉCILE DUCLAIR-POC¹

¹Laboratory of Microbiology Signals and Microenvironment, LMSM EA 4312, University of Rouen, France

²Cronan Lab, Department of Microbiology, University of Illinois, Urbana

³Laboratory of Organic and analytical chemistry, COBRA UMR 6014, Team 1, University of Rouen, France

⁴Microbial Processes Group, Department Environmental Biotechnology, UFZ Helmholtz Centre for Environmental Research, Germany

ABSTRACT

Nowadays air pollution is increasing due to anthropogenic activity. Among all air pollutants, nitrogen oxides (NO_x) such as NO₂ are predominant. It is well known that those compounds exhibit direct toxic effects on human health. However, microorganisms are also exposed to them, but the effect of NO_x on the virulence of air microbiota is still poorly understood. In this study, we evaluated the impact of NO₂ on the adaptability and virulence of an airborne strain of *P. fluorescens*, MFA76a, by exposition of this strain to 45 ppm of NO₂. The growth kinetics and cultivability were analysed. A decrease of cultivability coupled with an increase of the lag phase was observed suggesting a potential toxicity of NO₂. Since NO_x particularly target lipids, the membrane permeability was assessed thanks to Live Dead tests and confocal microscopy. A significant alteration of membrane permeability was observed. Furthermore, more abundant bacterial aggregates were detected compared to the control. Thus, a lipidomic study was performed using MALDI-TOF MS Imaging coupled to HPTLC. Interestingly, bacteria exposed to NO₂ were lacking one putative glycerophospholipid molecule. In agreement with a previous study from Kondakova et al., these data demonstrate the adaptation potential of *P. fluorescens* MFA76a to an air pollutant such as NO₂.

Keywords: air pollution, antibiotic resistance, membrane, adaptation, *P. fluorescens*, toxicity.

1 INTRODUCTION

Air is a complex environment contaminated by particle matter, nitrogen oxides, ozone and hydrocarbons. It is also a biotic environment since microorganisms, mostly bacteria, are found [1]. Even if this environment is unstable, several studies highlight the presence of members of *Pseudomonas* strain in air microbiota [2, 3]. During the past decades, due to the increase of anthropogenic activities, the level of atmospheric pollutants is rising and the control of air quality remains a topic of major interest [4, 5]. Among all air pollutants, nitrogen oxides species, including nitrogen oxide (NO) and nitrogen dioxide (NO₂), are predominant [4]. It is well known that these compounds are toxic to human health, leading to cardiovascular and respiratory pathologies (allergy, asthma, bronchitis) [4, 5]. Thus, threshold values were set up by World Health Organization (WHO) to prevent the potential risks on human health. Regarding the increase of respiratory pathologies, a potential impact of NO₂ could be presumed on air microbiota. NO₂ induces cells damages, directly by interacting with proteins, DNA and lipids or either via formation of reactive nitrogen species interfering with metabolism, respiration functions and thus homeostasis [6–8]. Bacterial stress is generally leading to the expression of virulence factors; thus, NO₂ may have an impact on bacterial virulence, which could consequently alter human health. Infection by opportunistic pathogens represents a big threat for immune-compromised or cystic fibrosis patients as they are more sensitive. Indeed, this pathogens could alter the healthy microbiota and its homeostasis [9–11].

© 2018 WIT Press, www.witpress.com

ISSN: 2398-2640 (paper format), ISSN: 2398-2659 (online), <http://www.witpress.com/journals>

DOI: 10.2495/EI-V1-N2-183-192

This dysbiosis and the pathogen itself could lead to an acute infection with potential lethal outcome [10]. Breathing NO₂-polluted air could potentiate this mechanism. Since *P. fluorescens* are widespread in the environment [12], including in the air [13], and had already been isolated from sputum of patients suffering from pneumonia, it seems particularly interesting to focus on this species [14]. An airborne strain *P. fluorescens* MFAF76a was previously isolated and characterized with virulent traits [13, 14]. Thus, MFAF76a seems to be the perfect candidate to test the bacterial response to NO₂ stress. Its membrane adaptability and virulence response to NO₂ contamination remain to be resolved. Therefore, several approaches were implemented in this study such as physiological tests and lipidomic analysis.

2 MATERIAL AND METHOD

2.1 Bacterial strain and growth condition

In this study, the wild-type *P. fluorescens* MFAF76a strain was used [13]. Overnight cultures in Luria Bertani medium (LB, AES) were grown at 28°C under limited agitation (180 rpm). Then cultures were diluted ($A_{580} = 0.08$) in Davis Medium Broth (DMB), a minimal medium with 2.16 g/L glucose as carbon source. The incubation was done at 28°C under agitation for 16 h to reach the stationary phase. Bacterial cultures were transferred on cellulose nitrate membrane filters (0.45 µm, pore size 0.2 µm, diameter 47 mm, Sartorius Biolab Products) and incubated on DMB agar plates at 28°C for 4 h to obtain a monolayer of bacteria. Then the membranes covered by bacteria were laid on agar one-well dishes (size 127.8 × 85.5 mm, Thermo Scientific Nunc), which were directly transferred into the gas delivery device [15].

2.2 Exposition to nitrogen dioxide

As previously described by Kondakova et al., an exposure system was developed in order to mimic the environmental exposition [15]. Briefly bacterial bed was exposed during 2 h at 28°C with a constant gas stream of 2 L/min, in two separate exposure chambers. A control was obtained using synthetic air. The NO₂-exposed bacteria were laid in contact with a mixture of N₂/O₂ 8/2 (v/v) complemented with 45 ppm of NO₂ (Air Liquide GMP Europe). After exposure, bacteria were resuspended in sterile saline solution.

2.3 Cultivability and growth kinetics

Cultivability tests were performed by serial dilution in saline solution from the bacterial suspension to reach dilution of 10⁻⁷. 100 µL of dilution range 10⁻⁴ to 10⁻⁷ were spotted onto LB agar plates in triplicate for both conditions. After incubation at 28°C for 24 h, viable colony forming unit were enumerated.

After adjustment of the bacterial concentration to $A_{580} = 0.08$ in DMB, growth kinetics were done for both conditions in triplicate in a 96-well test plate (Nunc™). The bacterial population was evaluated every 15 min by turbidimetry at A_{580} during 24 h.

2.4 Lipid identification

2.4.1 Phospholipids

As previously described by Kondakova et al. [16], the lipids were extracted from lyophilized bacteria according to the method of Bligh and Dyer [17]. Then phospholipids (PLs) were first separated by HPTLC [18]. Retention factors (R_f) were calculated using the Sweday JustTLC

software (v. 4.0.3) after visualizing spots at 365 nm thanks to staining with primuline dye spray. A DHB matrix, allowing the positive ion spectra of lipids, was selected [16]. MALDI TOF mass spectra were acquired using an Autoflex III (Bruker Daltonics) and all MS spectra were obtained in reflector positive ion mode using TLC MALDI software (v. 1.1.7.0). Post-Source Decay spectra were acquired as previously described using FlexControl software (Bruker Daltonics) for each spot related to one specific lipid [16]. Lipids were identified using the LIPID MAPS database. Thanks to previous results, the MS Imaging of lipid spots was obtained using the FlexImaging software (v. 2.1.; Bruker Daltonics). According to the m/z, individual lipidic spots were labelled by a specific colour code.

2.4.2 Fatty acids

The fatty acids (FAs) methyl esters (FAME) were obtained by incubation for 15 min at 95°C in a boron trifluoride (BF₃, 140 g/L) in methanol and extracted by hexane [19]. They were separated and analysed by gas chromatography (GC) coupled to flame ionization detection using an Agilent Technology, 6890 Network GC System. The apparatus was equipped with a CP-Sil 88 capillary column (Chrompack; length, 50 m; inner diameter, 0.25 mm; 0.25 mm film). All experiments were performed in triplicate. The degree of FAs saturation was determined as the ratio between the saturated FAs and the unsaturated FAs [20].

2.5 Microbial adhesion to solvent

The hydrophobicity of *P. fluorescens* MFAF76a strain was evaluated by the microbial adhesion to solvent (MATS) test [21]. It consisted of assessing the affinity of the cells to two solvent duos composed of a monopolar solvent and an apolar solvent. In each set, both solvents have similar surface tension, but the monopolar one was acidic (electron accepting, e.g. chloroform) or basic (electron donor, e.g. ethyl acetate). The apolar solvents were hexadecane and decane, respectively. For the experiments, bacterial cells were resuspended in saline solution to A₄₀₀ = 0.8 (Abs₁). This bacterial suspension was mixed with each solvent at 1/6 (v/v) by vigorous agitation for 1 min to form an emulsion. After at least 15 min of delay, the separation of the two phases of the mixture occurred. The aqueous phase absorbance (Abs₂) was measured and the percentage of adhesion was expressed as in eqn (1):

$$\% \text{ affinity} = 1 - \frac{\text{Abs}_1}{\text{Abs}_2} \times 100 \quad (1)$$

2.6 Membrane permeability assays

After exposure, 1 mL of bacterial suspension was stained for 15 min with SYTO9 (5.01 nM) and propidium iodide (PI, 30 nM) from the Live/Dead BacLight kit (L-7012, Thermofisher). Prolong diamond (P36965, Thermofisher) was added as anti-fading agent before observation using a confocal laser scanning microscope (CLSM 710, ZEISS). Thence, with an immersion objective × 63, damaged and total bacteria were respectively observed as PI and SYTO9 positive.

2.7 Statistical analysis

All experiments were carried out at least three times. Significances of differences between mean values were assessed using the Mann-Whitney test with significance set at p<0.05 (*), <0.01 (**), and <0.001 (***)

3 RESULTS AND DISCUSSION

To investigate the response of air microbiota on the NO_2 air pollutant, the bacterial strain *P. fluorescens* MFAF76a was exposed to 45 ppm of NO_2 for 2 h. After exposure, several physiological tests including cultivability and growth kinetics, as well as membrane permeability and lipidomic studies were done. The results were compared with those of a control samples, coming from the same bacterial culture exposed similarly to synthetic air. In NO_2 -treated bacteria, a decrease of one log in cultivability of *P. fluorescens* MFAF76a strain was observed (Fig. 1a). Moreover, the exposure promoted an increase of half an hour of the lag phase compared with the control and no significant variation of generation time (Fig. 1b). Altogether these results suggested a diminution of the culturable bacterial density after exposure. The A_{580} do not reflect the culturable bacterial concentration. Two hypotheses could be proposed to explain such a phenomenon. The exposure to NO_2 seems to enhance the apparition of viable but non-culturable bacteria and/or the bacterial death. Moreover the treatment to NO_2 could also impact the bacterial physiology since they need to detoxify this compound first. Thence all those factors could promote the delay previously discussed. However, the generation time was not significantly impacted. This data suggest no great alteration in metabolic pathway implicated in cell division. An exposure at 45 ppm of NO_2 clearly impacts the physiological behaviour of *P. fluorescens* MFAF76a strain.

Since the membrane is the first barrier protecting bacteria from their environment, a macroscopic study by MATS technique was realized to assess the surface polarity and thence potential membrane alteration of exposed bacteria. The bacterial affinity to chloroform and hexadecane indicated no significant change in Lewis base character after exposure to NO_2 (Fig. 2). This parameter is related to the presence of lone pair usually found in unsaturations or around heteroatoms such as constituting proteins or polar head of glycerophospholipids. As no drastic modification in hydrophobicity was observed, the proteins should not be implicated. However, a decrease in acidity of Lewis (affinity relative to decane and ethyl acetate) from bacteria exposed to NO_2 was noticed and could suggest fewer electron pair acceptors

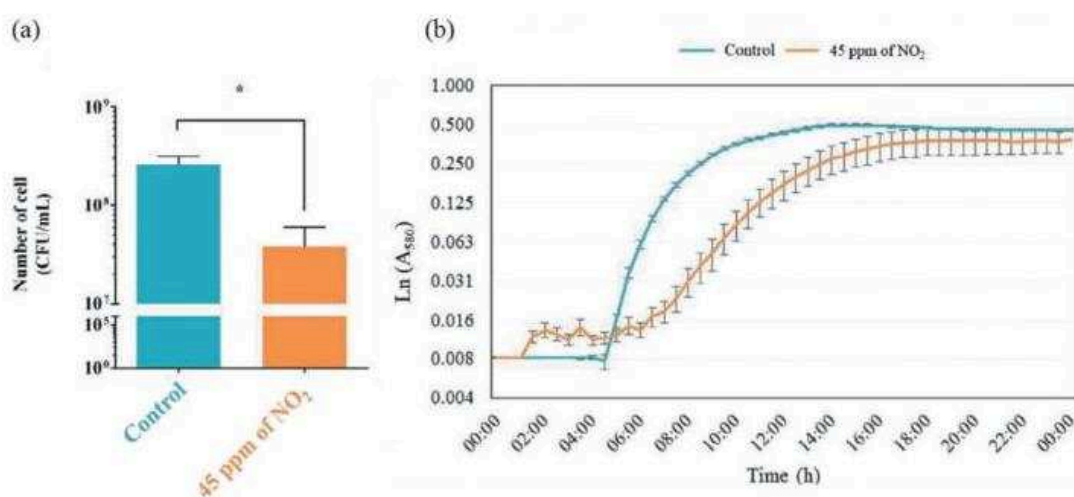


Figure 1: Physiological response of *P. fluorescens* MFAF76a strain after two hours' exposure at 45 ppm of NO_2 . (a) Bacterial cultivability. (b) Bacterial growth kinetics in DMB, a minimal medium. For each exposure condition, three independent experiments were done in three replicates.

NO ₂ concentration (ppm)	MATS : solvent affinity (%)			
	Chloroform	Hexadecane	Decane	Ethyl acetate
0	62 ± 10	10 ± 8	4 ± 3	24 ± 10
45	41 ± 10	0 ± 6	4 ± 4	1 ± 1

Figure 2: Microbial adhesion to solvent tests of *P. fluorescens* MFAF76a strain after exposed or not to NO₂. For each exposure condition, three independent experiments were done in three replicates.

outwards the membrane. These alterations reveal slight changes within the bacterial membrane, which could be limited in composition, but more surely in structure. A combination of both may also be possible. For instance, alkyl chains may swivel outwards burying electron pair acceptors inside membrane.

To better understand the nature of that membrane alteration, lipids extraction and identification using HPTLC-MALDI TOF MS were performed after exposure (Fig. 3). Indeed phosphatidylglycerol (PG), phosphatidylethanolamin (PE) and phosphatidylcholin (PC) were found in both extracts (Figs 3a and 3b). Those results are coherent with previous data [16]. Interestingly, a putative glycerophospholipid named 'unknown glycerophospholipid' (UGP) was identified in this study. This putative PL was only observed in control bacteria exposed to synthetic air and was absent in NO₂-treated cells, indicating its probable sensitivity to NO₂ and/or membrane

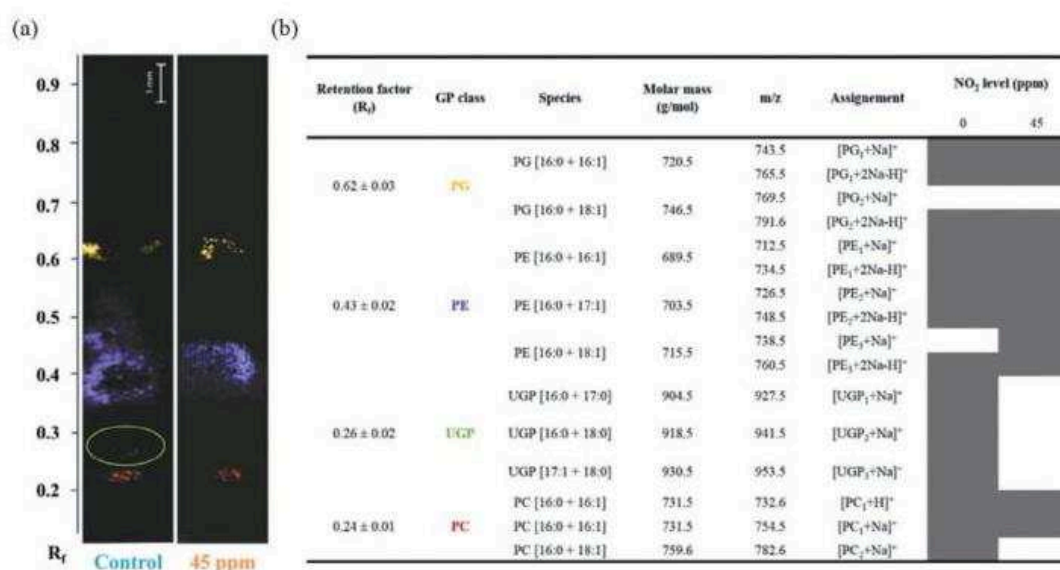


Figure 3: Lipidome of *P. fluorescens* MFAF76a strain after exposure or not to NO₂. (a) HPTLC MALDI-TOF MS Image of their glycerophospholipids. (b) List of glycerophospholipids identified. PG: Phosphatidylglycerol (yellow spot); PE: Phosphatidylethanolamin (purple spot), UGP: Unknown glycerophospholipid (green spot, circle in green), PC: Phosphatidylcholin (red spot), R_f: Retention factor. For each exposure condition, three independent experiments were done in three replicates.

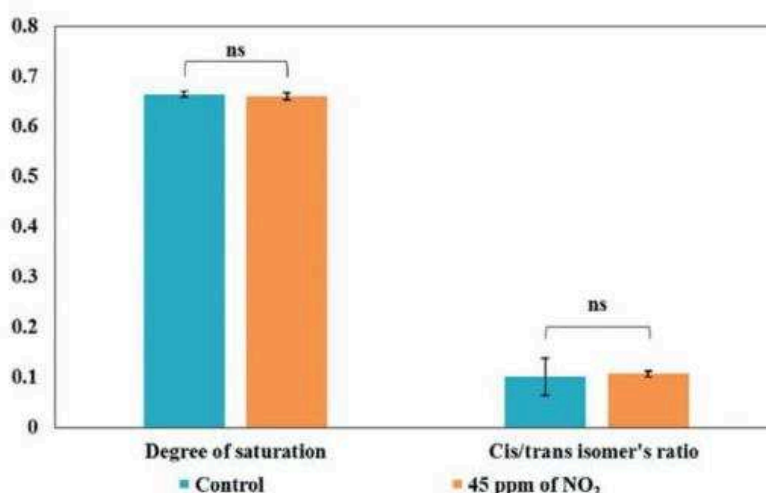


Figure 4: Fatty acid methyl esterification of *P. fluorescens* MFAF76a strain after exposition to NO₂ or synthetic air (control). For each exposure condition, three independent experiments were done in three replicates; ns: not significant.

adaptation of MFAF76A to this stress, by exclusion of this PL from the cell wall. We noted that the long FA chains of this UGP (C₁₆, C₁₇ and C₁₈) were mostly saturated. Such saturated lipids favour the membrane fluidity. Thence the absence of UGP in exposed bacteria is suggesting a decrease of membrane fluidity. However, after FAME analysis, no significant alteration in the degree of FA saturation and cis/trans isomers ratio was detected (Fig. 4). We hypothesized that bacteria, in response to the lack of UGP after exposure to NO₂, reorganizes the membrane to compensate this loss, suggesting a potential membrane adaptation to NO₂ stress.

In order to investigate potential changes of membrane permeability, Live Dead tests using SYTO9 (green) and IP (red) labels were performed and analysed using CLSM. Interestingly, the red labelling was predominant after exposure to NO₂ unlike the control (Fig. 5). IP dye entered largely in bacterial cells revealing membrane permeabilization. NO₂ alters polyunsaturated lipids through production of nitro alkyl radicals in eukaryotic cells but no literature deals on NO₂ effect on bacterial lipids [8].

An increase of cell aggregation was also observed and it is interesting to note that deletion of the main outer membrane porin OprF, which induces a parietal stress, is known to promote a similar effect in *P. aeruginosa* H103 [21]. Then the bacterial 'community behaviour' was investigated through biofilm formation using CLSM and a CFP-labelled *P. fluorescens* MFAF76a strain. Exposed bacteria form a thicker biofilm with some heterogeneities certainly due to the presence of bacterial amasses unlike the control [15]. This phenomenon was also observed with the *oprF* mutant in *P. aeruginosa* H103 [22]. Thus, the exposure to NO₂ may lead to membrane modification causing a parietal stress to *P. fluorescens* MFAF76a. Subsequently, the aggregation of the bacterial cells could promote the biofilm formation and so the bacterial survival.

Biofilms represent a threat in clinic, as their elimination is more and more challenging. Interestingly, a previous study evaluated the impact of NO₂ on antibiotic resistance using ciprofloxacin and chloramphenicol [15]. Such antibiotics are usually prescribed respectively for treatment of first and last stage of cystic fibrosis to eradicate *Pseudomonas* infection [23]. For the NO₂-treated bacteria a two-fold increase in MICs of both antibiotics was noted, indicating that in response to NO₂, *P. fluorescens* exhibits an increase in resistance against

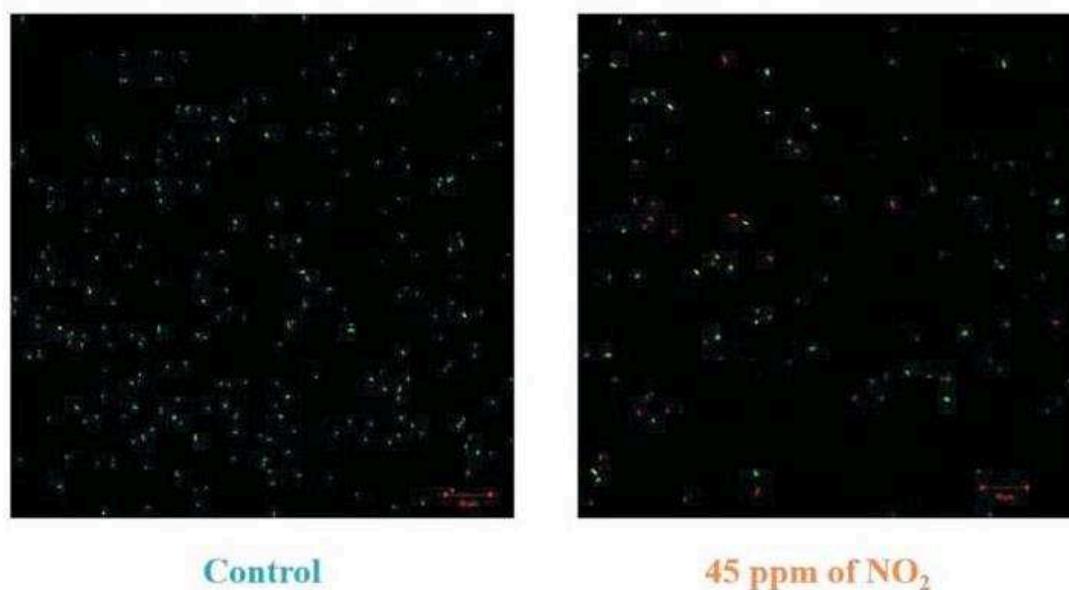


Figure 5: Membrane permeability using Live Dead test and CLSM. Green and red labels signify penetration in bacteria of SYTO9 and Propidium Iodide, respectively. For each exposure condition, three independent experiments were done in three replicates.

chloramphenicol and ciprofloxacin [15]. Surprisingly, a sub-inhibitory concentration of chloramphenicol (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) significantly increased the bacterial growth between 2 and 10 h of culture compared to the control. Thence a protective effect of NO_2 is conserved for 10 h after exposure. On the contrary, the growth kinetics of the exposed strain was unchanged in presence of a sub-inhibitory concentration of ciprofloxacin (3.125 $\mu\text{g}/\text{mL}$) [15]. Various stresses can lead to the modulation of bacterial resistance to antibiotics [24, 25]. Astonishingly, new therapeutic strategies are focusing nowadays on the use of gaseous nitrogen oxide as a pre-treatment to decrease the antibiotic resistance encountered in cystic fibrosis patients [26].

In correlation with previous data, a transcriptomic study on genes encoding efflux pump *mexEF-oprN* revealed a significant increase in the expression for those genes [15]. Indeed, in comparison to the controls, the expression of *mexE*, *mexF* and *oprN* genes reached almost 14-, 3.5- and 4.6-fold, respectively. These results are consistent with the antibiotic tests realized previously since the MexEF-OprN efflux pump is involved in the resistance against fluoroquinolones (such as ciprofloxacin). Moreover chloramphenicol, a nitroaromatic antimicrobial, is also a substrate for MexEF-OprN [27, 28].

As this efflux pump is a macromolecular complex enched into the plasma membrane, MexEF-OprN could replace UGP to preserve the membrane integrity. Moreover, this efflux pump implements the entry of proton (H^+), which may alter the membrane potential. Indeed H^+ could be accumulated and, consequently, increase the positive charges within cells. Thence the alteration of the potential equilibrium may favour the increase of membrane potential. Thus, the bacterial physiology may be disturbed causing dysfunction of membrane proteins operating through this membrane potential. Indeed a decrease in membrane potential was linked with the susceptibility of *P. aeruginosa* to aminoglycosides antibiotics such as tobramycin [29]. Moreover, this H^+ gradient could lead to a reorganization of PLs, such as a swivelling of alkyl chains outwards, which could justify the Lewis base alteration.

4 CONCLUSION

The present study provides further information concerning the adaptation of an airborne strain of *P. fluorescens* strain, with opportunistic pathogen potential behaviour, to an air pollutant such as NO₂. The bacterial stress caused by this preoccupant air pollutant induces modifications in membrane permeability certainly because of chemical and/or structural variations of cell wall constituents. Thus physiological parameters such as cultivability and growth are negatively impacted. However, the ability of the bacterium to form biofilm increases, certainly favoured by the observed bacterial amasses promoted by the parietal stress. Unfortunately, resistance to fluoroquinolone and phenicol antibiotics increases after exposure to NO₂. Those latter parameters are quiet worrying since they are implicated in bacterial virulence. However, 45 ppm of NO₂ is considered as a high concentration leading to irreversible effects on human health and does not totally reflect usual environmental concentrations measured in chronic pollution rates [29]. The next step of this project will be to focus on a lower concentration of NO₂ close to the threshold alert value [30]. Nevertheless, NO₂ has clearly a drastic impact on the physiology of *P. fluorescens* MFAF76a and these results support the hypothesis that air pollutants could promote the pathogenicity of airborne bacteria.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by a PhD grant from the GRR SESA (Région Normandie) and was financially supported by the European Union (FEDER), Région Normandie and Évreux Porte de Normandie (France).

REFERENCES

- [1] DeLeon-Rodriguez, N., Lathem, T.L., Rodriguez-R. L.M., Barazesh, J.M., Anderson, B.E. et al., Microbiome of the upper troposphere: species composition and prevalence, effects of tropical storms, and atmospheric implications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **110**(7), pp. 2575–2580, 2013. DOI: 10.1038/ismej.2011.11.
- [2] Dybwad, M., Granum, P. E., Bruheim, P. & Blatny, J. M., Characterization of airborne bacteria at an underground subway station. *Applied and Environmental Microbiology*, **78**(6), pp. 1917–1929, 2012. DOI: 10.1128/AEM.07212-11.
- [3] Šantl-Temkiv, T., Sahyoun, M., Finster, K., Hartmann, S., Augustin-Bauditz, S. et al., Characterization of airborne ice-nucleation-active bacteria and bacterial fragments. *Atmospheric Environment*, **109**, 105–117, 2015. DOI: 10.1016/j.atmosenv.2015.02.060.
- [4] World Health Organization (WHO) guidelines for indoor air quality: selected pollutants (2010) Europe, http://www.euro.who.int/_data/assets/pdf_file/0009/128169/e94535.pdf (accessed 10 April 2017).
- [5] Air quality in Europe — 2015 report, European Environment Agency, <http://www.eea.europa.eu/publications/air-quality-in-europe-2015#tab-data-references> (accessed 30 November 2015).
- [6] Burney, S., Caulfield, J.L., Niles, J.C., Wishnok, J.S., Tannenbaum, S.R., The chemistry of DNA damage from nitric oxide and peroxyoxynitrite. *Mutation Research*, **424**(1–2), pp. 37–49, 1999. DOI: 10.1016/S0027-5107(99)00006-8.
- [7] Radi, R., Nitric oxide, oxidants, and protein tyrosine nitration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS)*, **101**(12), pp. 4003–4008, 2004. DOI: 10.1038/84859.
- [8] Augusto, O., Bonini, M.G., Amanso, A.M., Linares, E., Santosn, C.C.X. et al., Nitrogen dioxide and carbonate radical anion: Two emerging radicals in biology. *Free Radical Biology & Medicine*, **32**(9), pp. 841–859, 2002. DOI: 10.1016/S0891-5849(02)00786-4.
- [9] Harrison, F., Microbial ecology of the cystic fibrosis lung. *Microbiology*, **153**(Pt 4), pp. 917–923, 2007. DOI: 10.1099/mic.0.2006/004077-0.
- [10] Cullen, L. & McClean, S., Bacterial adaptation during chronic respiratory infections. *Pathogens*, **4**(1), pp. 66–89, 2015. DOI: 10.1074/jbc.R110.199703.
- [11] Cribbs, S.K. & Beck, J.M., Microbiome in the pathogenesis of cystic fibrosis and lung transplant-related disease. *Translational Research*, **179**, pp. 84–96, 2017. DOI: 10.1016/j.trsl.2016.07.022.
- [12] Bodilis, J., Calbrix, R., Guérillon, J., Mérieau, A., Pawlak, B. et al., Phylogenetic relationships between environmental and clinical isolates of *Pseudomonas fluorescens* and related species deduced from 16S rRNA gene and OprF protein sequences. *Systematic and Applied Microbiology*, **27**(1), pp. 93–108, 2004. DOI: 10.1078/0723-2020-00253.
- [13] Duclairoir Poc, C., Verdon, J., Groboillot, A., Barreau, M., Toucourou, H. et al., Airborne fluorescent pseudomonads : What

- potential for virulence? *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, **3**(8), pp. 708–722, 2014.
- [14] Rossignol, G., Merieau, A., Guerillon, J., Veron, W., Lesouhaitier, O. et al., Involvement of a phospholipase C in the hemolytic activity of a clinical strain of *Pseudomonas fluorescens*. *BMC Microbiology*, **8**, pp. 189, 2008. DOI: 10.1186/1471-2180-8-189.
- [15] Kondakova, T., Catovic, C., Barreau, M., Nusser, M., Brenner-Weiss, G. et al., Response to gaseous NO₂ air pollutant of *P. fluorescens* airborne strain MFAF76a and clinical strain MFN1032. *Frontiers in Microbiology*, **7**, pp. 379, 2016. DOI: 10.1186/14712180-13-92.
- [16] Kondakova, T., Merlet-Machour, N., Chapelle, M., Preterre, D., Dionnet, F. et al., A new study of the bacterial lipidome: HPTLC-MALDI-TOF imaging enlightening the presence of phosphatidylcholine in airborne *Pseudomonas fluorescens* MFAF76a. *Research in Microbiology*, **166**(1), pp. 1–8, 2015. DOI: 10.1016/j.resmic.2014.11.003.
- [17] Bligh, E.G. & Dyer, W.J., A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, **37**(8), pp. 911–917, 1959. DOI: 10.1139/o59-099.
- [18] Fuchs, B., Schiller, J., Süß, R., Schürenberg, M., Suckau, D., A direct and simple method of coupling matrix-assisted laser desorption and ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) to thin-layer chromatography (TLC) for the analysis of phospholipids from egg yolk. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **389**(3), pp. 827–834, 2007. DOI: 10.1007/s00216-007-1488-4.
- [19] Morrison, W. & Smith, L., Preparation of fatty acid methyl esters and dimethylacetals from lipids with boron fluoride-methanol. *Journal of Lipid Research*, **5**, pp. 600–608, 1954.
- [20] Heipieper, H.J., Meulenbeld, G., van Oirschot, Q. & de Bont, J., Effect of environmental factors on the trans/cis ratio of unsaturated fatty acids in *Pseudomonas putida* S12. *Applied and Environmental Microbiology*, **62**(8), pp. 2773–2777, 1996.
- [21] Bellon-Fontaine, M.-N., Rault, J., van Oss, C.J., Microbial adhesion to solvents: a novel method to determine the electron-donor/electron-acceptor or Lewis acid-base properties of microbial cells. *Colloids Surfaces B: Biointerfaces*, **7**(1–2), pp. 47–53, 1996. DOI: 10.1016/0927-7765(96)01272-6.
- [22] Bouffartigues, E., Moscoso, J.A., Duchesne, R., Rosay, T., Fito-Boncompagni, L. et al., The absence of the *Pseudomonas aeruginosa* OprF protein leads to increased biofilm formation through variation in c-di-GMP level. *Frontiers in Microbiology*, **6**, pp. 630, 2015. DOI: 10.3389/fmicb.2015.00630.
- [23] Banerjee, D. & Stableforth, D., The treatment of respiratory *pseudomonas* infection in cystic fibrosis: what drug and which way? *Drugs*, **60**(5), pp. 1053–1064, 2000. DOI: 10.2165/00003495-200060050-00006.
- [24] Poole, K., Stress responses as determinants of antimicrobial resistance in Gram-negative bacteria. *Trends in Microbiology*, **20**(5), pp. 227–234, 2012. DOI: 10.1016/j.tim.2012.02.004.
- [25] Poole, K., Stress responses as determinants of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: multidrug efflux and more. *Canadian Journal of Microbiology*, **60**(12), pp. 783–791, 2014. DOI: 10.1139/cjm-2014-0666.
- [26] Deppisch, C., Herrmann, G., Graepler-Mainka, U., Wirtz, H., Heyder, S. et al., Gaseous nitric oxide to treat antibiotic resistant bacterial and fungal lung infections in patients with cystic fibrosis: a phase I clinical study. *Infection*, **44**(4), pp. 513–520, 2016. DOI: 10.1371/journal.pone.0011044.
- [27] Köhler, T., Michéa-Hamzehpour, M., Henze, U., Gotoh, N., Curty, L.K. et al., Characterization of MexE-MexF-OprN, a positively regulated multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular Microbiology*, **23**(2), pp. 345–354, 1997.
- [28] Sobel, M.L., Neshat, S., Poole, K., Mutations in PA2491 (mexS) promote MexT-dependent mexEF-oprN expression and multidrug resistance in a clinical strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, **187**(4), pp. 1246–1253, 2005. DOI: 10.1128/JB.187.4.1246-1253.2005.
- [29] Pan, X., Dong, Y., Fan, Z., Liu, C., Xia, B. et al., In vivo host environment alters *Pseudomonas aeruginosa* susceptibility to aminoglycoside antibiotics. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, **7**, pp. 83, 2017. DOI: 10.1128/AAC.46.6.2035-2037.2002.
- [30] Dioxyde d'azote: Données toxicologiques et environnementales, INERIS, 2011, <http://www.ineris.fr/substances/fr/substance/cas/10102-44-0/2> (accessed 2 March 2010).

1.2. Conclusions générales et perspectives

À l'issue de ce travail, quatre bio-marqueurs de l'impact du NO₂ sur *P. fluorescens* MFAF76a ont été déterminés : (i) la cultivabilité, (ii) la croissance bactérienne, (iii) la perméabilisation membranaire, (iv) les modifications du contenu en glycérophospholipides.

En effet, une exposition à 45ppm de NO₂ a permis d'observer une diminution significative de la croissance bactérienne couplée à une augmentation du temps de latence dans la croissance bactérienne. Deux hypothèses ont été soulevées par ces résultats : le NO₂ pourrait avoir un effet **bactériocide ou bactériostatique** *i.e.* engendrant l'apparition de bactéries viables non cultivables (VBNC) dont le métabolisme est faiblement actif. Un grand nombre d'études ont souligné l'effet bactériostatique du NO sur les bactéries notamment en raison de leur impact sur la synthèse d'acides aminés ramifiés, le métabolisme énergétique et l'induction de voie de réparation SOS connue pour l'arrêt de la division cellulaire. Ainsi l'hypothèse formulée sur l'effet bactériostatique du NO₂ semble être la plus cohérente et est actuellement en cours d'étude.

Enfin l'enveloppe bactérienne de *P. fluorescens* MFAF76a n'est pas insensible à la diffusion du NO₂ comme cela peut être illustré par l'augmentation de la **perméabilisation membranaire**, la formation d'agrégats bactériens et le contenu lipidique altéré via la **disparition d'un glycérophospholipide inconnu minoritaire** (UGP). Actuellement l'UGP est en cours de caractérisation. Une étude *in silico* des gènes impliqués dans le métabolisme des glycérophospholipides chez *P. fluorescens* MFAF76a a permis de déterminer, dans un premier temps, les étapes de synthèse des divers GPs identifiés chez *P. fluorescens*.

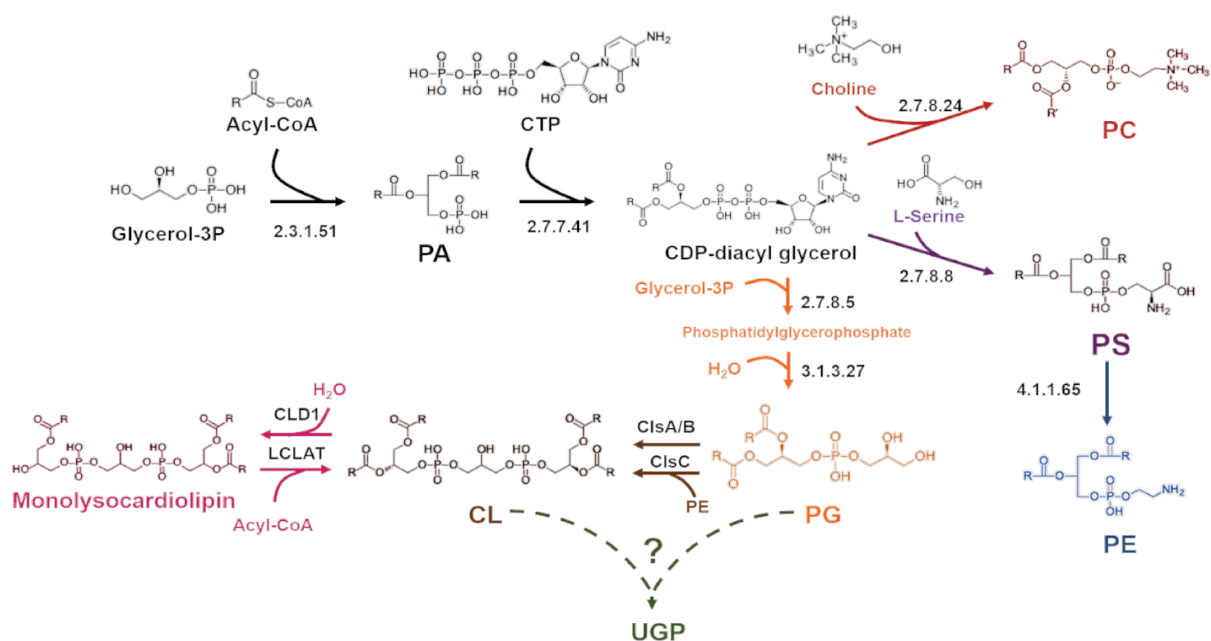


Figure 32 : Etude prédictive du métabolisme de glycérophospholipides chez *P. fluorescens* MFAF76a (en cours de valorisation).

PA : phosphatidyl ; PC : phosphatidylcholine, PS : phosphatidylsérine ; PE : phosphatidyléthanolamine ; PG : phosphatidylglycérol ; CL : cardiolipine ; Glycérol-3P : glycérol-3 phosphate ; UGP : « *Unknown Glycerophospholipid* »

Ainsi, ces informations couplées aux analyses par spectrométrie de masse (UGP = 905 m/z) a conduit à émettre l'hypothèse que l'UGP pourrait être un hybride de cardiolipine avec seulement 3 chaînes d'acides gras au lieu des 4 habituelles comme représenté ci-dessous (**Figure 33**).

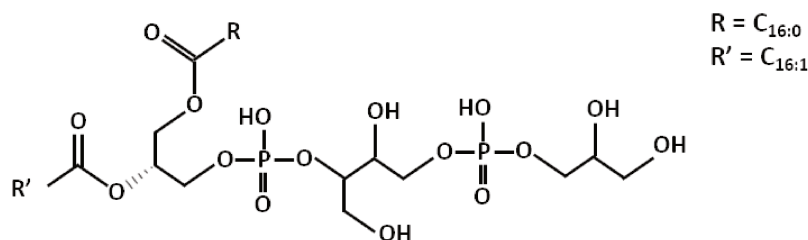


Figure 33 : Structure hypothétique de l'UGP (« *Unknown Glycerophospholipid* »).

Cette structure est encore à confirmer malgré que cet hybride corresponde à une m/z de 905 *in silico*.

Enfin, et contrairement à l'eucaryote, le NO₂ n'a **pas d'impact sur les chaînes d'acides gras**. Cela est justifiable par l'absence de chaînes polyinsaturées (uniquement C16 0 :1 et C18 0 :1). En effet, la présence de plusieurs insaturations favorise la réactivité des composés nitrosants sur les chaînes d'acides gras.

2. Article 2: The modulation of antibiotic resistance as a consequence of NO₂ induced membrane permeability in *P. fluorescens*?

S. Depayras *et al.*, en cours de soumission dans *Frontiers in microbiology*

Contributions : J'ai conçu, réalisé et écrit ce travail avec le Dr Duclairoir-Poc. M. Chautrand a participé à l'étude de l'expression de gènes cibles et à l'écriture de l'article. Mme Souak a participé à l'étude de la perméabilité membranaire par cytométrie en flux. Le Dr Merieau et Mme Bouteiller ont participé à l'élaboration du mutant MFAF76a Δ *oprN*. L'ensemble des auteurs ont contribué à la relecture critique de cet article.

2.1. Contexte d'étude

L'enveloppe bactérienne n'est pas inerte face à une exposition au NO₂. Comme pour l'ensemble des bactéries à Gram négatif, cette enveloppe est décomposée en trois grandes structures :

- une membrane externe composée d'une bicouche asymétrique de **phospholipides** présentant dans sa partie externe de nombreuses protéines, dont la porine majoritaire **OprF**, ainsi que des acteurs de la virulence tels que le lipopolysaccharide (**LPS**).
- un espace périplasmique constitué d'un réseau de **peptidoglycane** et de protéines solubles telles que des chaperonnes.
- une membrane interne composée d'une bicouche symétrique de phospholipides, et de nombreuses **protéines** associées à la membrane (transmembranaires, ou ancrées à cette membrane). Ainsi, certaines macrostructures telles que les systèmes de sécrétions et les **pompes à efflux** tripartites RND traversent cette structure.

Cette architecture complexe est vitale pour la physiologie bactérienne. Néanmoins en cas de **stress d'enveloppe**, de nombreux facteurs de signalisation tels que SigX et AlgU sont déclenchés et activent des voies de réponse à ce stress pouvant conduire à des **phénotypes virulents** (*e.g.* biofilm, antibiorésistance) (**Figure 34**).

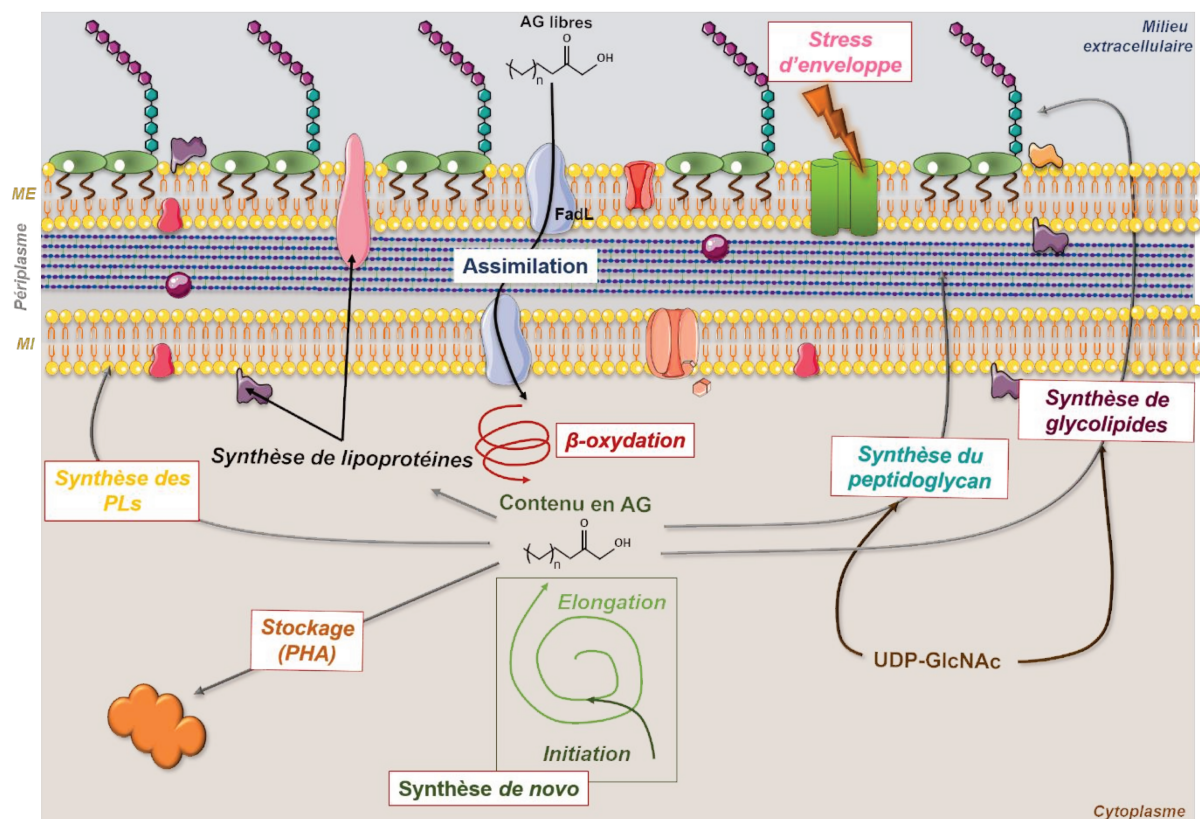


Figure 34 : Représentation des potentielles cibles du stress nitrosant au sein de l'enveloppe de *P. fluorescens* MFAF76a.

Les encadrés rouges représentent les voies métaboliques potentiellement altérées par le NO₂. AG : acides gras ; PLs : phospholipides ; PHA : polyhydroxyalkanoates ; UDP-GlcNAc : Uridine diphosphate N-acétylglucosamine ; ME : membrane externe, MI : membrane interne.

À la suite de l'exposition au NO₂, *P. fluorescens* présente une augmentation de la perméabilité membranaire pouvant conduire à un stress d'enveloppe. Cet article s'est donc intéressé à déterminer les structures membranaires altérées par le NO₂, les mécanismes associés à la réponse au stress d'enveloppe et le lien intrigant avec l'antibiorésistance médiée par la pompe à efflux RND, MexEF-OprN, grâce à un mutant de délétion MFAF76a- Δ *oprN* et de son complémenté.

The modulation of antibiotic resistance as a consequence of NO₂ induced membrane permeability in *P. fluorescens*?

S. Depayras¹ *et al.*

¹ Laboratory of Microbiology Signals and Microenvironment, LMSM EA 4312, University of Rouen Normandy, France

Abstract

Porins and efflux pumps from the Resistance Nodulation cell-Division (RND) family play an important role in various stress response. First they were identified for their main role in antibiotic resistance. However, these transmembrane proteins take part into a wide range of physiological functions (*e.g.* membrane structure, sensor system, osmotic pressure and signalization). Considerable work have been done on the nitric oxide (NO), and more recently nitrogen dioxide (NO₂), modulation of the antibiotic susceptibility of various antibiotic resistant strains. Moreover an intriguing link was pointed between nitrosative stress and the efflux pump MexEF-OprN. Herein we report important modulations in the bacterial envelope structure (*e.g.* LPS, peptidoglycan, and fatty acids) after a bacterial exposure to 45ppm of NO₂ through a membrane permeabilization thanks to “omic” tools. These alterations could lead to an envelope stress. Here, two main factors contributing in the membrane stabilization, the major porin OprF and the MexEF-OprN RND efflux pump, were identified. Finally, the contribution of MexEF-OprN in membrane integrity and thus the nitrosative resistance were confirmed thanks to an *oprN*-deficient mutant. Thus, the increase in antibiotic resistance related to this pump could be a consequence of this envelope stress response mediated by MexEF-OprN.

Keywords: *air pollution, antibiotic resistance, membrane, adaptation, P. fluorescens.*

Introduction

The envelope of Gram negative bacteria is highly complex. It could be decomposed in three parts: (i) a symmetric phospholipid bilayer inner membrane (ii) an asymmetric outer membrane with phospholipids in the inner leaflet and lipopolysaccharides (LPS) outer layer both delimiting (iii) a hydrophobic environment called periplasm containing the structural peptidoglycan^{1,2}. Moreover, a wide range of proteins are present in each compartment for the formation, recycling and maintenance of each component necessary for membrane vital function. Indeed, several systems such as the "respirasome" (oxidative phosphorylation, denitrification), osmotic and nutrient intake regulation (porins, channels, efflux pumps, and ABC transporters), sensing systems (two component systems, porins), motility and adherence systems (flagella, pili, adhesion, chemotaxis), detoxification systems (efflux pumps, porins, ABC transporters), virulence (secretion systems, siderophores, enzymes, EPS) are distributed in the whole envelope. This typical architecture allow a precise control in the permeability to selective substrates, harmful or benefic for bacterial growth. Moreover the envelope composition is flexible which allow an appropriate bacterial response and adaptation towards its environment. Interestingly, a wide range of envelope stress leads to an increase in antibiotic resistance such as a tight up-

regulation of multidrug resistance efflux pumps. These complexes exhibit a conserved structure and arrangement³. Indeed, genes encoding these protein complexes are found in operon within the chromosome. Multidrug efflux pumps are organized in a tripartite structure constituted in a resistance-nodulation-cell division (RND) protein enched in the inner membrane coupled with a channel, an outer membrane protein (OMP), allowing a dynamic pore formation facilitating the efflux of specific substrates from the cytoplasm or the periplasm through the envelope⁴. The last component of these efflux pumps is the membrane fusion protein (MFP) forming a periplasmic adaptator protein around OMP-RND complexes. Each of these three classes of proteins is essential for drug efflux, and a lack of even one component makes the entire complex totally unfunctional^{5,6}. However a redundancy in the antibiotic resistance profile is found between RND efflux pump in *P. aeruginosa*⁷. Thus, it is plausible that a potential rearrangement among the components of each efflux pump could occur to face a potential lack of one part of these pumps. Interestingly, efflux pump seems to exhibit other characteristics than the efflux of toxic substrates such as antibiotics. Indeed, the MexEF-OprN efflux pump is expressed at very low levels in wild-type *P. aeruginosa* and tightly regulated⁸. However this basal expression does not significantly contribute to the natural antibiotic resistance of this

species. In contrast to their antibiotic resistance implication, the main physiological function of multidrug efflux pumps is largely unclear⁹. For instance, it was suggested that multidrug efflux pumps in *P. aeruginosa* could play a role in the regulation of *Quorum Sensing* mechanisms and indirectly virulent phenotypes. For example, MexAB-OprM could export acyl-homoserine lactones and MexGHI and MexEF-OprN precursor of the quinolone system^{10,11}. Moreover, MexAB-OprM, MexEF-OprM and MexXY-OprM are also implicated in invasive ability of *P. aeruginosa* in host through the export of virulence factors¹². AcrAB homologs in *P. aeruginosa* were found to efflux toxic compounds from host cells enhancing thus the survival and pathogenicity of the strain^{13,14}. Another physiological function attributed to efflux pumps in *P. aeruginosa* is their role in biofilm formation¹⁵. One last function associated to multidrug efflux pumps is the export of membrane components released during the natural turnover or resulting from membrane damages mediated by the MexCD-OprJ in *P. aeruginosa* and potentially EmhABC in *P. fluorescens*^{16,17}. Interestingly, during a nitrosative stress following gaseous nitric oxide (NO) exposure, the antibiotic resistance profile is significantly modified for several strains^{18–20}. More recently our laboratory demonstrated a modulation of this phenotype in *P. fluorescens* strains after exposure to nitrogen dioxide (NO₂)²¹. Indeed, an over-expression of the *mexEF-*

oprN operon coupled with an increase in fluoroquinolones and aminoglycosides resistance were observed. The MexEF-*oprN* efflux pump was linked intriguingly with the nitrosative stress response. It gave rise to the hypothesis that MexEF-OprN could export nitric oxides (NO_x) and related reactive nitrogen species (RNS). Moreover the membrane permeability was also noted to increase²². However *mexEF-oprN* is tightly regulated by several transcriptional factors such as MexT, MexS, MvaT or AlgU. Since AlgU is activated through parietal stress, the MexEF-OprN up-regulation could only be a consequence of the envelope stress caused by NO₂ in order to limit the damages by steric hindrance rather than the efflux of toxic NO_x species.

Material and methods:

Bacterial strain and growth conditions

Pseudomonas fluorescens strains and the plasmid used in this study are listed in **Table S1**. Strains were grown overnight in Luria–Bertani (LB) medium broth at 28 °C under limited agitation (180 rpm) supplemented, if necessary with antibiotics. Then cultures were diluted ($A_{580} = 0.08$) in Davis Medium Broth (DMB), a minimal medium with 2.16 g/L glucose as carbon source. The exponential or stationary growth phase were reached after incubation at 28°C under agitation. Bacterial cultures were transferred on cellulose nitrate membrane filters (0.45 µm,

pore size 0.2 µm, diameter 47 mm, Sartorius Biolab Products) and incubated on DMB agar plates at 28°C for 4 h to obtain a monolayer of bacteria. Then the membranes covered by bacteria were laid on agar one-well dishes (size 127.8. 85.5 mm, Thermo Scientific Nunc), which were directly transferred into a homemade gas delivery device ²¹.

Disruption of the *oprN* gene in *P. fluorescens* MFAF76a

MFAF76aΔ*oprN* was generated by central deletion (1032bp) of *oprN* gene. This mutation was achieved by PCR using the Muta1-*oprN* and Muta2-*oprN* (779 bp product) primers or Muta3-*oprN* and Muta4-*oprN* primers (756 bp product) (Table S2). The PCR products obtained corresponded to the upstream and downstream parts, respectively, of the *oprN* gene of the MFAF76a strain, each carrying a restriction site for *XhoI* enzyme (NEB). PCR parameters were set up, as described follow, annealing temperature at 57°C, extension time for 45s, 35 cycles. Then a digestion followed by a ligation step were performed to obtain the construction of interest. Then, a third PCR step was done using Muta1-*oprN* and Muta4-*oprN* primers to amplify Δ*oprN* (same parameters except the elongation time of 1min45s). Each PCR was performed in standard conditions, with the Phusion® High-Fidelity DNA polymerase (NEB). The product obtained was inserted into pAKE604 that had been linearized by digestion with *SmaI* (NEB).

The resulting plasmid, pAKE604Δ*oprN*, was verified by sequencing and was then transferred into MFAF76a by biparental mating. *E. coli* S17-1 ²³ containing pAKE604Δ*oprN* and recipient MFAF76a cells were mixed and spotted onto a LB agar plates and incubated overnight at 37°C. The mating mixture was suspended in 1 mL of sterile physiological water and 0.1 mL aliquots were spread on cetrimide agar plates supplemented with kanamycin (50 µg/mL), to select *Pseudomonas* carrying the modified plasmid without further contamination of *E. coli*. The excision of the suicide plasmid, by a second recombination event, was triggered by plating on LB agar medium supplemented with 10% sucrose. The mutant containing the early stop codon in the *oprN* gene was verified by DNA sequencing and named MFAF76a-Δ*oprN*.

Complementation of *oprN* in MFAF76a-Δ*oprN*

The *oprN* sequence (PF02321, KT070325) was amplified with the Comp1-*oprN* and Comp2-*oprN* primers (Table 2) by standard PCR from genomic DNA extract from MFAF76a. The PCR parameters were set up as follows: an annealing temperature of 55°C, extension time for 1min45s, 35 cycles. The polymerase used was Phusion® High-Fidelity DNA polymerase (NEB). The PCR product was digested with *EcoRI* and *XbaI* (NEB) and ligated into pPSV35 linearized previously by the same enzymes ²⁴. *E. coli* was transformed with

the ligation product and the resulting plasmid was checked by PCR. Fresh MFAF76a colonies were washed twice in cold sterile distilled water and transformed with 5 µL of plasmid DNA by electroporation in 1 mm cuvette at 1.8 kV (Savant electroporater). LB was then added and the mix incubated for 1 h at 28 °C with shaking (180 rpm). The samples were then plated on LB agar supplemented with gentamycin and with 0.1 mM IPTG.

Exposition to nitrogen dioxide

As previously described by Kondakova *et al.* 2016, an exposure system was developed in order to mimic the environmental exposition ²¹. Briefly, the bacterial bed was exposed during 2 h at 28 °C with a constant gas stream of 2 L/min, in two separate exposure chambers. A control was obtained using synthetic air. The NO₂-exposed bacteria were laid in contact with a mixture of N₂/O₂ 8/2 (v/v) complemented with 45 ppm of NO₂ (Air Liquide, GMP Europe). After exposure, bacteria were resuspended in sterile saline solution.

Cultivability and growth kinetics

Cultivability tests were done by serial dilution in saline solution from the bacterial suspension to reach dilution of 10⁻⁷. 100 µL of dilution range 10⁻⁴ to 10⁻⁷ were spotted on LB agar plates in triplicate for both conditions. After incubation at 28°C for 24 h, viable colony forming unit were numerated. After adjustment of the bacterial concentration to an absorbance of

0.08 at 580nm in DMB, growth kinetics were done for both conditions in triplicate in a 96-well test plate (Nunc™). The bacterial population was evaluated every 30 min by turbidimetry at A₅₈₀ during 24 h.

Flow cytometry analysis of membrane permeability

After exposure, 1 mL of bacterial suspension was stained for 15 min with SYTO9 (5.01 nM) and propidium iodide (PI, 30 nM) from the Live/Dead BacLight kit (L-7012, Thermofisher). Thence, damaged and total bacteria were respectively observed as PI and SYTO9 positive using flow cytometry (CytoFLEX S, Beckman Coulter) coupled to the CytExpert v1.2 software. PI and SYTO9 were excited at a 488 nm and their fluorescence were respectively detected at 690±50 nm and 525±40 nm. For each measurement, 10,000 events were collected at a medium flow (30 µL/min). A negative control for membrane permeability was done on bacterial culture without exposure. Thus cells were treated with ethanol 50% for 10 minutes before PI staining to calibrate the PI threshold on the software.

Whole proteome identification and quantification

Bacterial suspension were centrifuged at 13.000 g, 4°C during 20 minutes after NO₂ exposure. Then, bacterial pellets were resuspended in a 20mM Tris-HCl Buffer (pH 7.4) and sonicated. Bacterial lysates were centrifuged (10,000 g; 10 min; 4 °C). The

concentration of the protein content was measured using a Bradford test (Biorad™). The separation, identification and the relative abundance of each protein were done as previously described²⁵. Briefly protein extracts were concentrated on a SDS-PAGE (7%), stained using Coomassie dye, before dehydration of protein bands and trypsin digestion. Finally the identification was done using a LTQ Orbitrap Elite (Thermo Scientific) coupled to an Easy nLC II system (Thermo Scientific). The mobile phase consisted of H₂O/0.1% formic acid (FA) (buffer A) and ACN/FA 0.1% (buffer B). Samples were injected onto an enrichment column (C18 PepMap100, Thermo Scientific) and eluted at a flow rate of 300 nL/min using a three-step linear gradient (from 2 to 40% B over 75 min, from 40 to 80% B in 4 min and 11 min at 80% B). The mass spectrometer was operated in positive ionization mode with capillary voltage and source temperature set at 1.5 kV and 275 °C, respectively. The samples were analyzed using CID (collision induced dissociation) method. Fragmentation occurred in the linear ion trap analyzer with collision energy of 35%. All measurements in the Orbitrap analyzer were performed with on-the-fly internal recalibration (lock mass) at m/z 445.12002 (polydimethylcyclsiloxane). After MS analysis, raw data were imported in Progenesis LC-MS software (Nonlinear Dynamics). For comparison, one sample was set as a reference and the retention times of all other samples within the

experiment were aligned. After alignment and normalization, statistical analysis was performed for one-way analysis of variance (ANOVA) calculations. Peptide features presenting a p-value and a q-value less than 0.05, and a power greater than 0.8 were retained. MS/MS spectra from selected peptides were exported for peptide identification with Mascot (Matrix Science) against the database restricted to *P. fluorescens* A506 (<http://www.pseudomonas.com>). Only the proteins which varied by 2-fold in these average normalized abundances between growth conditions were retained.

Quantitative real-time PCR

Total RNA was prepared by the hot acid-phenol method²⁶ from NO₂-exposed and unexposed bacteria. Residual DNAs were eliminated by acid phenol treatment. The absence of DNA was confirmed by showing that PCR reactions failed without prior cDNA synthesis. RNAs were nonspecifically converted to single stranded cDNAs using the High Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems). Synthesis of cDNAs and real time PCR, allowing the quantification of mRNAs of interest were performed as previously described²⁷ using primers listed in **TableS3**. The relative quantification of the mRNAs was obtained by the comparative CT ($2^{-\Delta\Delta CT}$) method as described²⁸. Measurement of *recA* gene was used as an internal standard. Significances of differences between mean values were

assessed using the t-test with significance set at $p < 0.05$ (*), < 0.01 (**), and < 0.001 (***)).

Statistical analysis

All experiments were carried out at least three times. Significances of differences between mean values were assessed using the Mann-Whitney test with significance set at $p < 0.05$ (*), < 0.01 (**), and < 0.001 (***)).

Results & discussion

Fatty acids (FA) content represents a major component of the membrane. Indeed, it takes part in generation of various envelope components of Gram negative bacteria such as phospholipids (PLs), lipopolysaccharide (LPS), lipoproteins (*e.g.* Murein lipoprotein) and peptidoglycan. Altogether these molecules are crucial for the typical architecture of bacterial envelope. However, the morphology of *P. aeruginosa* envelope is strangely altered after an NO exposure²⁹. These data highlight a deleterious effect on *P. aeruginosa* envelope components. When crossing through the membrane by simple diffusion, NO_x exhibit a higher reactivity within this hydrophobic moiety leading to FA autoxidation and nitrosation^{30,31}. Such FA modifications could then enhance drastic changes in membrane fluidity and permeability³². However, this phenomenon remains still unknown in the prokaryotic world. Previous studies on the lipidome of *P. fluorescens* strains after exposure to NO₂ highlighted a loss of an unknown

glycerophospholipid (UGP) but no other significant modification on other GP and no alteration of FA²². Thus, it is possible that FA content could be quickly recycled to limit the expansion of such alterations. Moreover an increase in membrane permeability had been previously suggest²² Another possible target is membrane proteins since they could endorse several post-translational modifications following NO_x reactivity such as S-nitrosylation or tyrosine nitration^{33,34}. Thus, the proteomic profile of whole cell protein extract was investigated after exposure to 45ppm of NO₂ (**Figure 1**).

NO₂-induced envelope stress

Thus, after an exposure to NO₂, an increase of protein abundances involved in GP and LPS synthesis, and in FA elongation step is observed. Moreover the peptidoglycan recycling is increased. However, a decrease in the initiation step of FA *de novo* synthesis, FA degradation and storage is evaluated. The quantity of proteins involved in envelope stress response varies. Finally, proteins involved in antibiotic resistance are mainly over-produced.

Indeed, an under-production of three acetyl-CoA carboxylase, AccA, AccC1 and AccD with respective fold changes (FCs) of 1.91, 2.05 and 2.28 is noted (**Table S4**). Altogether, these enzymes catalyze the first step of FA *de novo* synthesis. Thus, NO₂ induces a decrease in the initiation step of FA *de novo* synthesis³⁵.

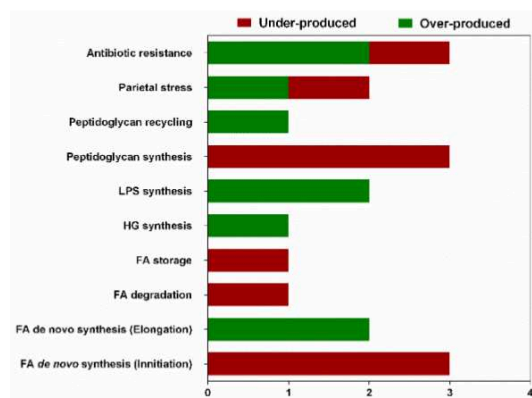


Figure 1: Proteomic profile of *P. fluorescens* MFAF76a after NO₂ exposure. FA: fatty acids; HG: Head-group of glycerophospholipids; LPS: lipopolysaccharide. The identification of proteins was performed using *P. fluorescens* A506 as reference (N=4).

However, FabA and FabG1, are significantly over-produced with respective FCs of 2.21 and 2.81. Both proteins are involved in FA elongation step³⁶. Moreover, FadE and PhaC are under-produced under this stress with respective FCs of 2.33 and 1.75. FadE is involved in the degradation of FA through β -oxydation pathway³⁷ and PhaC is involved in FA storage into polyhydroxyalkanoate³⁸. The decrease in FA storage suggest that NO₂ induces an important needs in FA content for bacterial resistance. Since the β -oxydation pathway could be decreased and the elongation step of FA synthesis is increased, it is possible that FA are recycled or could give longer acyl chains. However, the FA content of glycerophospholipids (GP) are not modified after NO₂ exposure²². Interestingly, protein involved directly in GP synthesis are not modified. However a phosphoserine phosphatase (SerB) is produced after exposure (**Table S4**). This enzyme is involved in the formation of L-serine³⁹.

Thus L-serine could be redirected to the amino-acids pathway or could be incorporated in the GP synthesis to give phosphatidylserine (PS). Then PS could be converted into phosphatidylethanolamine via the PS decarboxylase (Psd)⁴⁰, a major GP (73%) in *Pseudomonas sp.* membrane²¹.

Thus, another component using FA for its maturation like LPS or peptidoglycans could be altered. Indeed, the quantities of LpxC and KdsC are significantly increased with FCs of 2.26 and 2.82 (**Table S4**). LpxC is engaged in lipid A synthesis while KdsC in KdO one⁴¹. Both components are crucial for LPS formation. Thus, NO₂ could induce an increase in LPS formation and indirectly of virulence⁴².

Finally, the synthesis and the recycling of the peptidoglycan is altered after exposure to NO₂. Indeed, the abundance of MurC, FtsI and DacA are decreased with respective FCs of 2.82, 2.96, 2.12 (**Table S4**). MurC is crucial for the transfer of L-alanine to the nascent sub-units constituting the peptidoglycan within the cytoplasm. Moreover, FtsI and DacA are two penicillin-binding protein (PBP) essential for the transpeptidation and cross-linking of peptidoglycan within the periplasmic space⁴³. However, the quantity of NagZ is significantly increased (FC=2.37). NagZ is a glucosaminidase involved in the recycling of peptidoglycan in response of an envelope stress⁴⁴. Altogether these data highlight a potential

recycling of peptidoglycan in response to NO₂.

Based on these results, the NO₂-induced envelope stress, previously described²², could be due in part of these important changeovers in cell-wall constituents. Thus, the expression of genes implicated in the response to parietal stress and the relative abundance of related proteins were investigated (**Figure 2**).

Thus, the expression *algU* tends to be decreased (FC= 0.26). The related protein AlgU exhibits a significant decrease in abundance (FC=2.29) after exposure (**Table S5**). However, the expression of *algD* is significantly increased (FC=3.15) (**Figure 2**). AlgU is an extracytoplasmic sigma factor with equivalent function to RpoE in *E.coli*⁴⁵. AlgU is sequestered at the inner membrane by the transmembrane protein MucA which is cleaved under cell wall stress and then releases AlgU. Thus, AlgU could act on alginate genes expression (*e.g. algD*), including *algU* itself⁴⁶. Thus, the over-expression of *algD* is certainly due to another positive regulator in alginate synthesis. Indeed, several positive regulators in alginate synthesis exist, such as AlgB, AmrZ and AlgR⁴⁷. AlgD is a crucial enzyme that catalyzes a rate-limiting and irreversible oxidative step reaction for alginate synthesis^{47,48}. The structuration of *P. fluorescens* MFAF76a biofilm is impacted by an exposure to 45ppm of NO₂. Indeed, a significant increase in the biofilm thickness (almost 2.5 fold thicker) and no modification of the total biomass were

noticed. These data strongly suggest an increase in the matrix formation which could be due to an overproduction of alginates²¹.

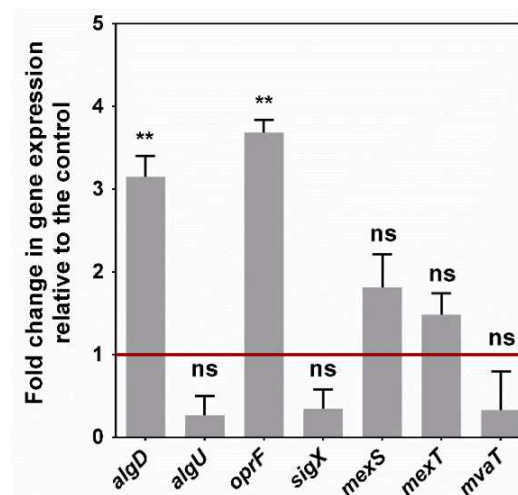


Figure 2 : Expression level of genes encoding proteins implicated in NO_x tolerance. ns: not significant ; * : pval<0.05 ; ** : pval<0.01 (N=4).

More recently, AlgU and another ECF, SigX, in *P. aeruginosa* have been found to exert a role in cell envelope homeostasis through partly OprF expression^{27,49}. Indeed, OprF, a prominent porin in *P. aeruginosa* cell wall is implicated in outer membrane stabilization⁵⁰ and in sensing environmental modifications⁵¹. In this study, an increase in the expression (FC=3.69) and in the abundance (FC=2.29) of this porin is noticed under this stress. However, the relative expression of *sigX* gene is not significantly modified (FC=0.35) even if it tends to decrease. Thus, another pathway, AlgU and SigX independent seems to be involved in the expression of OprF under this stress. Interestingly, OprF is also involved in biofilm formation under anaerobic conditions, possibly through nitrates or nitrites diffusion^{52,53}. Thus, OprF

seems to be part of the nitrosative stress tolerance through a potential implication in membrane stabilization and a potential NO_x efflux.

Impact and regulation of the RND efflux pump MexEF-OprN on the nitrosative resistance of *P. fluorescens* MFAF76a

Several data have pointed a curious link between the nitrosative stress and the antibiotic resistance mediated by the RND efflux pump MexEF-OprN⁵⁴. Indeed, the expression in *mexEF-oprN* operon increases significantly after the 45 ppm NO₂ exposure, of about 14, 3.5, 4.6 fold respectively²¹. Interestingly, MexF protein is slightly increased (FC= 1.42), but no data were obtained for MexE and OprN (**Table S6**). MexF constitutes the RND part of the previous tripartite efflux pump which is anchored within the inner membrane and uses the proton motrice force to extrude compounds from the cytoplasm and also the periplasm⁵⁵.

Thus the regulation of the expression of *mexEF-oprN* in response to NO₂ exposure was investigated. The expression of *mexS* and *mexT* is slightly up-regulated (FCs=1.81, 1.48 respectively) while *mvaT* tends to decrease (FC=0.33). Moreover, the abundance of MexT is increased (FC=1.82) while decreased in the case of MvaT (FC=2.46). All of these proteins are transcriptional regulators related to antibiotic resistance. Indeed, MexT, MexS and MvaT could modulate independently the expression of the *mexEF-oprN* operon

⁵⁶⁻⁵⁸. MvaT is well-known as a global regulator of virulence gene (QS, biofilm formation, swarming motility) in *P. aeruginosa*⁵⁹. MvaT belongs to Histone-like nucleotid-structuring (H-NS) family⁶⁰. A specific deletion within *mvaT* gene, becoming then inactive, enhances the expression of *mexEF-oprN*⁵⁸.

MexT is a LysR-type transcriptional activator encoded by *mexT* gene, adjacent to *mexEF-oprN* operon. In most case, *mexT* undergoes a deletion of a 8bp within its ORF leading to an active form of MexT⁶¹. Sometimes the activation of MexT is due to the loss of MexS, a putative oxydoreductase that could lead to the formation of metabolites which serve as effector for MexT⁶². The active form of MexT induces the over-expression of *mexEF-oprN* and simultaneously a decrease of *oprD*^{8,63}. The resulting phenotype is the increase in chloramphenicol, quinolones and trimethoprim resistance and a decrease of carbapenem susceptibility respectively. In the light of all these data, it is not possible to conclude in the regulatory mechanism implicated in the over-expression in *mexEF-oprN* in response to NO₂. Thus, further investigations are required to depict this pathway. However this efflux pump could participate in NO₂ detoxification was investigated like in the case of NO⁵⁴.

After a 45 ppm of NO₂ exposure, MFAF76a exhibits a significant decrease in cell viability²². Thus the viability of an in-frame

KO mutant for the gene *oprN* was quantified (**Figure 3**).

As illustrated on **Figure 3A**, it is possible to note a significant decrease of about 4 and 4.5 fold in the cultivability after exposure in the case of the wild-type MFAF76a (WT) and in the mutant MFAF76a- Δ *oprN* (Δ *oprN*) respectively. Moreover a slight decrease in the cultivability between both strains in the control condition (air exposure) was observed. Thus, the mutant Δ *oprN*, lacking the gene encoding the porin OprN, seems to be slightly more sensitive to NO₂ than the wild-type suggesting a potential role of MexEF-OprN in the resistance against NO₂. However, a slight but significant difference in the cultivability of the WT and Δ *oprN* was noticed in the control condition and conserved after exposure. Thus, the deletion of *oprN* seems to impair the cultivability of the strain. The loss in the cultivability could be explained by (i) the apparition of viable but non culturable bacteria and/or (ii) the bacterial death.

It is plausible that the absence of this porin within the outer membrane is perceived by the bacteria as membrane stress. Indeed the parietal stress could lead to subsequent delay in replication or, in worse cases, if the bacteria is unable to detoxify the NO₂ and to repair completely, to a potential death. However since MexEF-OprN is induced mainly during an exposure to antimicrobial, it is plausible that the mutation is not lethal for the bacteria and does not produce a drastic change in its phenotype. Finally the

mutant complemented with the *oprN* gene, carried on the pPSV35 plasmid (*oprN*⁺), does not seem to recover the phenotype of the control strain, carrying the empty pPSV35 vector (EV), even though the changes are not significant. Indeed it was noted a decrease of 2 fold and 5.6 fold in cultivability versus the control condition of MFAF76a EV and the MFAF76a-*oprN*⁺ respectively (**Figure 3B**).

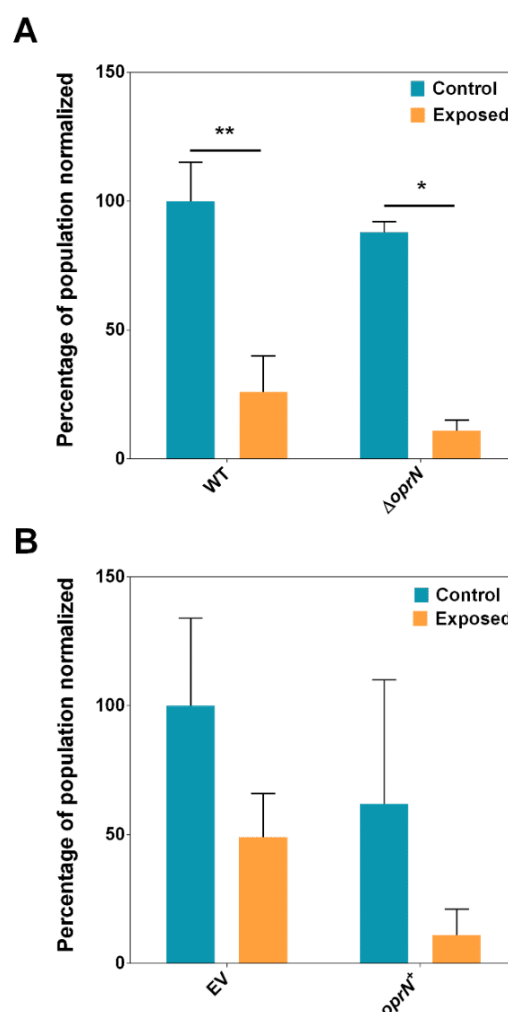


Figure 3: Impact of MexEF-OprN in the cultivability of *P. fluorescens* MFAF76a strain after exposure to NO₂. (A) Bacterial cultivability of MFAF76a Δ *oprN* mutant normalized to the wild-type control (WT) control (N=6). (B) Bacterial cultivability of MFAF76a-*oprN*⁺ mutant (*oprN*⁺) normalized to the wild-type strain transformed with the empty pPSV35 vector (EV) control (N=4).

This absence of significance could be explained by the high dispersion in data which are in part due to the selective pressure exerted by Gentamycin, an inhibitor in protein synthesis.

To elucidate the potential fate of MFAF76a after exposure, growth kinetics were also performed. As illustrated in the **Figure 4**, no significant modification in the growth kinetics between MFAF76a-WT and the *oprN* mutant were observed. Indeed, both strains after exposure, exhibited an increase of 2 hours in the lag phase and of 45 minutes in the generation time, compared to the control (**Figure 4A**). The mutant $\Delta oprN$ did not exhibit significant modification of the growth kinetics compared to the wild-type. Thus the deletion of *oprN* may not impair the growth of MFAF76a. Thus, two main questions appear: (i) Could another porin compensate the lack of OprN? (ii) Is OprN really crucial in the detoxification of NO₂ and thus in the survival of the strain? Here again, the complementation of *oprN* in the mutant does not allow to restore the phenotype observed in the case of the corresponding control strain (EV), transformed with the empty vector (**Figure 4B**). Indeed, the lag phase was increased of 3 hours and 3 hours and a half and the generation time was slightly reduced of 15 and 22 minutes for MFAF76a-EV and MFAF76a-*oprN*⁺ respectively after exposure versus control condition. The increase in the lag phase observed in the case of MFAF76a-EV

compared to the WT could be explained by the use of gentamycin antibiotic in bacterial culture before exposure to preserve pPSV35 plasmid within the strain.

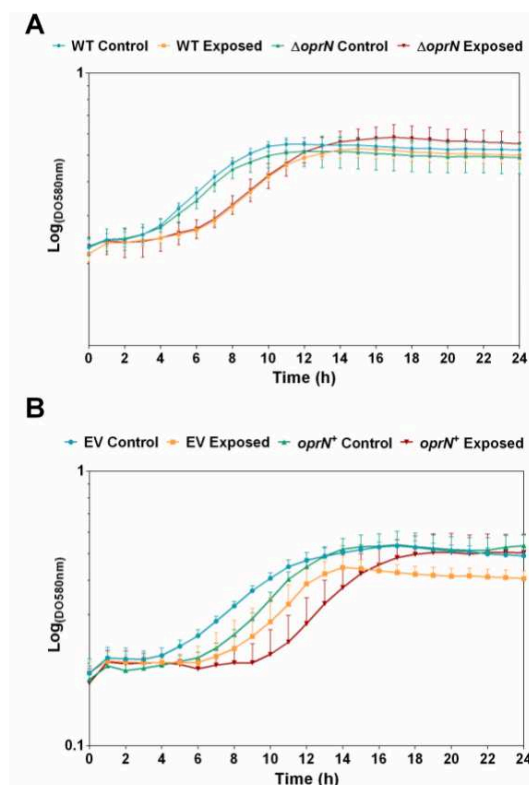


Figure 4: Impact of MexEF-OprN on the growth kinetics of *P. fluorescens* MFAF76a strain after exposure to NO₂. (A) Growth kinetics of MFAF76a $\Delta oprN$ mutant normalized to the wild-type (WT) control. (B) Growth kinetics of MFAF76a-*oprN*⁺ mutant (*oprN*⁺) normalized to the wild-type strain transformed with the empty pPSV35 vector (EV) control (N=4).

The addition of such aminoglycoside, a specific inhibitor in protein synthesis, could lead to another stress for the bacteria and might provoke to a delay in the growth of the strain after exposure⁶⁴. Moreover, as mentioned above, the expression of *oprN* gene carried on pPSV35 vector is mainly inducible by IPTG addition to the culture media, even if a weak expression was observed. Thus, it could not mimic

completely the expression of *oprN* *in vivo* during such nitrosative stress.

The last part of this work was to establish the impact of *oprN* in the membrane integrity during the nitrosative stress. Thus, Live Dead tests were performed and the membrane permeability was measured by flow cytometry after exposure to NO₂. As presented **Figure 5**, a significant increase was noticed in Syto9/IP (permeabilized) and IP (“dead”) labelled bacteria after exposure reflecting the loss in membrane integrity (**Figure 5A**). Indeed, the percentage of viable bacteria in the WT and MFAF76a- Δ *oprN* is respectively decreased of 2.8 and 3.3 FC compared to the control. Moreover a significant 1.4 fold increase in IP labelled bacteria was noted for MFAF76a- Δ *oprN* after exposure compared to the wild-type. Thus, the deletion of *oprN* gene could promote an increase in MFAF76a susceptibility to NO_x mediated membrane permeability. On another side, no significant modification were observed between MFAF76a-*oprN*⁺ and the strain transformed with the empty vector in both conditions (control or exposed) (**Figure 5B**). Thus, the complementation of *oprN* allows to find back the same phenotype as the control strain (EV). The previous link mentioned about the antibiotic resistance mediated by MexEF-OprN efflux pump and the nitrosative stress could be due to the parietal stress.

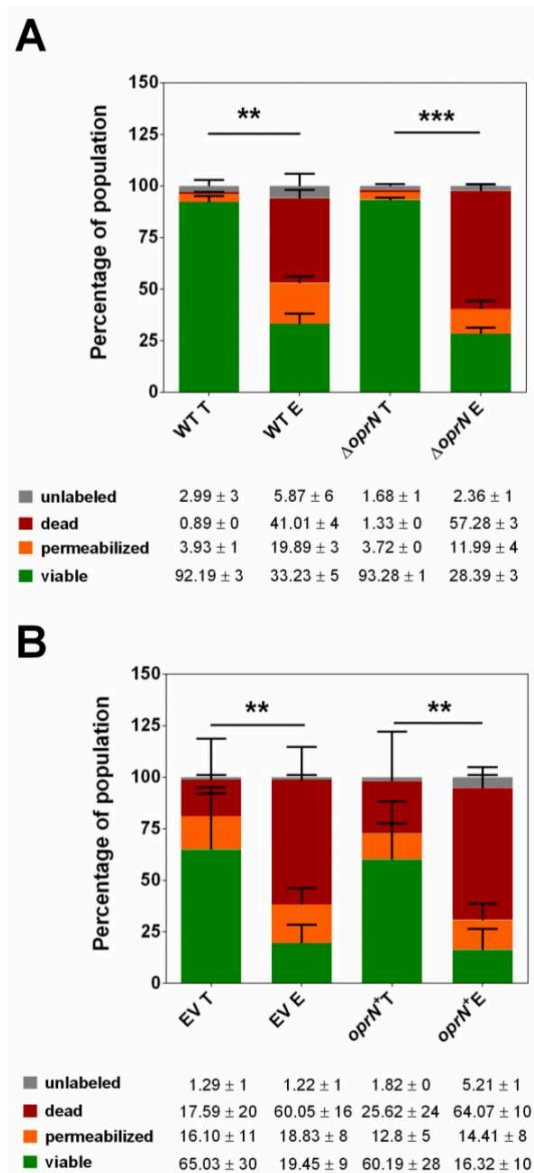


Figure 5: Impact of MexEF-OprN on the membrane permeability of *P. fluorescens* MFAF76a strain after exposure to NO₂. (A) Membrane permeability of MFAF76a- Δ *oprN* mutant normalized to the wild-type (WT) control. (B) Membrane permeability of MFAF76a-*oprN*⁺ mutant (*oprN*⁺) normalized to the wild-type strain transformed with the empty pPSV35 vector (EV) control (N=4).

Indeed, after exposure to 45ppm of NO₂, MFAF76a encountered two phenomena: (i) a membrane remodeling and (ii) a permeabilization, supported by altered expression of genes implicated in membrane stress response, as presented

above, along with the loss of an unknown glycerophospholipid (UGP)^{21,22}.

Here we assume that the over-expression of *mexEF-oprN* is a strategy for MFAF76a to adapt against the damages encountered following NO₂ exposure to stabilize the membrane by its steric hindrance within the membrane first, with subsequent benefit for the bacteria such as antibiotic resistance and a potential detoxification function by NO_x efflux evoked previously²¹.

Conclusion

After NO₂ exposure, several constituents associated to the bacterial envelope are modulated. Indeed, the storage and the degradation of fatty acids are decreased certainly in favour to an immediate use following the nitrosative stress. Moreover, the synthesis of peptidoglycan is diminished and its recycling increase. However the LPS synthesis is significantly increased following the nitrosative stress suggesting an increase in virulence. Surprisingly, here the emergence of a phosphoserine phosphatase (SerB) was noticed. These data highlight a potential increase in PS, and subsequently PE, after exposure to NO₂. Altogether these alterations lead to drastic changes in membrane composition which could promote an envelope stress confirmed by the increased abundance of OprF. However, the regulatory pathway in *oprF* gene expression are not yet well understood. The insertion of OprF within the external membrane could participate in

the membrane stabilisation. Moreover, OprF could also be involved in nitrate efflux (Yoon *et al.*, 2002). Finally, the RND efflux pump MexEF-OprN is critical in the response to NO₂-induced envelope stress. Moreover, the loss in cultivability in an *oprN* mutant after NO₂ exposure suggest an implication in NO_x detoxification, certainly by efflux (Fetar *et al.*, 2011).

Acknowledgments

This work was conceived by S.D. and C.D.P. The study was done by S.D and T.C. We are grateful to D.S., helping with cytometry, O.M. and R.D. for their help with transcriptomic assays, M.B. and A.M. for their support in mutagenesis assays and finally Y.K. and J.H. for her collaboration in proteomic study. This manuscript was written by S.D, T.C and C.D.P. We would like to thank M.G.J., H.J.H. and N.O. for critical reading of the manuscript. This study was supported by a PhD grant from the GRR SESA (Region Normandie) and was financially supported by the European Union (FEDER), "Région Normandie" and "Evreux Porte de Normandie" (France).

References:

1. Nikaido, H. Structure and functions of the cell envelope of Gram-negative bacteria. *Rev. Infect. Dis.* **10**, S279–S281 (1988).
2. Silhavy, T. J., Kahne, D. & Walker, S. The bacterial cell envelope. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2**, a000414–a000414 (2010).
3. Schweizer, H. P. Efflux as a mechanism of resistance to antimicrobials in *Pseudomonas aeruginosa* and related bacteria: unanswered questions. *Genet. Mol. Res.* **15** (2003).

4. Du, D. *et al.* Multidrug efflux pumps: structure, function and regulation. *Nat. Rev. Microbiol.* **16**, 523–539 (2018).
5. Ma, D. *et al.* Genes *acrA* and *acrB* encode a stress-induced efflux system of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **16**, 45–55 (1995).
6. Ma, D. *et al.* Molecular cloning and characterization of *acrA* and *acrE* genes of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **175**, 6299–6313 (1993).
7. Poole, K. Efflux-mediated multiresistance in Gram-negative bacteria. *Clin. Microbiol. Infect.* **10**, 12–26 (2004).
8. Köhler, T. *et al.* Characterization of MexE-MexF-OprN, a positively regulated multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* **23**, 345–54 (1997).
9. Neyfakh, A. A. Natural functions of bacterial multidrug transporters. *Trends Microbiol.* **5**, 309–313 (1997).
10. Lamarche, M. G. & Déziel, E. MexEF-OprN Efflux Pump Exports the *Pseudomonas* Quinolone Signal (PQS) Precursor HHQ (4-hydroxy-2-heptylquinoline). *PLoS ONE* **6**, e24310 (2011).
11. Minagawa, S. *et al.* RND type efflux pump system MexAB-OprM of *Pseudomonas aeruginosa* selects bacterial languages, 3-oxo-acyl-homoserine lactones, for cell-to-cell communication. *BMC Microbiol.* **12**, 70 (2012).
12. Hirakata, Y. *et al.* Multidrug efflux systems play an important role in the invasiveness of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Exp. Med.* **196**, 109–118 (2002).
13. Poole, K. *et al.* Overexpression of the *mexC-mexD-oprJ* efflux operon in *nfxB*-type multidrug-resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* **21**, 713–725 (1996).
14. Poole, K., Krebes, K., McNally, C. & Neshat, S. Multiple antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: evidence for involvement of an efflux operon. *J. Bacteriol.* **175**, 7363–7372 (1993).
15. Kvist, M., Hancock, V. & Klemm, P. Inactivation of Efflux Pumps Abolishes Bacterial Biofilm Formation. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**, 7376–7382 (2008).
16. Adebusuyi, A. A. & Foght, J. M. An alternative physiological role for the EmhABC efflux pump in *Pseudomonas fluorescens* cLP6a. *BMC Microbiol.* **11**, 252 (2011).
17. Fraud, S., Campigotto, A. J., Chen, Z. & Poole, K. MexCD-OprJ multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*: involvement in chlorhexidine resistance and induction by membrane-damaging agents dependent upon the AlgU stress response sigma factor. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**, 4478–4482 (2008).
18. Deppisch, C. *et al.* Gaseous nitric oxide to treat antibiotic resistant bacterial and fungal lung infections in patients with cystic fibrosis: a phase I clinical study. *Infection* **44**, 513–520 (2016).
19. Ghaffari, A. *et al.* A direct nitric oxide gas delivery system for bacterial and mammalian cell cultures. *Nitric Oxide* **12**, 129–140 (2005).
20. Miller, C. C., Miller, M. K., Ghaffari, A. & Kunitomo, B. Treatment of chronic nonhealing leg ulceration with gaseous nitric oxide: a case study. *J. Cutan. Med. Surg.* **8**, 233–238 (2004).
21. Kondakova, T. *et al.* Response to Gaseous NO₂ Air Pollutant of *P. fluorescens* Airborne Strain MFAF76a and Clinical Strain MFN1032. *Front. Microbiol.* **7**, 379 (2016).
22. Depayras, S. *et al.* Impact of gaseous NO₂ on *P. fluorescens* strain in the membrane adaptation and virulence. *Int. J. Environ. Impacts* **1**, 183–192 (2018).
23. Simon, Rutter, U. & Pühler, A. A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: transposon mutagenesis in Gram negative bacteria. *Nat. Publ. Group* 784–791 (1983).
24. Rietsch, A., Vallet-Gely, I., Dove, S. L. & Mekalanos, J. J. ExsE, a secreted regulator of type III secretion genes in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **102**, 8006–8011 (2005).
25. Clamens, T. *et al.* The aliphatic amidase AmiE is involved in regulation of *Pseudomonas aeruginosa* virulence. *Sci. Rep.* **7**, (2017).
26. Bouffartigues, E. *et al.* Transcription of the *oprF* gene of *Pseudomonas aeruginosa* is dependent mainly on the SigX sigma factor and is sucrose induced. *J. Bacteriol.* **194**, 4301–4311 (2012).
27. Gicquel, G. *et al.* The extra-cytoplasmic function sigma factor SigX modulates biofilm and virulence-related properties in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS ONE* **8**, e80407 (2013).
28. Guyard-Nicodème, M. *et al.* Outer membrane modifications of *Pseudomonas fluorescens* MF37 in response to hyperosmolarity. *J. Proteome Res.* **7**, 1218–1225 (2008).
29. Deupree, S. M. & Schoenfisch, M. H. Morphological analysis of the antimicrobial action of nitric oxide on gram-negative pathogens using atomic force microscopy. *Acta Biomater.* **5**, 1405–1415 (2009).
30. Augusto, O. *et al.* Nitrogen dioxide and carbonate radical anion: Two emerging radicals in biology. *Free Radic. Biol. Med.* **32**, 841–859 (2002).
31. Möller, M. N., Li, Q., Lancaster, J. R. & Denicola, A. Acceleration of nitric oxide autoxidation and

- nitrosation by membranes. *IUBMB Life* **59**, 243–248 (2007).
32. Richter, C. Biophysical consequences of lipid peroxidation in membranes. *Chem. Phys. Lipids* **44**, 175–189 (1987).
 33. Ferrer-Sueta, G. *et al.* Biochemistry of Peroxynitrite and Protein Tyrosine Nitration. *Chem. Rev.* **118**, 1338–1408 (2018).
 34. Vázquez-Torres, A. Redox Active Thiol Sensors of Oxidative and Nitrosative Stress. *Antioxid. Redox Signal.* **17**, 1201–1214 (2012).
 35. Best, E. A. & Knauf, V. C. Organization and nucleotide sequences of the genes encoding the biotin carboxyl carrier protein and biotin carboxylase protein of *Pseudomonas aeruginosa* acetyl coenzyme A carboxylase. *J. Bacteriol.* **175**, 6881–6889 (1993).
 36. White, S. W., Zheng, J., Zhang, Y.-M. & Rock, C. O. The structural biology of type II fatty acid biosynthesis. *Annu. Rev. Biochem.* **74**, 791–831 (2005).
 37. Yuan, Y., Leeds, J. A. & Meredith, T. C. *Pseudomonas aeruginosa* directly shunts β -oxidation degradation intermediates into *de novo* fatty acid biosynthesis. *J. Bacteriol.* **194**, 5185–5196 (2012).
 38. Röttig, A. & Steinbüchel, A. Acyltransferases in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* **77**, 277–321 (2013).
 39. Matsumoto, K. Phosphatidylserine synthase from bacteria. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Lipids Lipid Metab.* **1348**, 214–227 (1997).
 40. Gibellini, F. & Smith, T. K. The Kennedy pathway-*De novo* synthesis of phosphatidylethanolamine and phosphatidylcholine. *IUBMB Life* **6**, 414–428 (2010).
 41. King, J. D., Kocíncová, D., Westman, E. L. & Lam, J. S. Review: Lipopolysaccharide biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Innate Immun.* **15**, 261–312 (2009).
 42. Pier, G. B. *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide: a major virulence factor, initiator of inflammation and target for effective immunity. *Int. J. Med. Microbiol. IJMM* **297**, 277–295 (2007).
 43. Elamin, A. A. *et al.* Novel drug targets in cell wall biosynthesis exploited by gene disruption in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLOS ONE* **12**, e0186801 (2017).
 44. Johnson, J. W., Fisher, J. F. & Mobashery, S. Bacterial cell-wall recycling. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1277**, 54–75 (2013).
 45. Yu, H., Schurr, M. J. & Deretic, V. Functional equivalence of *Escherichia coli* σ^E and *Pseudomonas aeruginosa* AlgU: *E. coli* *rpoE* restores mucoidy and reduces sensitivity to reactive oxygen intermediates in *algU* mutants of *P. aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **177**, 3259–3268 (1995).
 46. Schurr, M. J., Yu, H., Martinez-Salazar, J. M., Boucher, J. C. & Deretic, V. Control of AlgU, a member of the σ^E -like family of stress sigma factors, by the negative regulators MucA and MucB and *Pseudomonas aeruginosa* conversion to mucoidy in cystic fibrosis. *J. Bacteriol.* **178**, 4997–5004 (1996).
 47. Hay, I. D., Rehman, Z. U., Moradali, M. F., Wang, Y. & Rehm, B. H. A. Microbial alginate production, modification and its applications. *Microb. Biotechnol.* **6**, 637–650 (2013).
 48. Ma, S. *et al.* Phosphorylation-independent activity of the response regulators AlgB and AlgR in promoting alginate biosynthesis in mucoid *Pseudomonas aeruginosa*. *J BACTERIOL* **180**, 13 (1998).
 49. Duchesne, R. *et al.* A proteomic approach of SigX function in *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane composition. *J. Proteomics* **94**, 451–459 (2013).
 50. Rawling, E. G., Brinkman, F. S. L. & Hancock, R. E. W. Roles of the carboxy-terminal half of *Pseudomonas aeruginosa* major outer membrane protein OprF in cell shape, growth in low-osmolarity medium, and peptidoglycan association. *J BACTERIOL* **180**, 7 (1998).
 51. Hemery, G., Chevalier, S., Bellon-Fontaine, M.-N., Haras, D. & Orange, N. Growth temperature and OprF porin affect cell surface physicochemical properties and adhesive capacities of *Pseudomonas fluorescens* MF37. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **34**, 49–54 (2006).
 52. Hassett, D. J. *et al.* Anaerobic metabolism and quorum sensing by *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in chronically infected cystic fibrosis airways: rethinking antibiotic treatment strategies and drug targets. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **54**, 1425–1443 (2002).
 53. Yoon, S. S. *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* anaerobic respiration in biofilms: relationships to cystic fibrosis pathogenesis. *Dev. Cell* **3**, 593–603 (2002).
 54. Fetar, H. *et al.* *mexEF-oprN* multidrug efflux operon of *Pseudomonas aeruginosa*: regulation by the MexT activator in response to nitrosative stress and chloramphenicol. *Antimicrob. Agents Chemother.* **55**, 508–514 (2011).
 55. Lister, P. D., Wolter, D. J. & Hanson, N. D. Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. *Clin. Microbiol. Rev.* **22**, 582–610 (2009).
 56. Fernandez, L. & Hancock, R. E. W. Adaptive and mutational resistance: role of porins and

- efflux pumps in drug resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* **25**, 661–681 (2012).
57. Kohler, T. *et al.* Characterization of MexE-MexF-OprN, a positively regulated multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* **23**, 345–354 (1997).
58. Westfall, L. W. *et al.* *mvaT* mutation modifies the expression of the *Pseudomonas aeruginosa* multidrug efflux operon *mexEF - oprN*. *FEMS Microbiol. Lett.* **255**, 247–254 (2006).
59. Diggle, S. P., Winzer, K., Lazdunski, A., Williams, P. & Camara, M. Advancing the quorum in *Pseudomonas aeruginosa*: MvaT and the regulation of *N*-Acylhomoserine Lactone production and virulence gene expression. *J. Bacteriol.* **184**, 2576–2586 (2002).
60. Tendeng, C. MvaT proteins in *Pseudomonas spp.*: a novel class of H-NS-like proteins. *Microbiology* **149**, 3047–3050 (2003).
61. Maseda, H., Saito, K., Nakajima, A. & Nakae, T. Variation of the *mexT* gene, a regulator of the MexEF-OprN efflux pump expression in wild-type strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol. Lett.* **192**, 107–112 (2000).
62. Sobel, M. L., Neshat, S. & Poole, K. Mutations in PA2491 (*mexS*) promote MexT-dependent *mexEF-oprN* expression and multidrug resistance in a clinical strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **187**, 1246–53 (2005).
63. Fukuda, H. *et al.* *nfxC*-type quinolone resistance in a clinical isolate of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**, 790–792 (1995).
64. Mingeot-Leclercq, M.-P., Glupczynski, Y. & Tulkens, P. M. Aminoglycosides: activity and resistance. *ANTIMICROB AGENTS CHEMOTHER* **43**, 11 (1999).
65. Morin, J.-P. *et al.* Particules urbaines et céréalières, micro-organismes, mycotoxines et pesticides. *Pollut. Atmos.* (1970). doi:10.4267/pollution-atmospherique.759
66. El-Sayed, A. K., Hothersall, J. & Thomas, C. M. Quorum-sensing-dependent regulation of biosynthesis of the polyketide antibiotic mupirocin in *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 10586. *Microbiology* **147**, 2127–2139 (2001).

Supplementary data:

Table S1 : Strains and plasmids used in this study

Strains or plasmids	Relevant phenotype/genotype	References
<i>P. fluorescens</i>		
MFAF76a	Airborne isolate, able to grow at 37°C	65
MFAF76a-EV	MFAF76a transformed with pPSV35 empty vector, Gm ^R	This study
MFAF76aΔoprN	MFAF76a with a central deletion of <i>oprN</i> (1032 bp)	This study
MFAF76aΔoprN+oprN	MFAF76aΔoprN transformed with pPSV35 vector carrying a WT copy of <i>oprN</i> , Gm ^R	This study
<i>E. coli</i>		
S17.1	RP4-2-Tc::Mu, <i>aph</i> ::Tn7, <i>recA</i> , SmR, donor strain for conjugation	23
Vectors		
pAKE604	Ap ^R , Km ^R , oriT, <i>lacZ</i> , <i>sacB</i> , conjugative suicide vector for <i>oprN</i> gene mutagenesis; Km ^R , <i>sacB</i>	66
pPSV35	<i>P. aeruginosa</i> <i>oriV</i> , <i>laclq</i> <i>mob+</i> , PlacUV5, pUC18 MCS, expression vector, Gm ^R	24

Table S2: List of primers used for the mutation of *oprN* in MFAF76a

Primer name	Primer sequence (5'→3')
Primers used for <i>oprN</i> gene disruption in MFAF76a	
Muta1-<i>oprN</i>	AGAAACTGCTCAAGGAAGAA
Muta2-<i>oprN</i>	TAATAACTCGAGAACGGTCGAAGTTCTTTTG
Muta3-<i>oprN</i>	TAATAACTCGAGGTCAGCAACGTTTGATCTC
Muta4-<i>oprN</i>	TAATAATCTAGACGATTCTGTTCTATGTCAGTG
Primers used for the complementation of <i>oprN</i> in MFAF76a-Δ<i>oprN</i>	
Comp1-<i>oprN</i>	TAATAAGAATTCGCAACAATGAGTCTGAAA
Comp2-<i>oprN</i>	TAATAATCTAGAAGGAGCTCTTTAACAACCTT

Table S3 : Oligonucleotides used in this study for RT-qPCR

Primer name	Accession	Forward primer sequence (5'→3')	Reverse primer sequence (5'→3')
<i>algD</i>	MH937712	AAAGCCCGCTGGTCGAA	TCGTAGATGCTCAGGTCGTAACC
<i>algU</i>	MH937713	CCATGAAGCCCAGGACGTT	ATTCCAAGTGCCCGATACG
<i>mexS</i>	MH937719	GATCGCGGCGACCAAAT	TTCCTCTTCGGTGACGATGAC
<i>mexT</i>	MH937720	CTCGCTGAGCCTGGATGAC	TTCCAGCTCTTCATCGATAAACC
<i>mvaT</i>	MH937721	TTGTCCAGACTCGCTGAATTTT	GCCCGGCATCGTTCTTC
<i>oprF</i>	MH937723	CCCATCCACCACCACTACTGTT	CGCTCGGACAGTTTCTGGTT
<i>recA</i>	MH937724	ATCGCCCATACGCATTACG	CGGCCCTGGGTCAGATC
<i>sigX</i>	MH937725	GATTTGTCGCAGAGCTGGAGTT	TGTCGCACTCAAACCCATGT

Tableau S4 : Remodeling of FA metabolism and associated compounds proteomic profile. Grey cases: fold change lesser than 2.

Metabolic pathway	Accession	Gene	Description	Anova (p)	Fold change
FA de novo synthesis	PfIA506_1248	<i>accA</i>	Acetyl-CoA carboxylase, carboxyl transferase subunit α	8.34x10 ⁻⁵	-1.91
	PfIA506_5375	<i>accC_1</i>	Acetyl-CoA carboxylase, biotin carboxylase subunit	6.90x10 ⁻⁴	-2.05
	PfIA506_3500	<i>accD</i>	Acetyl-CoA carboxylase, carboxyl transferase subunit β	4.33x10 ⁻³	-2.28
	PfIA506_1858	<i>fabA</i>	3-hydroxydecanoyl-ACP dehydratase	3.66x10 ⁻⁴	+2.21
	PfIA506_4012	<i>fabG_1</i>	3-oxoacyl-ACP reductase	4.91x10 ⁻³	+2.81
FA degradation	PfIA506_1901	<i>fadE</i>	Acyl-coenzyme A dehydrogenase	2.67x10 ⁻³	-2.33
FA storage	PfIA506_0386	<i>phaC</i>	Poly(3-hydroxyalkanoate) synthase 2	3.09x10 ⁻⁴	-1.75
GP synthesis	PfIA506_4737	<i>serB</i>	Phosphoserine phosphatase	2.84x10 ⁻¹²	$+\infty$
LPS synthesis	PfIA506_0873	<i>lpxC</i>	UDP-3-O-[3-hydroxymyristoyl] N-acetylglucosamine deacetylase	8.05x10 ⁻³	+2.26
	PfIA506_0936	<i>kdsC</i>	3-deoxy-D-manno-octulosonate 8-phosphate phosphatase	4.41x10 ⁻³	+2.82
Peptidoglycan synthesis	PfIA506_0924	<i>ftsI</i>	Peptidoglycan synthetase FtsI	5.35x10 ⁻³	-2.82
	PfIA506_0931	<i>murC</i>	UDP-N-acetylmuramate-L-alanine ligase	5.46x10 ⁻³	-2.96
	PfIA506_4711	<i>dacA</i>	D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase	2.11x10 ⁻³	-2.12
	PfIA506_1576	<i>nagZ</i>	β -hexosaminidase	2.31x10 ⁻³	+2.37

Tableau S5: Proteomic profile of the envelope stress induction.

Metabolic pathway	Accession	Gene	Description	Anova (p)	Fold change
Regulator	PfIA506_1400	<i>algU</i>	RNA polymerase sigma factor AlgU	1.20x10 ⁻²	-2.29
Effector	PfIA506_3916	<i>oprF</i>	Outer membrane porin OprF	1.36x10 ⁻²	+2.29

Tableau S6: Remodeling of antibiotic resistance proteomic profile. Grey cases: fold change lesser than 2.

Metabolic pathway	Accession	Gene	Description	Anova (p)	Fold change
Regulator	PfIA506_2601	<i>mexT</i>	Transcriptional regulator MexT	1.12x10 ⁻²	+1.82
	PfIA506_4249	<i>mvaT</i>	Transcriptional regulator MvaT	2.24x10 ⁻³	-2.46
Effector	PfIA506_2587	<i>mexF</i>	Multidrug efflux RND transporter, permease protein MexF	8.52x10 ⁻³	+1.42

2.2. Conclusions générales et perspectives

Une exposition au NO₂ induit de profondes et complexes **modulations** des voies de synthèse de nombreux composants de l'enveloppe de *P. fluorescens* MFAF76a (**Figure 35**).

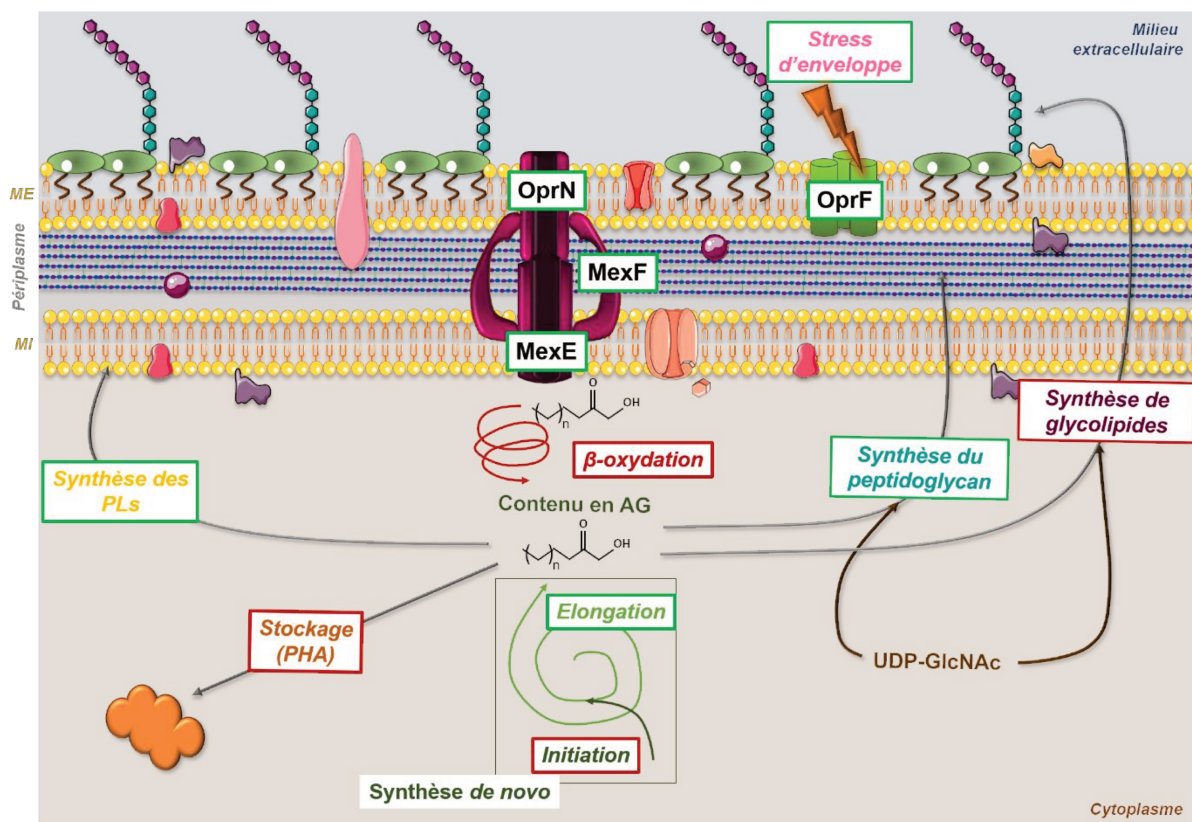


Figure 35 : Récapitulatif du stress d'enveloppe induit par le NO₂ et principaux mécanismes impliqués dans la stabilisation de l'enveloppe.

Les encadrés verts représentent les cibles ou les voies métaboliques sur-régulées. Les encadrés rouges représentent les cibles ou les voies métaboliques sous-régulées. AG : acides gras ; PLs : phospholipides ; PHA : polyhydroxyalkanoates ; UDP-GlcNAc : Uridine diphosphate N-acétylglucosamine ; ME : membrane externe, MI : membrane interne.

En effet, NO₂ induirait potentiellement :

- Une diminution du stockage, de la dégradation par β -oxydation et de l'initiation de la synthèse *de novo* des **acides gras** couplée à une augmentation de l'élongation des acides gras.
- Une diminution de la synthèse du **peptidoglycane** couplée à une augmentation de son recyclage.
- Une augmentation de la synthèse du **lipopolysaccharide**.
- Une augmentation de la synthèse de **phosphatidylsérine**, pouvant être convertie par la suite en phosphatidyléthanolamine, phospholipide majoritaire de la membrane de *Pseudomonas sp.*

L'ensemble de ces altérations conduit à un **stress d'enveloppe** principalement observé par l'augmentation d'abondance de la porine **OprF**, majoritaire chez *P. aeruginosa*.

En plus de son rôle potentiel dans l'**efflux de nitrate** (Yoon *et al.*, 2002) cette porine pourrait ainsi participer à la **stabilisation de la membrane**. L'élaboration d'un mutant de délétion du gène *oprF* est actuellement envisagée afin de prouver son implication dans la stabilisation membranaire. Néanmoins, la régulation de cette porine ne semble pas être médiée par les facteurs de signalisation du stress d'enveloppe décrits chez *P. aeruginosa*, AlgU ou SigX. En revanche, il est intéressant de noter qu'une augmentation de la **production des alginates** est induite par le NO₂ corroborée à des modulations dans la formation du biofilm de *P. fluorescens* MFAF76a (Kondakova *et al.*, 2016). Ces exopolysaccharides pourraient offrir une certaine protection face au stress nitrosant en **limitant la diffusion** des oxydes d'azotes.

Enfin, l'étude du mutant MFAF76a- Δ *oprN* a permis de mettre en évidence l'implication de la pompe à efflux RND MexEF-OprN dans la **stabilisation de la membrane**. Cette porine semble être également impliquée dans la **résistance au stress** nitrosant suggérant ainsi un potentiel rôle dans l'**efflux de NOx** comme évoqué par Fetar et collaborateurs (Fetar *et al.*, 2011).

II. Partie 2 : Un acteur clef dans la détoxification du NO₂ chez *P. fluorescens* MFAF76 : la flavohémoprotéine Hmp

1. Article 3 : Some elements on detoxification pathway in *P. fluorescens* under nitrosative stress

S. Depayras *et al.*, en cours de soumission dans *Frontiers in microbiology*

Contributions : J'ai conçu, réalisé et écrit ce travail avec le Dr Duclairoir-Poc. M. Chautrand a participé à l'étude de l'expression de gènes cibles et à l'écriture de l'article. Mme Souak a participé à l'étude de la perméabilité membranaire par cytométrie en flux. Le Dr Merieau et Mme Bouteiller ont participé à l'élaboration du mutant MFAF76a Δ hmp. L'ensemble des auteurs ont contribué à la relecture critique de cet article.

1.1. Contexte d'étude

L'une des étapes clés dans la lutte contre le stress nitrosant est de **limiter** les potentielles réactions de ces composés avec les espèces réactives de l'oxygène (**ROS**). En effet, une **forte interconnection** existe entre ces deux espèces réactives concernant notamment leurs cibles ainsi que les mécanismes de **détoxification** et de **réponse à ces deux stress**. Ces mécanismes sont principalement régulés par les facteurs transcriptionnels Fur et OxyR, **senseurs** des stress oxydant et nitrosant.

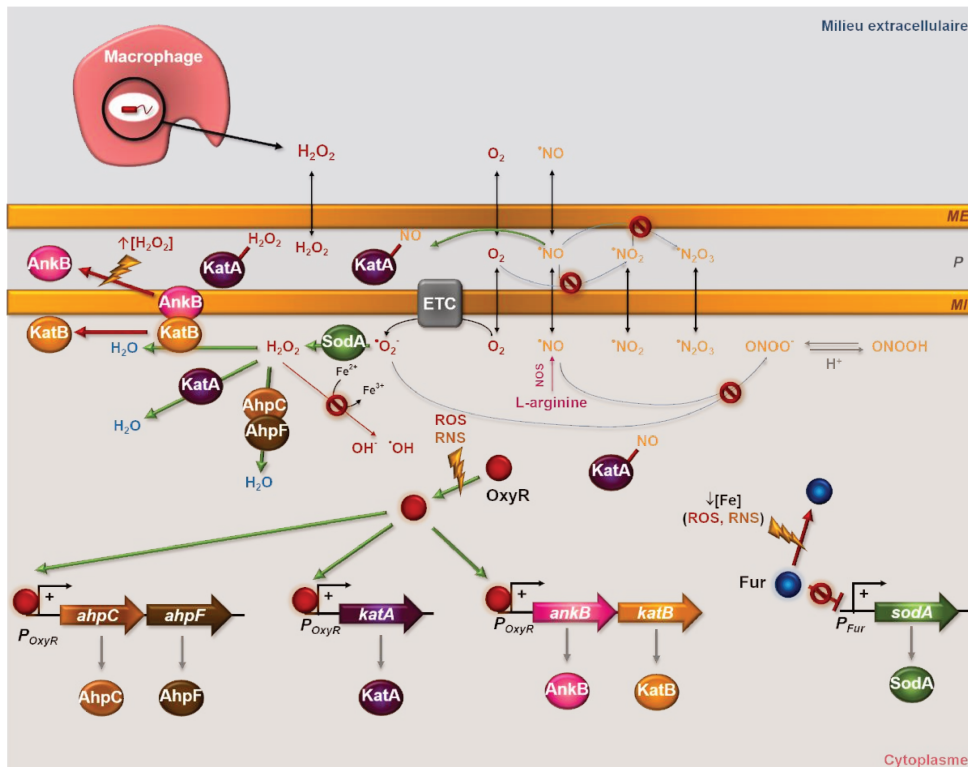


Figure 36 : Récapitulatif des stratégies préventives anti-NOx/ROS chez *P. aeruginosa* (adaptée de (Mishra and Imlay, 2012)).

ETC : chaîne de transfert d'électrons ; KatA, KatB : catalases A et B ; AnkB : ankyrine B ; AhpC, AhpF : alkyl hydroxyperoxydase ; SodA : Mn-superoxyde dismutase ; P_{OxyR} : promoteur inductible par OxyR ; P_{Fur} : promoteur réprimé par Fur, ME : membrane externe ; P : périplasma ; MI : membrane interne ; les

éclaircs représentent le stress oxydant, nitrosant ou la carence en fer ; les protéines illuminées représentent la forme active de la protéine, les symboles de sens interdit correspondent aux réactions chimiques ou enzymatiques inhibées en présence de ces stress.

Cependant, l'un des mécanismes les plus connus dans la détoxification spécifique aux RNS est la **dénitrification**. Néanmoins, peu de souches de *P. fluorescens* démontrent une activité dénitrifiante (Nitrate réductase -). Un autre acteur semble intervenir dans cette détoxification : la **flavohémoprotéine**. Cette protéine est largement décrite chez *E. coli* (Hmp) et également présente chez *P. aeruginosa* (**Fhp**). Hmp démontre une double activité enzymatique en fonction du taux d'oxygène : activité NO réductase (anaérobie) ou NO dioxygénase (aérobie). Ainsi, le but de cette étude a donc été de déterminer si l'ensemble de ces mécanismes, connus pour être impactés par le NO, le sont de manière similaire suite à une exposition au NO₂. Le rôle potentiel de la flavohémoprotéine Hmp dans la protection contre le stress induit par le NO₂ a été également évalué à l'aide d'un mutant de délétion MFAF76a- Δ *hmp* et de son complémenté.

Some elements on detoxification pathway in *P. fluorescens* under nitrosative stress

S. Depayras¹, *et al.*

¹ Laboratory of Microbiology Signals and Microenvironment, LMSM EA 4312, University of Rouen, France

Abstract:

Bacteria are often exposed to nitrosative stress generated by its close environment (pollution or immunity response). However these microorganisms are able to resist thanks to a wide range of sensor activating an arsenal of weapon implicated in stress adaptation and tolerance. Moreover, the nitrosative and oxidative stress are intimately linked through their high inter-reactivity, their common targets within cells (lipids, DNA, proteins) and their similar mode of action. Thus, bacterial ability to survive is fascinating in regards of all applications such as the development of new therapeutics to struggle against several reactive nitrogen species (RNS) and reactive oxygen species (ROS) induced diseases. Moreover, human immunity system is based on an oxidative and nitrosative burst to eradicate bacterial pathogens. Therefore, it seems crucial to understand the molecular mechanisms arisen in this adaptation. Nitric oxide, an important member of RNS, is well-studied for its dual role in physiological signalization and pathogenesis. NO₂ represents the major air pollutant of this family of compounds. However few data are yet available on bacterial response to this pollutant. Here an intriguing link between NO₂ effects and NO signalization is noted in *P. fluorescens* MFAF76a. Indeed, NO₂ exacerbates oxidative stress through OxyR activation, modulates the iron homeostasis thanks to IscR and induces NO detoxification by means of the flavohemoprotein Hmp. Moreover, the deletion of *hmp* highlights the crucial role of this flavohemoprotein in NO₂ tolerance for *P. fluorescens* MFAF76a. Altogether these data strongly suggest a potential non-enzymatic conversion of NO₂ within cells into NO.

Keywords: air pollution, detoxification, repair, signalisation, *P. fluorescens*.

Introduction:

Reactive nitrogen species (RNS) or nitrogen oxide species (NO_x) are derived compounds from the reaction of nitric oxide (NO) with reactive oxygen species (ROS). These chemical reactions form far more toxic derived compounds such as nitrogen dioxide (NO₂), peroxynitrite (ONOO⁻) and nitrous oxide (N₂O₃) (Bartesaghi and Radi, 2018). The anthropogenic activity is the major source of NO and NO₂ emission in the atmosphere (Skalska et al., 2010). Unfortunately, both molecules exhibit high toxicity on human health. Indeed, the ability of NO and NO₂ to passively cross biological membranes allow them to affect physiological processes inside the cells (Lancaster, 1997). Thus, RNS, like ROS, alter several crucial components such as DNA (Burney et al., 1999), lipids (Möller et al., 2007) and proteins (Bartesaghi and Radi, 2018) affecting the cellular physiology. However, this reactivity is widely exploited in various physiological processes like immunity thanks to nitric oxide synthase (NOS) (Bogdan, 2015). Indeed, in macrophages a burst in ROS and RNS production is used to eliminate pathogens such as bacteria (Fang, 2004).

Thus, bacteria are often threatened by RNS from their environment (pollution and host). In order to survive to nitrosative stress, bacteria have to detect and react to the presence of RNS. Several bacterial proteins have been reported to act as RNS sensors (Green et al., 2014). In *P. aeruginosa*, three main sensors are known for their sensitivity to ROS and/or RNS: Anr (Arai, 2011), OxyR (Wei and Ma, 2013) and Fur (Cornelis et al., 2009). These

sensors exploit the ability of ROS and RNS to modify their sensitive active site to modulate the expression of their regulon.

For example, OxyR is a transcription factor possessing a Cys¹⁹⁹ residue which is oxidized or S-nitrosylated by ROS and RNS respectively. This post-translational modification activates OxyR (Seth et al., 2012). In *Pseudomonas aeruginosa*, the activated OxyR induces the transcription of several genes encoding antioxidant enzymes, such as *katA* and *katB* (encoding catalases) and *ahpCF* (encoding alkyl hydroperoxide) (Wei et al., 2012).

The ferric uptake repressor protein (Fur) is a global regulator containing a nonheme iron (Fe²⁺) on its active site (Pasqua et al., 2017). Fur nitrosylation inactivates the protein, leading to relief in repression of various proteins such as antioxidant enzymes (superoxide dismutases (SOD)) or related to iron acquisition (Troxell and Hassan, 2013).

Finally, the transcriptional regulator Anr (arginine deiminase and nitrate reductase) belonging to the FNR/cAMP receptor protein family possesses a particular iron-sulfur cluster (ISC) cofactor (Zimmermann et al., 1991). This ISC is crucial for O₂ sensing and indirect activation of denitrification pathway in *P. aeruginosa* (Arai, 2011). In *E. coli*, ANR-homolog FNR (fumarate and nitrate regulator) is inactivated by NO leading to the derepression of *hmp* (Cruz-Ramos et al., 2002). This flavohemoprotein confers a protection against nitrosative stress. Indeed, *hmp* is crucial for the conversion of NO into nitrates aerobically (Frey et al., 2002).

However, in *P. aeruginosa* the Hmp-homolog, Fhp, is still under investigation (Arai et al., 2005).

For instance, NO induces important modulations in oxidative stress tolerance, as illustrated by OxyR, Fur and Anr examples. Even though, NO and NO₂ belong to the same family of components, their reactivity differ. Yet, no data are available on the potential sensors of NO₂. However, 45ppm of NO₂ severely impairs the viability and the membrane integrity of *P. fluorescens* (Depayras et al., 2018). Thus the aim of this work was to determinate the potential mechanisms implicated in NO₂ perception and detoxification in *P. fluorescens* MFAF76a.

Material and methods:

Bacterial strain and growth conditions

Pseudomonas fluorescens strains and the plasmid used in this study are listed in **Table S1**. Strains were grown overnight in Luria–Bertani (LB) medium broth at 28 °C under limited agitation (180 rpm) supplemented, if necessary with antibiotics. Then cultures were diluted (A580 = 0.08) in Davis Medium Broth (DMB), a minimal medium with 2.16 g/L glucose as carbon source. The incubation was done at 28°C under agitation to reach the stationary growth phase. Bacterial cultures were transferred on cellulose nitrate membrane filters (0.45 µm, pore size 0.2 µm, diameter 47 mm, Sartorius Biolab Products, France) and incubated on DMB agar plates at 28°C for 4 h to obtain a monolayer of bacteria. Then the membranes covered by bacteria were laid on agar one-well dishes (size 127.8. 85.5 mm,

Thermo Scientific Nunc, France), which were directly transferred into the gas delivery device (Kondakova et al., 2016).

Disruption of the hmp gene in *P. fluorescens* MFAF76a

MFAF76aΔ*hmp* was generated by a central deletion (823 bp) in *hmp*. This mutation was achieved by PCR using the Muta1-*hmp* and Muta2-*hmp* (781 bp product) primers or Muta3-*hmp* and Muta4-*hmp* primers (793 bp product) (**Table S2**). The obtained PCR products obtained corresponded to the upstream and downstream parts, respectively, of the *hmp* gene of MFAF76a, each carrying a restriction site for *NdeI* enzyme (NEB). Then, a third PCR step was done using Muta1-*hmp* and Muta4-*hmp* primers to amplify Δ*hmp*. Each PCR was performed in standard conditions, with the Phusion® High-Fidelity DNA polymerase (NEB). The product obtained was inserted into pAKE604 that had been linearized by digestion with *SmaI* and *XbaI* (NEB). The resulting plasmid, pAKE604Δ*hmp*, was verified by sequencing and was then transferred into MFAF76a by biparental mating. *E. coli* S17-1 (Simon et al., 1983) containing pAKE604Δ*hmp* and recipient MFAF76a cells were mixed and spotted onto a LB agar plates and incubated overnight at 37°C. The mating mixture was suspended in 1 mL of sterile physiological water and 0.1 mL aliquots were spread on cetrimide agar plates supplemented with kanamycin (50 µg/mL), to select *Pseudomonas* carrying the modified plasmid without further contamination of *E. coli*. The excision of the suicide plasmid, by a second recombination event, was triggered by plating on LB agar

medium supplemented with 10% sucrose. The mutant containing the early stop codon in the *hmp* gene was verified by DNA sequencing and named MFAF76a- Δhmp .

Complementation of *hmp* in MFAF76a- Δhmp

The *hmp* sequence (KT070325) was amplified with the Comp1-*hmp* and Comp2-*hmp* primers (Table S2) by standard PCR from genomic DNA extract from MFAF76a. The polymerase used was Phusion® High-Fidelity DNA polymerase (NEB). The PCR product was digested with *EcoRI* and *XbaI* (NEB) and ligated into pPSV35 linearized previously by the same enzymes (Rietsch *et al.*, 2005). *E. coli* was transformed with the ligation product and the resulting plasmid was checked by PCR. Fresh MFAF76a colonies were washed twice in cold sterile distilled water and transformed with 5 μ L of plasmid DNA by electroporation in 1 mm cuvette at 1.8 kV (Savant electroporator). LB was then added and the mix incubated for 1 h at 28 °C with shaking (180 rpm). The samples were then plated on LB agar supplemented with gentamycin and with 0.1 mM IPTG.

Exposition to nitrogen dioxide

As previously described by Kondakova *et al.*, an exposure system was developed in order to mimic the environmental exposition (Kondakova *et al.*, 2016). Briefly, the bacterial bed was exposed during 2 h at 28 °C with a constant gas stream of 2 L/min, in two separate exposure chambers. A control was obtained using synthetic air. The NO₂-exposed bacteria were laid in contact with a mixture of N₂/O₂ 8/2

(v/v) complemented with 45 ppm of NO₂ (Air Liquide GMP Europe, France). After exposure, bacteria were resuspended in sterile saline solution.

Cultivability and growth kinetics

Cultivability tests were performed by serial dilution in saline solution from the bacterial suspension to reach dilution of 10⁻⁷. 100 μ L of dilution range 10⁻⁴ to 10⁻⁷ were spotted onto LB agar plates in triplicate for both conditions. After incubation at 28°C for 24 h, viable colony forming unit were numerated. After adjustment of the bacterial concentration of 0.08 at 580nm in DMB, growth kinetics were done for both conditions in triplicate in a 96-well test plate (Nunc™). The bacterial population was evaluated every 30 min by turbidimetry at A580 during 24 h.

Flow cytometry analysis of membrane permeability

After exposure, 1 mL of bacterial suspension was stained for 15 min with SYTO9 (5.01 nM) and propidium iodide (PI, 30 nM) from the Live/Dead BacLight kit (L-7012, Thermofisher). Thence, damaged and total bacteria were respectively observed as PI and SYTO9 positive using flow cytometry (CytoFLEX S, Beckman Coulter) and the CytExpert v1.2 software. PI and SYTO9 were excited at a fixed wavelength of 488 nm and their fluorescence were detected at 690 \pm 50 nm and 525 \pm 40 nm respectively. For each measurement, 10 000 events were collected at a medium flow (30 μ L/min). A negative control for membrane permeability was performed on bacterial culture without exposure. Thus cells were

treated with ethanol 50% for 10 minutes before PI staining to calibrate the PI threshold on the software.

Whole proteome identification and quantification

Bacterial suspension were centrifuge at 13.000 g, 4°C during 20minutes after NO₂ exposure. Then, bacterial pellets were re-suspended in a 20mM Tris-HCl Buffer (pH 7.4) and sonicated. Bacterial lysates were centrifuged (10,000 g; 10 min; 4 °C). The concentration of the protein content was measured using a Bradford test (Biorad™). The separation, identification and the relative abundance of each protein was done as previously described (Clamens et al., 2017). Briefly protein extracts were concentrated on a SDS-PAGE (7%), stained using Coomassie dye, before dehydration of protein bands and trypsin digestion. Finally the identification was done using a LTQ Orbitrap Elite (Thermo Scientific) coupled to an Easy nLC II system (Thermo Scientific). The mobile phase consisted of H₂O/0.1% formic acid (FA) (buffer A) and ACN/FA 0.1% (buffer B). Samples were injected onto an enrichment column (C18 PepMap100, Thermo Scientific) and eluted at a flow rate of 300 nL/min using a three-step linear gradient (from 2 to 40% B over 75 min, from 40 to 80% B in 4 min and 11 min at 80% B). The mass spectrometer was operated in positive ionization mode with capillary voltage and source temperature set at 1.5 kV and 275 °C, respectively. The samples were analyzed using CID (collision induced dissociation) method. Fragmentation occurred in the linear ion trap analyzer with collision energy of 35%. All measurements in the

Orbitrap analyzer were performed with on-the-fly internal recalibration (lock mass) at m/z 445.12002 (polydimethylcyclsiloxane). After MS analysis, raw data were imported in Progenesis LC-MS software (Nonlinear Dynamics). For comparison, one sample was set as a reference and the retention times of all other samples within the experiment were aligned. After alignment and normalization, statistical analysis was performed for one-way analysis of variance (ANOVA) calculations. Peptide features presenting a p-value and a q-value less than 0.05, and a power greater than 0.8 were retained. MS/MS spectra from selected peptides were exported for peptide identification with Mascot (Matrix Science) against the database restricted to *P. fluorescens* (A506 (<http://www.pseudomonas.com>)). Only the proteins which varied by 2-fold in these average normalized abundances between growth conditions were retained.

In silico identification of Fhp and FhpR-homologue

Both *hmp* and *hmpR* genes were annotated using RAST software v2.0. Annotation of *hmp* was confirmed using CDSEasy server (http://db-mml.sjtu.edu.cn/STEP/STEP_CDSeasy.php). The protein sequence homology between *P. aeruginosa* PAO1 *fhp/fhpR* from (PA2664/PA2665) and *hmp/hmpR* (KT070325/MK305863) were performed using tblastx tool on Blast+ standalone software v2.7.1 (NCBI).

Putative 3D protein structure

The putative 3D Hmp structure was performed using RaptorX software (<http://raptorx.uchicago.edu/>).

Quantitative real-timePCR

Total RNA was prepared by the hot acid-phenol method (Bouffartigues et al., 2012) from NO₂-exposed and unexposed bacteria. Residual DNAs were eliminated by acid phenol treatment. The absence of DNA was confirmed by showing that PCR reactions failed without prior cDNA synthesis. RNAs were nonspecifically converted to single stranded cDNAs using the High Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems). Synthesis of cDNAs and real time PCR, allowing the quantification of mRNAs of interest were performed as previously described (Gicquel et al., 2013) using primers listed in **Table S3**. The relative quantification of the mRNAs was obtained by the comparative CT ($2^{-\Delta\Delta CT}$) method as described (Guyard-Nicodème et al., 2008). Measurement of *recA* gene was used as an internal standard. Significances of differences between mean values were assessed using the t-test with significance set at $p < 0.05$ (*), < 0.01 (**), and < 0.001 (***).

Statistical analysis

All experiments were carried out at least three times. Significances of differences between mean values were assessed using the Mann-Whitney test with significance set at $p < 0.05$ (*), < 0.01 (**), < 0.001 (***) and < 0.0001 (****).

Results

The nitrosative stress represents a big threat for the cellular physiology and is tightly correlated with reactive oxygen species. Indeed, NO could, by interacting with ROS, lead to the formation of several sub-species of RNS such as peroxynitrite and nitrous oxide. Intriguingly, in *P. aeruginosa*, NO could also interact with OxyR, a transcriptional factor mainly dedicated to combat oxidative stress. However no information is yet available concerning the potential impact of NO₂ on such detoxifying pathway. Thus, the expression level of several OxyR-dependent enzymes was investigated. As depicted in **Figure 1**, two OxyR-dependent alkyl-hydroperoxidases, *ahpC* and *ahpF*, are significantly over-expressed with fold changes (FCs) of 9.8 and 12.9 relative to the control.

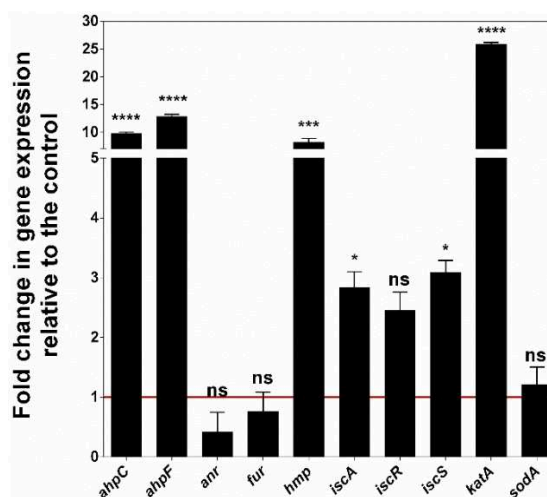


Figure 1 : Expression level of representative genes under the control of oxygen/nitric oxide sensors (OxyR, Anr and Fur). ns : not significant ; * : $p < 0.05$; ** : $p < 0.01$; *** : $p < 0.001$; **** : $p < 0.0001$; (N=4).

Moreover *katA* exhibits a highly significant FC of 25.8. The expression of *katA* could also be modulated by the transcriptional

regulator ANR (FNR-homolog) in *P. aeruginosa*. However, the expression level of *anr* tends to decrease but not significantly (FC=0.4)

Since most of these enzymes are involved in the detoxification of superoxide anion into water, we also investigated the expression of other proteins acting upstream of AhpCF and KatA. However, the expression level of the manganese-superoxide dismutase A (*sodA*) known to be repressed by the ferric uptake regulator (Fur) is slightly but not significantly increased (FC=1.2). Moreover *fur* expression is slightly diminished, but not significantly (FC=0.8). Interestingly, *iscA*, *iscR* and *iscS*, representing three members of the iron-sulphur cluster (ISC), are over-expressed with FCs of 2.8, 2.5, and 3.1 respectively. Since *P. fluorescens* MFAF76a lacks gene arsenal involved in denitrification pathway (data not shown), nitrosative stress could be critical for this strain. However, as demonstrated in previous study, MFAF76a possesses an *hmp-homolog* gene (Kondakova et al., 2016), encoding a flavohemoprotein in *E. coli* that could also counteract the nitrosative stress. Indeed, *hmp* gene is over-expressed after NO₂ exposure (FC=8.2). Even though the regulation of the expression of *hmp-homolog* gene is not yet known in MFAF76a, its genetic environment is highly similar to the one of *P. aeruginosa* PAO1. Indeed, *hmp* presents similar sequence length of 1182 nucleotides as *fhp* in PAO1 (Figure 2A). An upstream gene, named in this study *hmpR*, of 1560 nt is present in the opposite direction such as the *fhp* regulator FhpR in PAO1. Both genes are spaced by a 165nt intergenic region (IR).

Moreover the protein sequence of *hmp* shares 70% of homology with Fhp with a coverage of 100% (Figure 2B). *HmpR* share 74% of homology with a coverage of 96% compared to PAO1 FhpR. Finally, the putative 3D structure of Hmp exhibits three domains with high homology compared to the well-known *E. coli* Hmp: (i) a NAD-binding domain, (ii) a FAD-binding domain, and (iii) a globin domain (Figure 2C).

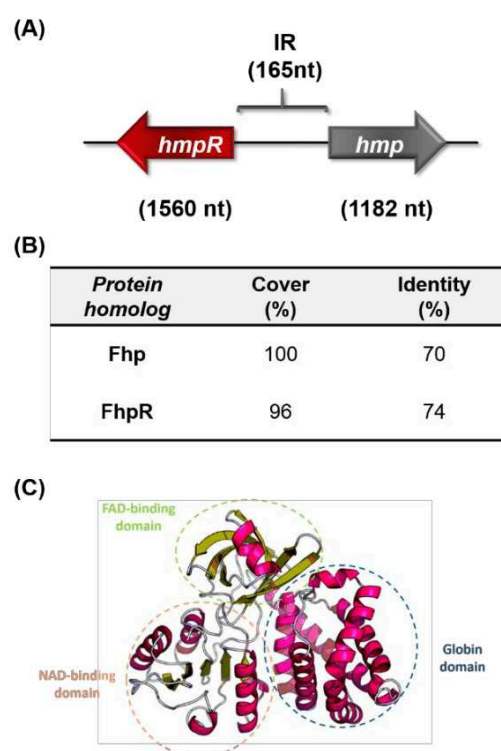


Figure 2 : In silico study of Hmp in *P. fluorescens* MFAF76a strain. (A) Genetic environment of *hmp*. (B) Protein sequence homology with PAO1 *fhp* and *fhpR* genes. (C) Putative 3D Hmp structure. *hmpR*: putative *hmp* regulator ; *hmp* : putative flavohemoprotein ; IR : intergenic region.

These transcriptomic data should be seen in light of a whole proteome study. Such analysis leads to observe modulation of proteins involved in (i) ROS/RNS sensing and signal transduction, (ii) ROS detoxification, (iii) and protein structuration such as iron sulfur cluster and haem biosynthesis or thiol repair. Indeed, Anr transcriptional factor, able to sense ROS

and/or RNS, is 3.4 fold over-produced but Fur is under-produced with a FC of 4.3 (Figure 3, Table S4).

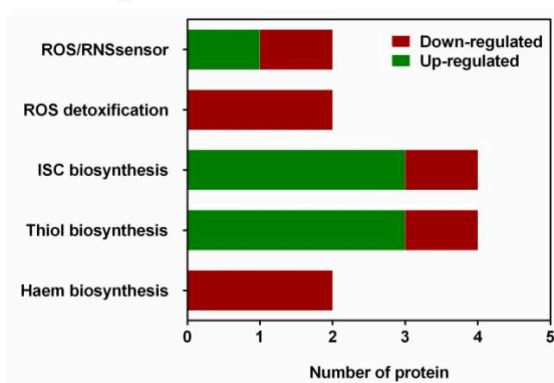


Figure 3 : Proteomic profile of *P. fluorescens* MFAF76a after NO₂ exposure. ROS/RNS: reactive oxygen/nitrogen species; ISC: iron-sulphur cluster. The identification of proteins was performed using *P. fluorescens* A506 as reference (N=4).

Two ROS-detoxifying enzymes, AhpC and the catalase KatE, are under-produced with FCs of 3.4 and 7.8. After exposure to NO₂, a global increase in protein involved functional prosthetic iron sulfur cluster biosynthesis is noted. Indeed IscA, IscR and HscA are over-produced with respective FCs of 2.4, 2.4 and 4.8. Astonishingly, IscS, a member of this pathway, is significantly 3.1 fold under-produced. Moreover, HemX and HemY involved in haem biosynthesis, another metal related prosthetic group, are under-produced. Finally, protein involved in thiol oxidative damage repair, Grx, TrxA and Tpx are significantly 7.2, 8 and 3.7 fold over-produced respectively.

To investigate the potential role of Hmp in RNS tolerance in MFAF76a non-denitrifying strain, the survival of a MFAF76a *hmp* mutant strain was monitored after NO₂ exposure. As previously described, an exposure to 45ppm of NO₂ leads to a significant decrease in cultivability. Once again a reduction of 57% of

the total population was observed in comparison with the control (Figure 4).

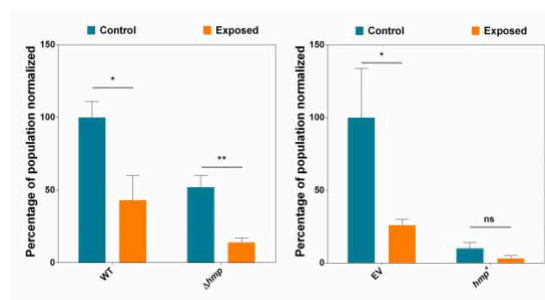


Figure 4: Impact of *hmp*-deletion on the cultivability of MFAF76a. Data were normalized with the internal control of each condition *i.e.* WT control (1.7×10^8 UFC/mL) or EV Control (3.2×10^8 UFC/mL) respectively on the left or right panel. WT : MFAF76a wild-type ; Δhmp : MFAF76a carrying a central deletion on *hmp* ; EV : MFAF76a containing the empty vector pPSV35 ; hmp^+ : Complemented MFAF76a- Δhmp strain containing the vector pPSV35-*hmp*⁺ ; Control : exposed sample with synthetic air ; Exposed : exposed sample to 45ppm of NO₂ (N=4).

This decrease is significantly exacerbated in the *hmp* mutant (73%). Interestingly, MFAF76a- Δhmp exhibits an important decrease in the population under the control condition compared to the wild-type strain (48%). MFAF76a-EV exhibits a significant decrease of 74% in cultivability after exposure, unlike the complemented strain MFAF76a-*hmp*⁺ (73%). This absence of significance could be explained by the high dispersion in data which are in part due to the selective pressure exerted by Gentamycin, an inhibitor in protein synthesis.

Then, the growth ability of MFAF76a- Δhmp was evaluated after NO₂ exposure. The lag phase increases of 15 and 20 minutes and an increase of 120 and 240 minutes is observed in the generation time, respectively for the WT and the Δhmp strains after exposure. For both strains (EV an *hmp*⁺), the lag phase increases of 26 minutes after exposure. Concerning the generation time, an increase of 120 and 150

minutes is observed, respectively for the EV and the *hmp*⁺ strains (Figure 5).

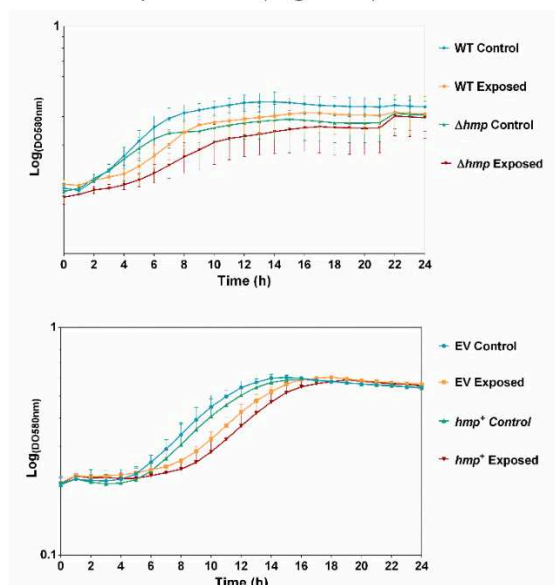


Figure 5 : Impact of *hmp*-deletion on the growth of MFAF76a. Upper graph: growth kinetics of *hmp* mutant strain. Lower graph: growth kinetics of *hmp* complemented strain. WT : MFAF76a wild-type ; Δhmp : MFAF76a carrying a central deletion on *hmp* ; EV : MFAF76a containing the empty vector pPSV35 ; *hmp*⁺ : Complemented MFAF76a- Δhmp strain containing the vector pPSV35-*hmp*⁺ ; Control : exposed sample with synthetic air ; Exposed : exposed sample to 45ppm of NO₂ (N=4).

Since the membrane permeability is increased after NO₂ exposure (Depayras et al., 2018), it was quantified to evaluate the potential protective role of *hmp* on the envelope. After exposure to NO₂, an increase of 51% and 57% in membrane permeability (dead + permeabilised) is observed respectively for the WT and Δhmp strains (Figure 6).

Concerning the EV and *hmp*⁺ strains, the membrane permeability increases of 53% and 54% respectively.

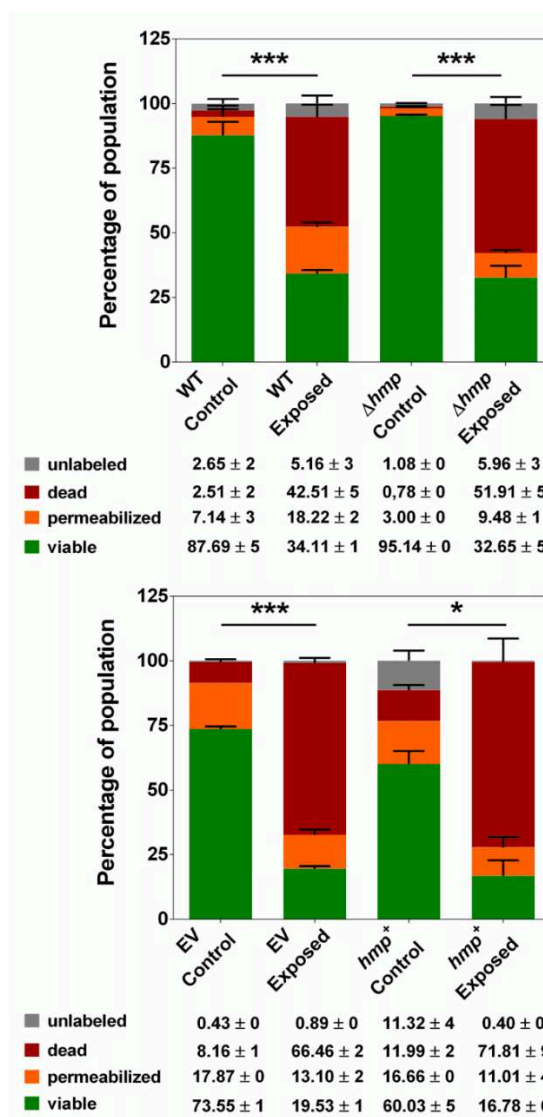


Figure 6: Impact of *hmp*-deletion on the membrane permeability of MFAF76a. Upper part: membrane permeability of *hmp* mutant strain. Lower part: membrane permeability of *hmp* complemented strain. WT : MFAF76a wild-type ; Δhmp : MFAF76a carrying a central deletion on *hmp* ; EV : MFAF76a containing the empty vector pPSV35 ; *hmp*⁺ : Complemented MFAF76a- Δhmp strain containing the vector pPSV35-*hmp*⁺ ; Control : exposed sample with synthetic air ; Exposed : exposed sample to 45ppm of NO₂ (N=4).

Discussion

RNS, along with ROS, exhibits a high reactivity on various biological molecules such as DNA, lipids and proteins (Bartesaghi and Radi, 2018). However, bacteria are often exposed to both families of species. One most relevant case is the inflammatory reaction exerted after

pathogenic development within host cells leading to a burst in RNS and ROS production by macrophages cell line (Nathan and Shiloh, 2000). Yet, bacteria are able to tolerate and adapt to ROS/RNS stress using a well-engineered and tightly regulated pathway of detoxification coupled with repair mechanisms. Indeed, the basis of these stress responses lays on the presence of several intracellular sensors able to transduce a signal through their transcriptional regulator activity. In *P. aeruginosa* most sensors exhibit a particular active site, mainly composed of sensitive thiol residues (OxyR), or metal centers such as iron-sulfur clusters (Anr, Fur, IscR) or haem (H-NOX). Thus, those active sites are highly sensitive to ROS and/or RNS. For instance, OxyR is activated by NO and induces the transcription of genes encoding detoxifying enzymes such as AhpC/F alkyl-hydroperoxidase and the KatA/B catalases in *P. aeruginosa* (Wei and Ma, 2013). In this study, alkyl-hydroxyperoxidases are overexpressed, suggesting that NO₂, itself or through its by-products, could activate OxyR. However, the abundance of protein AhpC is reduced after exposure. Since AhpC contains cysteins on its active site, it is probable that NO₂ or derived compounds could inactivate AhpC by protein S-nitrosylation (Stamler et al., 2001). This post-translational modification could alter the protein folding leading to aberrant AhpC. Then the misfolded protein AhpC could be further degraded by the quality control proteasome system (Becker and Darwin, 2017).

P. aeruginosa possesses three types of catalase: KatA and KatB, inducible by H₂O₂

through OxyR, and KatE which is highly conserved (Ochsner et al., 2000). However, in *P. aeruginosa* only Kat A is critical for the detoxification of H₂O₂ and also for virulence (Lee et al., 2005). Moreover, a second role of KatA has been proposed in NO buffering (Su et al., 2014).

After NO₂ exposure, *katA* is significantly over-expressed. *katA* expression is also induced in absence of O₂ by the Anr protein, containing a 4Fe-4S cluster (Chung et al., 2016). While the expression of *anr* is not modified after NO₂ exposure, Anr protein is significantly over-produced. NO, like O₂, was proposed to react with the ISC of Anr leading to dimers dissociation and subsequent Anr inactivation (Yoon et al., 2007). The augmentation of the protein quantity of Anr could be due to its dissociation following the nitrosative stress. However, it is not known if NO₂ is able to interact with the ISC of Anr itself or through related species. Thus those data strongly suggest that NO₂ modulates the ROS detoxifying pathway mainly through OxyR activation. Unfortunately, no data were available on KatA production after exposure. Moreover, the catalase KatE, also responsible for the conversion of toxic H₂O₂ in H₂O, is diminished. Whole previously described data suggest that the exposure to NO₂ could lead an oxidative burst due to the accumulation of H₂O₂ following the reduction of AhpC and KatE proteins abundance. An increase in H₂O₂ could thereby exacerbate ROS stress through peroxyde homolysis following Fenton reaction leading to drastic damages (Winterbourn, 1995).

Finally, during an oxidative stress or intracellular iron depletion, Fur, a transcriptional repressor containing an ISC active site, is inactivated (Cruz-Ramos et al., 2002). Moreover, NO could have similar inactivation effect on Fur. Thus after NO₂ exposure, *fur* expression is not significantly modulated. However it is interesting to note a significant decrease of Fur protein. This reduction could mimic the inactivation of Fur and relieved the repression exerted on the Fur iron-related regulon (Porcheron and Dozois, 2015; Troxell and Hassan, 2013). The main Fur target in *P. aeruginosa* is the well-known Manganese containing superoxide dismutase A (SodA). This enzyme detoxifies superoxide anion (O₂^{•-}) into H₂O₂ under oxydative stress (Hasset et al., 1995). In this study, *sodA* tends to be over-expressed but not significantly. Unfortunately no data were found concerning the SodA abundance after NO₂ exposure. Thus it is not possible to conclude if NO₂ induces an accumulation of O₂^{•-} nor H₂O₂ indirectly.

An intriguing link exists between iron and RNS. Indeed, in *E. coli*, Fur represses the non-coding RhyB mRNA, under physiological conditions, thus leading to the expression of the *isc* operon responsible for the ISC biosynthesis (Masse et al., 2005). Under ROS/RNS stress or iron depletion, Fur is inactive and RhyB represses *isc* expression. However, in *P. aeruginosa* the indirect regulation of *isc* by Fur has not been reported yet. Indeed, RhyB analogs, PrrF1 and 2, are found to regulate the expression of proteins dedicated to iron homeostasis (Wilderman et al., 2004). In this study, *isc* operon was not found to be regulated by PrrF1 nor PrrF2 highlighting a different regulatory

mechanism. Interestingly, under NO₂ exposure, members of the *isc* operon: *iscRSA* are overexpressed. The protein abundances of associate proteins IscR, IscU and HscA are also over-produced suggesting an increase in iron-sulfur biosynthesis. In *E. coli*, IscR usually represses the transcription of *isc* operon under physiological conditions. However, IscR contains a 4Fe-4S cluster sensitive to RNS and ROS which is essential for its repressor activity. Thus, an exposure to NO₂ could promote an increase in ISC biosynthesis. However, IscS is significantly under-produced. IscS possesses a cysteine residue (Cys²³⁸) on its active site critical for its sulphur-transfer activity (Smith et al., 2005). Thus; similarly to AhpC, IscS could endorse a post-translational modification through S-nitrosylation leading to the degradation of the misfolded protein. Decrease in IscS protein quantity implies a diminution in transfer of sulphur to the nascent ISC which impairs further step formation of ISC. Finally, heme biosynthesis could be impaired after NO₂ exposure. Indeed, HemX (PA5258) and HemY (PA5257) proteins responsible for the formation of protoporphyrin IX ring are decreased. In *P. aeruginosa*, pPrrF1/2 induces the expression of a non-coding PrrH mRNA, known to regulate heme homeostasis (Reinhart and Oglesby-Sherrouse, 2016). Yet, no information is available on the potential regulation of HemX/Y protein.

Last but not least, several thiol-containing proteins are sensitive to ROS/RNS stress. Thus, the thiol-reparation appears to be an essential process in oxidative and nitrosative stress tolerance. In this study, a significant over-production of thioredoxin (TrxA) and thiol

peroxidase (Tpx) is observed. Together these proteins catalyse the reduction of H₂O₂ or organic peroxides into water or alcohol (Somprasong et al., 2012). In *P. aeruginosa*, the regulation of *tpx* and *trx*A expression is ROS-dependent, but is mediated differentially by OxyR (Wei et al., 2012) and IscR (Somprasong et al., 2012) respectively. GrxA, a glutaredoxin OxyR-dependent, is also over-produced after NO₂ exposure (Wei et al., 2012). GrxA, coupled with the glutathione-S transferase, repairs protein containing an altered thiol-residue following oxydative stress (Aslund et al., 1994). Finally, *hmp*-homologue, encoding a flavohemoprotein, is significantly over-expressed after NO₂ exposure. Interestingly, Hmp shares protein sequence homology with Fhp gene. Moreover the upstream genes of *hmp* exhibit the same antisens configuration as *fhpR* and also shares significant homology in protein sequence with FhpR. These data suggest a potential role of HmpR in the regulation of *hmp* expression, like FhpR on *fhp* (Koskenkorva-Frank and Kallio, 2009). Moreover, in *P. aeruginosa*, *fhp* and *fhpR* are induced by ROS (Koskenkorva-Frank and Kallio, 2009). The putative 3D structure of Hmp highlights the presence of three highly conserved domains as previously described in *E. coli* (Ilari et al., 2002). Hmp is able to detoxify NO into NO₃⁻ under aerobic conditions (Gardner et al., 1998). Thus, Hmp in *P. fluorescens* could detoxify NO. To evaluate the potential role of this flavohemoprotein in NO₂ tolerance, the cultivability and growth of an *hmp* mutant were monitored. After NO₂ exposure, *hmp* mutant exhibits a significant reduction in cultivability and an increase in

generation time. Both parameters highlight a significant decrease in bacterial viability that of the wild-type strain. Since membrane permeability increases under the same conditions (Depayras et al., 2018), the integrity of bacterial envelope was tested through flow-cytometry. The membrane permeability is not significantly exacerbated in the mutant compared to the wild-type. Thus, Hmp does not protect *P. fluorescens* MFAF76a from the NO₂-induced parietal stress.

Conclusion

After NO₂ exposure several genes implicated mainly in ROS detoxification are over-expressed (*katA*, *soda*, *ahpCF*). However most of the encoding protein are decreased suggesting a potential accumulation of ROS (H₂O₂ or O₂^{*}). OxyR appears to be the central sensor involved in this response. The activation of OxyR by NO is well-known however the potential reaction with NO₂ is not documented yet. Moreover, the iron metabolism is modulated by NO₂ certainly through IscR protein. Here again, IscR is inactivated by NO but there is no link established between NO₂ and IscR inactivation. A lot of proteins containing particular active site sensitive to NO are also altered following NO₂ exposure (AhpC, Fur, IscS). Another intriguing relation between NO₂ exposure and NO known mechanism is the over-expression of *hmp* encoding the flavohemoprotein implicated in NO detoxification. Thus, these data strongly suggest that NO₂ could (i) be converted into NO within cells and (ii) induce or exacerbate oxidative stress. The hypothesis of NO₂ conversion is supported by the reactivity of

gaseous NO₂ in liquid water leading to the formation of nitrate and NO even if its parameter dependent (Lee and Schwartz, 1981). Indeed, since cells are constituted of water, NO₂, after diffusion across the membrane, could form NO inside the cells and lead to NO well-described damage and response.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was conceived by S.D. and C.D.P. The study was done by S.D and T.C. We are grateful to D.S., helping with cytometry, O.M. and R.D. for their help with transcriptomic assays, M.B. and A.M. for their support in mutagenesis assays and finally Y.K. and J.H. for her collaboration in proteomic study. This manuscript was written by S.D, T.C and C.D.P. We would like to thank M.G.J. and N.O. for critical reading of the manuscript. This study was supported by a PhD grant from the GRR SESA (Region Normandie) and was financially supported by the European Union (FEDER), "Région Normandie" and "Evreux Porte de Normandie" (France).

REFERENCES

- Arai, H. (2011). Regulation and Function of Versatile Aerobic and Anaerobic Respiratory Metabolism in *Pseudomonas aeruginosa*. *Front. Microbiol.* *2*, 103.
- Arai, H., Hayashi, M., Kuroi, A., Ishii, M., and Igarashi, Y. (2005). Transcriptional regulation of the flavohemoglobin gene for aerobic nitric oxide detoxification by the second nitric oxide-responsive regulator of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* *187*, 3960–3968.
- Aslund, F., Ehn, B., Miranda-Vizuete, A., Pueyo, C., and Holmgren, A. (1994). Two additional glutaredoxins exist in *Escherichia coli*: glutaredoxin 3 is a hydrogen donor for ribonucleotide reductase in a thioredoxin/glutaredoxin 1 double mutant. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *91*, 9813–9817.
- Bartesaghi, S., and Radi, R. (2018). Fundamentals on the biochemistry of peroxynitrite and protein tyrosine nitration. *Redox Biol.* *14*, 618–625.
- Becker, S.H., and Darwin, K.H. (2017). Bacterial Proteasomes: Mechanistic and Functional Insights. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* *81*.
- Bogdan, C. (2015). Nitric oxide synthase in innate and adaptive immunity: An update. *Trends Immunol.* *36*, 161–178.
- Bouffartigues, E., Gicquel, G., Bazire, A., Bains, M., Maillot, O., Vieillard, J., Feuilloley, M.G.J., Orange, N., Hancock, R.E.W., Dufour, A., et al. (2012). Transcription of the *oprF* Gene of *Pseudomonas aeruginosa* Is Dependent Mainly on the SigX Sigma Factor and Is Sucrose Induced. *J. Bacteriol.* *194*, 4301–4311.
- Burney, S., Caulfield, J.L., Niles, J.C., Wishnok, J.S., and Tannenbaum, S.R. (1999). The chemistry of DNA damage from nitric oxide and peroxynitrite. *Mutat. Res.* *424*, 37–49.
- Chung, I.-Y., Kim, B., Jang, H.-J., and Cho, Y.-H. (2016). Dual promoters of the major catalase (*KatA*) govern distinct survival strategies of *Pseudomonas aeruginosa*. *Sci. Rep.* *6*, 31185.

- Clamens, T., Rosay, T., Crépin, A., Grandjean, T., Kentache, T., Hardouin, J., Bortolotti, P., Neidig, A., Mooij, M., Hillion, M., et al. (2017). The aliphatic amidase AmiE is involved in regulation of *Pseudomonas aeruginosa* virulence. *Sci. Rep.* 7, 1–16.
- Cornelis, P., Matthijs, S., and Van Oeffelen, L. (2009). Iron uptake regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Biometals* 22, 15–22.
- Cruz-Ramos, H., Crack, J., Wu, G., Hughes, M.N., Scott, C., Thomson, A.J., Green, J., and Poole, R.K. (2002). NO sensing by FNR: regulation of the *Escherichia coli* NO-detoxifying flavohaemoglobin, Hmp. *EMBO J.* 21, 3235–3244.
- Depayras, S., Kondakova, T., Merlet-Machour, N., Heipieper, H.J., Barreau, M., Catovic, C., Feuilloy, M., Orange, N., and Duclairoir-Poc, C. (2018). Impact of gaseous NO₂ on *P. fluorescens* strain in the membrane adaptation and virulence. *Int. J. Environ. Impacts Manag. Mitig. Recover.* 1, 183–192.
- Fang, F.C. (2004). Antimicrobial reactive oxygen and nitrogen species: concepts and controversies. *Nat. Rev. Microbiol.* 2, 820–832.
- Frey, A.D., Farrés, J., Bollinger, C.J.T., and Kallio, P.T. (2002). Bacterial hemoglobins and flavohemoglobins for alleviation of nitrosative stress in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 4835–4840.
- Gardner, P.R., Gardner, A.M., Martin, L.A., and Salzman, A.L. (1998). Nitric oxide dioxygenase: an enzymic function for flavohemoglobin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 10378–10383.
- Gicquel, G., Bouffartigues, E., Bains, M., Oxaran, V., Rosay, T., Lesouhaitier, O., Connil, N., Bazire, A., Maillot, O., Bénard, M., et al. (2013). The Extra-Cytoplasmic Function Sigma Factor SigX Modulates Biofilm and Virulence-Related Properties in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS One* 8, e80407.
- Green, J., Rolfe, M.D., and Smith, L.J. (2014). Transcriptional regulation of bacterial virulence gene expression by molecular oxygen and nitric oxide. *Virulence* 5, 794–809.
- Guyard-Nicodème, M., Bazire, A., Hémerly, G., Meylheuc, T., Mollé, D., Orange, N., Fito-Boncompte, L., Feuilloy, M., Haras, D., Dufour, A., et al. (2008). Outer membrane Modifications of *Pseudomonas fluorescens* MF37 in Response to Hyperosmolarity. *J. Proteome Res.* 7, 1218–1225.
- Hassett, D.J., Schweizer, H.P., and Ohman, D.E. (1995). *Pseudomonas aeruginosa* sodA and sodB mutants defective in manganese- and iron-cofactored superoxide dismutase activity demonstrate the importance of the iron-cofactored form in aerobic metabolism. *J. Bacteriol.* 177, 6330–6337.
- Ilari, A., Bonamore, A., Farina, A., Johnson, K.A., and Boffi, A. (2002). The X-ray Structure of Ferric *Escherichia coli* Flavohemoglobin Reveals an Unexpected Geometry of the Distal Heme Pocket. *J. Biol. Chem.* 277, 23725–23732.
- Kondakova, T., Catovic, C., Barreau, M., Nusser, M., Brenner-Weiss, G., Chevalier, S., Dionnet, F., Orange, N., and Duclairoir-Poc, C. (2016). Response to gaseous NO₂ air pollutant of *P. fluorescens* airborne strain MFAF76a and

- clinical strain MFN1032. *Front. Microbiol.* 7, 4533–4544.
- Koskenkorva-Frank, T.S., and Kallio, P.T. (2009). Induction of *Pseudomonas aeruginosa* *fhp* and *fhpR* by reactive oxygen species. *Can. J. Microbiol.* 55, 657–663.
- Lancaster, J.R. (1997). A Tutorial on the Diffusibility and Reactivity of Free Nitric Oxide. *Nitric Oxide* 1, 18–30.
- Lee, Y.-N., and Schwartz, S.E. (1981). Evaluation of the rate of uptake of nitrogen dioxide by atmospheric and surface liquid water. *J. Geophys. Res.* 86, 11971.
- Lee, J.-S., Heo, Y.-J., Lee, J.K., and Cho, Y.-H. (2005). KatA, the major catalase, is critical for osmoprotection and virulence in *Pseudomonas aeruginosa* PA14. *Infect. Immun.* 73, 4399–4403.
- Masse, E., Vanderpool, C.K., and Gottesman, S. (2005). Effect of RyhB Small RNA on Global Iron Use in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 187, 6962–6971.
- Möller, M.N., Li, Q., Lancaster, J.R., and Denicola, A. (2007). Acceleration of nitric oxide autoxidation and nitrosation by membranes. *IUBMB Life* 59, 243–248.
- Nathan, C., and Shiloh, M.U. (2000). Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens. *Pnas* 97, 8841–8848.
- Ochsner, U.A., Vasil, M.L., Alsabbagh, E., Parvatiyar, K., and Hasset, D.J. (2000). Role of the *Pseudomonas aeruginosa* oxyR-recG operon in oxidative stress defense and DNA repair: OxyR-dependent regulation of katB-ankB, ahpB, and ahpC-ahpF. *J. Bacteriol.* 182, 4533–4544.
- Pasqua, M., Visaggio, D., Lo Sciuto, A., Genah, S., Banin, E., Visca, P., and Imperi, F. (2017). Ferric Uptake Regulator Fur Is Conditionally Essential in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 199.
- Porcheron, G., and Dozois, C.M. (2015). Interplay between iron homeostasis and virulence: Fur and RyhB as major regulators of bacterial pathogenicity. *Vet. Microbiol.* 179, 2–14.
- Reinhart, A., and Oglesby-Sherrouse, A. (2016). Regulation of *Pseudomonas aeruginosa* Virulence by Distinct Iron Sources. *Genes (Basel)*. 7, 126.
- Seth, D., Hausladen, A., Wang, Y.-J., and Stamler, J.S. (2012). Endogenous Protein S-Nitrosylation in *E. coli*: Regulation by OxyR. *Science (80-.)*. 336, 470–473.
- Simon, R., Priefer, U., and Pühler, A. (1983). A Broad Host Range Mobilization System for In Vivo Genetic Engineering: Transposon Mutagenesis in Gram Negative Bacteria. *Bio/Technology* 1, 784–791.
- Skalska, K., Miller, J.S., and Ledakowicz, S. (2010). Trends in NO_x abatement: A review. *Sci. Total Environ.* 408, 3976–3989.
- Smith, A.D., Frazzon, J., Dean, D.R., and Johnson, M.K. (2005). Role of conserved cysteines in mediating sulfur transfer from IscS to IscU. *FEBS Lett.* 579, 5236–5240.
- Somprasong, N., Jittawuttipoka, T., Duangnkern, J., Romsang, A., Chaiyen, P., Schweizer, H.P., Vattanaviboon, P., and Mongkolsuk, S. (2012). *Pseudomonas*

- aeruginosa Thiol Peroxidase Protects against Hydrogen Peroxide Toxicity and Displays Atypical Patterns of Gene Regulation. *J. Bacteriol.* *194*, 3904–3912.
- Stamler, J.S., Lamas, S., and Fang, F.C. (2001). Nitrosylation. the prototypic redox-based signaling mechanism. *Cell* *106*, 675–683.
- Su, S., Panmanee, W., Wilson, J.J., Mahtani, H.K., Li, Q., VanderWielen, B.D., Makris, T.M., Rogers, M., McDaniel, C., Lipscomb, J.D., et al. (2014). Catalase (KatA) Plays a Role in Protection against Anaerobic Nitric Oxide in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS One* *9*, e91813.
- Troxell, B., and Hassan, H.M. (2013). Transcriptional regulation by Ferric Uptake Regulator (Fur) in pathogenic bacteria. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* *3*, 59.
- Wei, Q., and Ma, L. (2013). Biofilm Matrix and Its Regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Int. J. Mol. Sci.* *14*, 20983–21005.
- Wei, Q., Le Minh, P.N., Dötsch, A., Hildebrand, F., Panmanee, W., Elfarash, A., Schulz, S., Plaisance, S., Charlier, D., Hassett, D., et al. (2012). Global regulation of gene expression by OxyR in an important human opportunistic pathogen. *Nucleic Acids Res.* *40*, 4320–4333.
- Wilderman, P.J., Sowa, N.A., FitzGerald, D.J., FitzGerald, P.C., Gottesman, S., Ochsner, U.A., and Vasil, M.L. (2004). Identification of tandem duplicate regulatory small RNAs in *Pseudomonas aeruginosa* involved in iron homeostasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 9792–9797.
- Winterbourn, C.C. (1995). Toxicity of iron and hydrogen peroxide: the Fenton reaction. *Toxicol. Lett.* *82–83*, 969–974.
- Yoon, S.S., Karabulut, A.C., Lipscomb, J.D., Hennigan, R.F., Lyman, S. V, Groce, S.L., Herr, A.B., Howell, M.L., Kiley, P.J., Schurr, M.J., et al. (2007). Two-pronged survival strategy for the major cystic fibrosis pathogen, *Pseudomonas aeruginosa*, lacking the capacity to degrade nitric oxide during anaerobic respiration. *EMBO J.* *26*, 3662–3672.
- Zimmermann, A., Reimann, C., Galimand, M., and Haas, D. (1991). Anaerobic growth and cyanide synthesis of *Pseudomonas aeruginosa* depend on *anr*, a regulatory gene homologous with *fnr* of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* *5*, 1483–1490.

SUPPLEMENTARY DATA

Table S1 : Strains and plasmid used in this study

Strains/plasmids	Relevant phenotype/genotype	Reference
<i>P. fluorescens</i>		
MFAF76a	Airborne isolate, able to grow at 37°C	Morin <i>et al.</i> , 2013
MFAF76a-EV	MFAF76a transformed with pPSV35 empty vector, Gm ^R	This study
MFAF76a-Δ <i>hmp</i>	MFAF76a with a central deletion of <i>hmp</i> (823 bp)	This study
MFAF76a- <i>hmp</i> [*]	MFAF76aΔ <i>hmp</i> transformed with pPSV35 vector carrying a WT copy of <i>hmp</i> , Gm ^R	This study
<i>E. coli</i>		
S17.1	RP4-2-Tc::Mu, <i>aph</i> ::Tn7, <i>recA</i> , SmR, donor strain for conjugation	Simon and Pehle, 1983
Vectors		
pAKE604	Ap ^R , Km ^R , oriT, <i>lacZ</i> , <i>sacB</i> , conjugative suicide vector for <i>oprN</i> gene mutagenesis; Km ^R , <i>sacB</i>	El-Sayed <i>et al.</i> , 2001
pPSV35	<i>P. aeruginosa</i> oriV, <i>lacIq</i> mob+, PlacUV5, pUC18 MCS, expression vector, Gm ^R	Rietsch <i>et al.</i> , 2005

Table S2: List of primers used for the mutation of *oprN* in MFAF76a

Primer name	Primer sequence (5'→3')
Primers used for <i>hmp</i> gene disruption in MFAF76a	
<i>Muta1-hmp</i>	CATCGACGAATAAAGGACAG
<i>Muta2-hmp</i>	TAATAACATATGATGATTTTGGCCACCA
<i>Muta3-hmp</i>	TAATAACATATGCTATTGCTATGCCGAAGAAG
<i>Muta4-hmp</i>	TAATAATCTAGACGGCAGATCATCGACAAT
Primers used for the complementation of <i>hmp</i> in MFAF76a-Δ<i>hmp</i>	
<i>Comp1-hmp</i>	TAATAAGAATTCAGTCACCTTATGCTTAGCG
<i>Comp2-hmp</i>	TAATAATCTAGATTGCCTTTCCTTTGTAAGTC

Table 3 : Oligonucleotides used in this study for RT-qPCR

Primer name	Accession number	Forward primer sequence (5'→3')	Reverse primer sequence (5'→3')
<i>ahpC</i>	MK305853	GCCTATCATCAACAGCCAAGTAAA	AGCATCCGAGACTTGAACGAA
<i>ahpF</i>	MK305854	CGAACACCGATTGGCTGAA	ATCCCCGCAATCGAAGTCT
<i>anr</i>	MK305855	CAGTTGATGCGGGTGATGAG	CGACAGCAGCAGCATCATTT
<i>fur</i>	MK305856	CCTGCCACGGGTCAAGAT	GCTTCCATCAACGCCTGTAG
<i>hmp</i>	KT070325	AAACCGCGATCTATGACCAG	GCTTCATGCCGATGTACTGA
<i>iscA</i>	MK305857	ACGAGGTAGTGGCGGAAGATC	TCGGTGCCTGCCAGGTA
<i>iscR</i>	MK305858	CATCTCCCTGTCTACCTCGAA	ACCGCGAACGCTGGAA
<i>iscS</i>	MK305859	AATTGCCGATTTACCTTGATTACTCT	GACCAGCAGGCATTCACTCA
<i>katA</i>	MK305860	CAAGCGGCGGCTCATTA	CGATCAACGGAACTCCTTCTG
<i>recA</i>	MH937724	ATCGCCCATACGCATTACG	CGGCCCTGGGTCAGATC
<i>sodA</i>	MK305861	ATGCCTACGATGCCCTTGAG	GATGCTTGGTGAATGGATTTC

Tableau S1 : Remodeling of FA metabolism and associated compounds proteomic profile. grey cases: fold change lesser than 2.

Metabolic pathway	Accession	Protein	Description	Anova (p)		Fold change
Sensor	PfIA506_3874	Anr	transcriptional regulator Anr	5.4 x 10 ⁻³	**	+ 3.4
	PfIA506_4567	Fur	ferric uptake regulation protein	1.1 x 10 ⁻²	*	- 4.3
ROS detoxification	PfIA506_2735	AhpC	alkyl hydroperoxide reductase subunit C	9.4 x 10 ⁻⁴	***	- 3.4
	PfIA506_0070	KatE	catalase HP11	1.0 x 10 ⁻²	*	- 7.8
Iron-sulphur cluster biosynthesis	PfIA506_4375	IscS	cysteine desulfurase IscS	3.2 x 10 ⁻⁴	***	- 3.1
	PfIA506_4374	IscU	FeS cluster assembly scaffold IscU	4.0 x 10 ⁻³	**	+ 2.4
	PfIA506_4376	IscR	iron-sulfur cluster assembly transcription factor IscR	7.6 x 10 ⁻⁴	***	+ 2.4
	PfIA506_4371	HscA	Fe-S protein assembly chaperone HscA	3.3 x 10 ⁻⁴	***	+ 4.8
Thiol repair	PfIA506_1116	Grx	monothiol glutaredoxin	1.4 x 10 ⁻²	*	+ 7.2
	PfIA506_5190	TrxA	thioredoxin	5.5 x 10 ⁻³	**	+ 8.0
	PfIA506_2948	Tpx	thiol peroxidase	8.9 x 10 ⁻⁶	****	+ 3.7
Haem biosynthesis	PfIA506_5216	HemX	HemX protein	1.4 x 10 ⁻³	**	- 2.4
	PfIA506_5217	HemY	HemY protein	3.4 x 10 ⁻³	**	- 1.4

1.2. Conclusions générales et perspectives

Cette étude a permis de conforter un grand nombre d'hypothèses concernant les mécanismes potentiellement modulés lors de l'exposition de *P. fluorescens* MFAF76a au NO₂.

- Tout comme le NO, l'un des principaux senseurs et médiateurs dans la réponse au stress nitrosant semble être **OxyR**. En effet, des gènes impliqués dans la **réponse au stress oxydant**, et dont l'expression est dépendante de ce facteur, sont sur-exprimées (*ahpC*, *ahpF*, *katA*).
- **Anr**, senseur du taux d'oxygène et principal responsable dans l'activation du processus de dénitrification chez *P. aeruginosa*, ne semble pas intervenir dans ces mécanismes de perception et régulation.
- En revanche **IscR**, facteur de transcription sensible au NO et régulant la synthèse et la réparation des ISC, pourrait intervenir dans la réponse au NO₂.
- La protéine **Fur est diminuée** en présence de NO₂ conduisant à la surexpression de *sodA*, enzyme intervenant dans la détoxification des ROS. De plus, Fur régule indirectement le métabolisme du Fer.
- Enfin, la flavohémoprotéine de *P. fluorescens* MFAF76a présente des **similitudes dans son environnement génique** avec Fhp chez *P. aeruginosa* ainsi qu'une **structure 3D** de la protéine très **conservée** par rapport à Hmp chez *E. coli*. À la suite d'une exposition au NO₂, cette flavohémoprotéine est largement sur-exprimée. De plus, la délétion de *hmp* chez *P. fluorescens* MFAF76a, a permis de démontrer son importance dans la **résistance à ce stress nitrosant**. Néanmoins son implication dans la détoxification du NO₂ n'a encore jamais été abordée.

L'observation de ces nombreuses **similitudes entre le NO et le NO₂** a donc conduit à suspecter une éventuelle **conversion du NO₂** en présence de molécules d'eau intracellulaires engendrant le NO et HNO₃ comme décrit précédemment (Lee and Schwartz, 1981). Le NO serait par la suite détoxifié en partie par la flavohémoprotéine Hmp. Ainsi, cette étude a permis de proposer le mécanisme hypothétique de la réponse de *P. fluorescens* MFAF76a à l'issue d'une exposition au NO₂ (**Figure 37**).

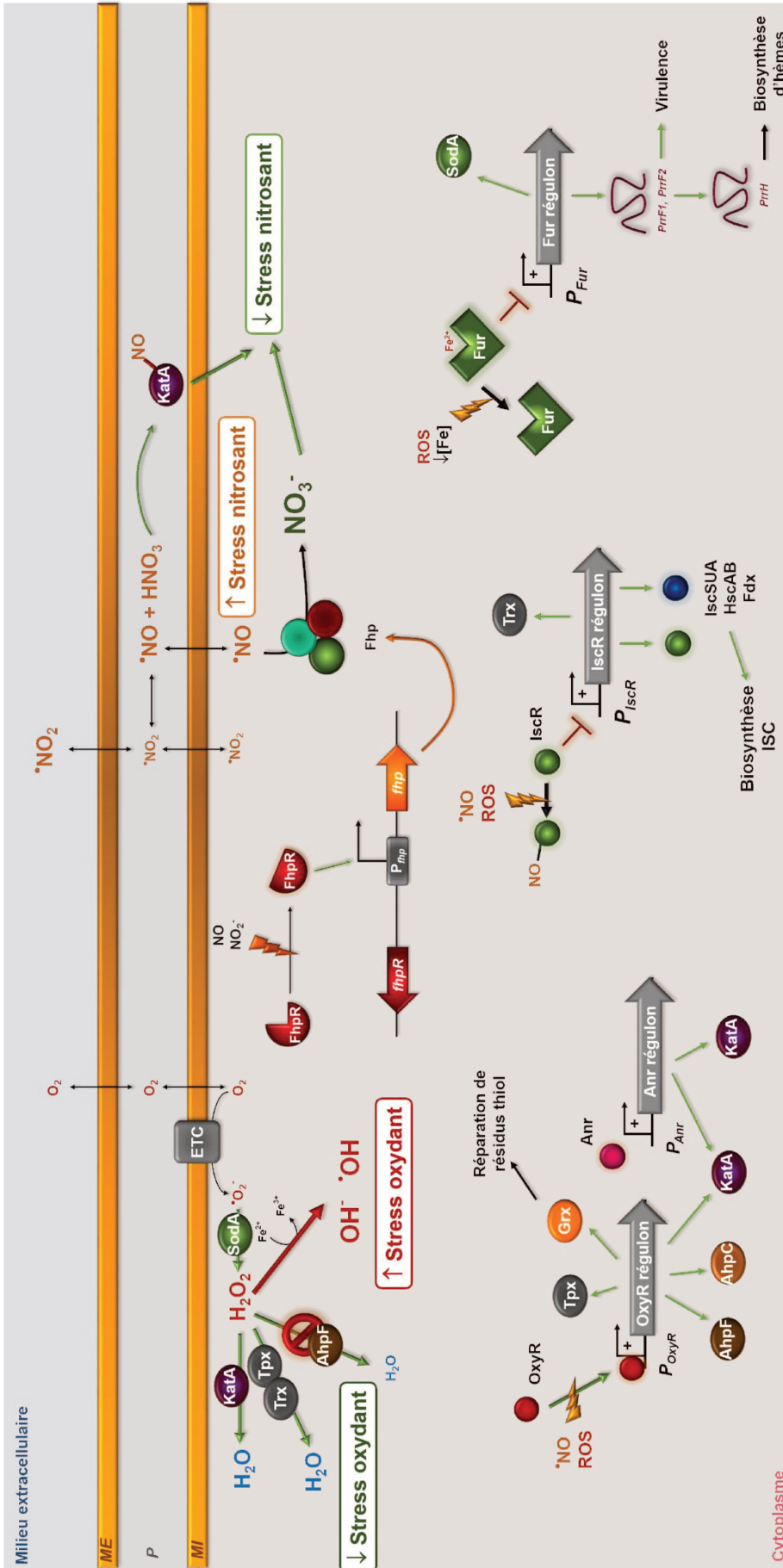


Figure 37 : Représentation hypothétique des mécanismes modulés en réponse à une exposition au NO₂ chez *P. fluorescens* MFAF76a.

ETC : chaîne de transfert d'électrons ; KatA, KatB : catalases A et B ; AnkB : ankyrine B ; AhpC, AhpF : alkyl hydroxyperoxydase ; SodA : Mn-superoxyde dismutase ; P_{OxyR} : promoteur inducible par OxyR ; P_{OxyR} : promoteur réprimé par Fur ; P_{Fur} : promoteur de *fhp* inducible par FhpR ; ME : membrane externe ; P : périplasmique ; MI : membrane interne ; les éclairs représentent le stress oxydant, nitrosant ou la carence en fer ; les protéines illuminées représentent la forme active de la protéine, les symboles de sens interdit correspondent aux réactions chimiques ou enzymatiques inhibées en présence de ces stress.

Discussion générale

L'ensemble de ce travail a permis de démontrer que le NO₂ induit un stress d'enveloppe. En effet la perte d'un glycerophospholide minoritaire encore inconnu (**UGP**) concomitante aux nombreuses modulations de la synthèse de différents constituants de l'enveloppe (LPS, acides gras, GP, peptidoglycane) conduirait à une augmentation non négligeable de la **perméabilisation** membranaire. En réponse à ce stress d'enveloppe, un ensemble de protéines sont sur-régulées telles que **OprF**, porine majoritaire dans la membrane externe de *P. aeruginosa* (Chevalier *et al.*, 2017) ou encore le complexe protéique constituant la pompe à efflux RND, **MexEF-OprN**. Ces protéines seraient impliquées dans la **stabilisation** de l'enveloppe bactérienne via leur encombrement stérique lors de leur insertion dans celle-ci. De plus, un rôle secondaire de ces protéines dans la détoxification des RNS est proposé. En effet, OprF permet l'efflux de nitrates (Yoon *et al.*, 2002) en parallèle d'un potentiel **efflux de NOx** médié par MexEF-OprN (Fetar *et al.*, 2011). Néanmoins les mécanismes de régulation d'OprF et de MexEF-OprN sont encore abstraits et nécessitent de plus amples recherches. Toutefois, la pompe à efflux présente un rôle crucial dans la stabilisation de l'enveloppe comme démontré par l'exacerbation de la perméabilisation membranaire chez un mutant MFAF76a- $\Delta oprN$. Il est intéressant de noter qu'une exposition au NO conduit à d'importants changements morphologiques au niveau de l'enveloppe de *P. aeruginosa*. Désormais l'étude d'un mutant de délétion *P. fluorescens* MFAF76a- $\Delta oprF$ est actuellement envisagée pour confirmer l'implication d'OprF dans la stabilisation de l'enveloppe bactérienne en réponse à une exposition au NO₂.

Ce stress pariétal semble également conduire à une augmentation de la production d'**alginates**. En effet, une sur-expression du gène *algD*, codant pour une protéine essentielle à la synthèse des alginates, est observée. Ces observations sont corrélées avec d'importants changements dans la structuration du **biofilm** (Kondakova *et al.*, 2016). Ainsi les alginates, uniques EPS synthétisés chez *P. fluorescens* contrairement à *P. aeruginosa*, pourraient offrir une **barrière** dans la diffusion des NOx au sein du biofilm.

Ainsi (i) les modulations dans la synthèse d'alginates, (ii) l'augmentation importante d'antibiorésistance médiée par MexEF-OprN et (iii) l'augmentation du recyclage du peptidoglycane, constituant d'importants facteurs de la **virulence** bactérienne. Le NO₂ pourrait ainsi augmenter la virulence de *P. fluorescens* MFAF76a.

En parallèle, une forte diminution de la cultivabilité et de la croissance bactérienne à l'issue d'une exposition à 45 ppm de NO₂ est observée. Ces résultats suggèrent que le NO₂ aurait un effet (i) **bactériostatique** (apparition de VBNC) et/ou (ii) **bactériocide**. Ainsi, les mécanismes

impliqués dans la **détoxification** des RNS ont été abordés. Une intime connexion entre ROS et RNS a pu être constatée au cours de cette étude. En effet, l'un des médiateurs globaux dans la réponse au stress oxydant semble être activé à l'issue de l'exposition au NO₂. Cette observation semble être confirmée par l'induction de nombreuses protéines dont l'expression est **OxyR dépendante** telles que les alkyl hydroperoxydases AhpC/F, la catalase KatA, la thiorédoxine peroxydase Tpx et la glutathion réductase Grx. De plus, l'ensemble de ces enzymes interviennent dans la détoxification des ROS et la réparation des altérations protéiques (résidus thiol, Grx). En parallèle, **IscR**, un important régulateur négatif dans la synthèse de cofacteurs prosthétiques de nombreuses enzymes (clusters fer-soufre), semble être inactivé en présence de NO₂. L'inactivation d'IscR conduit à l'expression de l'opéron *isc*, mais également la thiorédoxine réductase Trx. En revanche, deux facteurs de régulation importants chez *P. aeruginosa* pour l'induction de la dénitrification (Anr) et dans la capture du fer (Fur) ne semblent pas être impliqués dans cette réponse et pourraient même être dégradés à l'issue de ce stress.

Ainsi, le NO₂ semble induire une réponse similaire à un stress oxydant pouvant amplifier ce stress. Puisque l'espèce *P. fluorescens* est très hétérogène et que certaines souches possèdent des enzymes impliquées dans la dénitrification (*P. fluorescens* F113), une étude *in silico* de la présence de gènes la régulant a été réalisée (communication personnelle). Cette étude a permis de confirmer l'**absence** de gènes pouvant agir dans la **dénitrification**. Toutefois *P. fluorescens* MFAF76a possède une **flavohémoprotéine Hmp** similaire structurellement à celle largement décrite chez *E. coli*. De plus, l'environnement génique de Hmp est homologue à celui décrit pour Fhp chez *P. aeruginosa* PAO1 suggérant des mécanismes de régulation similaires (FhpR). Enfin, l'étude d'un mutant MFAF76a- Δ *hmp* a confirmé le rôle crucial de cette flavohémoprotéine dans la **détoxification des RNS**. Toutefois, cette enzyme est connue pour détoxifier le NO en nitrates, mais aucune information n'est disponible concernant la détoxification du NO₂. De plus, la catalase **KatA** présenterait un rôle dans le « **masquage** » du NO (Su *et al.*, 2014). Ainsi KatA semble également jouer un rôle dans le masquage du NO₂ qui pourrait être confirmé à l'aide d'un mutant MFAF76a- Δ *katA* couplé à un marquage des NOx.

Ainsi l'ensemble de ces travaux a soulevé une question majeure concernant l'étonnante connexion entre les effets observés en présence de NO₂ et ceux attribués dans la littérature au NO : **ces effets observés sont-ils liés au NO₂ directement ou le NO₂ est-il converti en NO pour conduire à ces importantes modifications ?**

Par conséquent, l'hypothèse suivante a été formulée : le NO₂ en pénétrant par diffusion simple dans la cellule, pourrait être **converti**, de manière non enzymatique en acide nitrique (HNO₃)

et **NO** en présence d'eau (Lee and Schwartz, 1981). Afin de confirmer cette conjecture, un **marquage** du NO et d'un important dérivé hautement cytotoxique (ONOO⁻) est actuellement en cours d'étude (Barraud *et al.*, 2006).

Enfin, les données protéomiques encore succinctement exploitées semblent révéler des altérations du **métabolisme énergétique** (TCA, phosphorylation oxydative, synthèse de BCAA) chez *P. fluorescens* MFAF76a après exposition au NO₂. De telles altérations suggèrent une activité principalement **bactériostatique** du NO₂ bien que cela reste à prouver.

Conclusion

Une exposition à 45 ppm de NO₂ induit une forte diminution de la viabilité cellulaire et de la croissance bactérienne chez *P. fluorescens* MFAF76a. Hmp joue un rôle majeur dans la résistance au stress nitrosant. De plus, le NO₂ induit une réponse au stress oxydant médiée par OxyR. Néanmoins, le NO₂ semble inactiver par des modifications post-traductionnelles un grand nombre de protéines impliquées dans la détoxification des ROS à l'origine de l'amplification du stress oxydant (accumulation d'anion O₂^{•-} et de H₂O₂, réaction de Fenton). Ainsi le NO₂, tout comme le NO, présente une intime connection avec le stress oxydant. Par ailleurs, la catalase KatA, majoritaire chez *P. aeruginosa*, pourrait participer à la détoxification du NO₂ ou dérivés via le « masquage » des NOx. Actuellement, l'implication de KatA dans ce mécanisme est à confirmer notamment via l'étude d'un mutant MFAF76a- Δ katA. Enfin les mécanismes de régulation de la protéine Hmp sont également à confirmer (HmpR).

En parallèle, le NO₂ conduit à une perméabilisation membranaire à l'origine d'un stress d'enveloppe chez *P. fluorescens* MFAF76a. En effet, de nombreux constituants essentiels à la structuration de l'enveloppe voient leur synthèse modulée par le NO₂ (LPS, peptidoglycane, acides gras). Ce stress d'enveloppe pourrait être limité via l'insertion de protéines associées à cette enveloppe, telles que la porine OprF, porine majoritaire chez *P. aeruginosa*, ainsi que la pompe à efflux RND MexEF-OprN. Bien que, les mécanismes de régulation de cette pompe nécessitent de plus amples recherches (mutation de MexT, MexS, MvaT et/ou CmrA), cette pompe joue un rôle essentiel dans la stabilisation de l'enveloppe bactérienne. Toutefois l'implication de la porine OprF dans ce phénomène est à confirmer, notamment via l'étude d'un mutant - Δ oprF. De plus, MexEF-OprN et OprF participerait à la détoxification des NOx.

Enfin l'exposition au NO₂ module la production de nombreux éléments intervenant dans la virulence de *P. fluorescens* MFAF76a tels que (i) la production d'alginate, favorisant la formation du biofilm et la protection des bactéries au NOx, (ii) la synthèse accrue de LPS, ainsi que (iii) l'antibiorésistance médiée par la pompe à efflux MexEF-OprN couplée au recyclage augmenté du peptidoglycane.

Pour conclure, les similitudes dans les mécanismes précédemment décrits suite à l'exposition au NO₂ et ceux attribués au NO suggèrent fortement que ces effets sont liés indirectement au NO₂. En effet, après diffusion passive au sein de l'enveloppe, le NO₂ pourrait être converti en NO à l'origine de l'ensemble de ces effets délétères.

Actuellement un grand nombre d'études a prouvé le rôle antibactérien du NO sur un large groupe de microorganismes antibio-résistants, tels que *P. aeruginosa*, représentant une réelle menace dans le domaine hospitalier (maladies nosocomiales, mucoviscidose, infections

de plaies). Désormais l'application d'un pré-traitement au NO gazeux est en cours d'essai afin de sensibiliser des germes pathogènes à un traitement antibioque (Deppisch *et al.*, 2016; Miller *et al.*, 2009). Néanmoins, le NO présente une très forte réactivité avec de nombreux composants cellulaire (protéines, lipides) avant même d'accéder au cytoplasme. Ainsi, le NO₂ pourrait présenter un réel intérêt pour optimiser l'effet du NO. En effet, ce dernier pourrait pénétrer directement dans la cellule avant d'être transformé en NO et excercer ainsi un effet délétère plus localisé. Toutefois une exposition à 45 ppm de NO₂ est également pathogène chez l'Homme et conduit à des effets irréversibles en santé humaine. Ainsi il est crucial de déterminer une concentration et une méthodologie d'exposition permettant de limiter les effets sur l'Homme, tout en gardant un effet antibactérien. Une autre application de ce travail est la découverte de nombreux procédés bactériens impliqués dans le « masquage » ou la détoxification indirecte du NO₂ pouvant conduire à une éventuelle thérapie génique afin d'améliorer, par exemple, les conditions de vie dans des zones fortement polluées.

Références

- Aires, J.R., Köhler, T., Nikaido, H., and Plésiat, P. (1999). Involvement of an active efflux system in the natural resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to aminoglycosides. *Antimicrob. Agents Chemother.* *43*, 2624–2628.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Walter, P. (2002). *Molecular Biology of the Cell* (New York).
- Alghamdi, M.A., Shamy, M., Redal, M.A., Khoder, M., Awad, A.H., and Elserougy, S. (2014). Microorganisms associated particulate matter: A preliminary study. *Sci. Total Environ.* *479–480*, 109–116.
- Alqarni, B., Colley, B., Klebensberger, J., McDougald, D., and Rice, S.A. (2016). Expression stability of 13 housekeeping genes during carbon starvation of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Microbiol. Methods* *127*, 182–187.
- Alvarez, B., and Radi, R. (2003). Peroxynitrite reactivity with amino acids and proteins. *Amino Acids* *25*, 295–311.
- Anzai, Y., Kim, H., Park, J.Y., Wakabayashi, H., and Oyaizu, H. (2000). Phylogenetic affiliation of the pseudomonads based on 16S rRNA sequence. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* *50*, 1563–1589.
- Appanna, V.P., Auger, C., Thomas, S.C., and Omri, A. (2014). Fumarate metabolism and ATP production in *Pseudomonas fluorescens* exposed to nitrosative stress. *Antonie Van Leeuwenhoek Int. J. Gen. Mol. Microbiol.* *106*, 431–438.
- Arai, H. (2011). Regulation and function of versatile aerobic and anaerobic respiratory metabolism in *Pseudomonas aeruginosa*. *Front. Microbiol.* *2*, 1–13.
- Arai, H., Mizutani, M., and Igarashi, Y. (2003). Transcriptional regulation of the nos genes for nitrous oxide reductase in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* *149*, 29–36.
- Arai, H., Hayashi, M., Kuroi, A., Ishii, M., and Igarashi, Y. (2005). Transcriptional regulation of the flavohemoglobin gene for aerobic nitric oxide detoxification by the second nitric oxide-responsive regulator of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* *187*, 3960–3968.
- Archibald, A.T., Folberth, G., Wade, D.C., and Scott, D. (2017). A world avoided: impacts of changes in anthropogenic emissions on the burden and effects of air pollutants in Europe and North America. *Faraday Discuss.* *200*, 475–500.
- Arenas, F.A., Díaz, W.A., Leal, C.A., Pérez-Donoso, J.M., Imlay, J.A., and Vásquez, C.C. (2010). The *Escherichia coli* btuE gene, encodes a glutathione peroxidase that is induced under oxidative stress conditions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *398*, 690–694.
- Askeland, R.A., and Morrison, S.M. (1983). Cyanide production by *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Environ. Microbiol.* *45*, 1802–1807.
- Aslund, F., Ehn, B., Miranda-Vizuete, A., Pueyo, C., and Holmgren, A. (1994). Two additional glutaredoxins exist in *Escherichia coli*: glutaredoxin 3 is a hydrogen donor for ribonucleotide reductase in a thioredoxin/glutaredoxin 1 double mutant. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *91*, 9813–9817.
- Auger, C., and Appanna, V.D. (2015). A novel ATP-generating machinery to counter nitrosative stress is mediated by substrate-level phosphorylation. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* *1850*, 43–50.
- Auger, C., Lemire, J., Cecchini, D., Bignucolo, A., and Appanna, V.D. (2011). The metabolic reprogramming evoked by nitrosative stress triggers the anaerobic

- utilization of citrate in *Pseudomonas fluorescens*. *PLoS One* 6, e28469.
- Ayala-Castro, C., Saini, A., and Outten, F.W. (2008). Fe-S Cluster Assembly Pathways in Bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 72, 110–125.
- Baker, P.R.S., Schopfer, F.J., O'Donnell, V.B., and Freeman, B.A. (2009). Convergence of nitric oxide and lipid signaling: anti-inflammatory nitro-fatty acids. *Free Radic. Biol. Med.* 46, 989–1003.
- Balasubramanian, D., Schnepfer, L., Merighi, M., Smith, R., Narasimhan, G., Lory, S., and Mathee, K. (2012). The regulatory repertoire of *Pseudomonas aeruginosa* AmpC β -lactamase regulator AmpR includes virulence genes. *PLoS One* 7, e34067.
- Balazy, M., Kaminski, P.M., Mao, K., Tan, J., and Wolin, M.S. (1998). S-Nitroglutathione, a product of the reaction between peroxynitrite and glutathione that generates nitric oxide. *J. Biol. Chem.* 273, 32009–32015.
- Barraud, N., Hassett, D.J., Hwang, S.-H., Rice, S.A., Kjelleberg, S., and Webb, J.S. (2006). Involvement of Nitric Oxide in Biofilm Dispersal of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 188, 7344–7353.
- Barraud, N., Storey, M. V., Moore, Z.P., Webb, J.S., Rice, S. a., and Kjelleberg, S. (2009). Nitric oxide-mediated dispersal in single- and multi-species biofilms of clinically and industrially relevant microorganisms. *Microb. Biotechnol.* 2, 370–378.
- Barraud, N., Kelso, M.J., Rice, S.A., and Kjelleberg, S. (2015). Nitric oxide: a key mediator of biofilm dispersal with applications in infectious diseases. *Curr. Pharm. Des.* 21, 31–42.
- Bartesaghi, S., and Radi, R. (2018). Fundamentals on the biochemistry of peroxynitrite and protein tyrosine nitration. *Redox Biol.* 14, 618–625.
- Bartesaghi, S., Ferrer-Sueta, G., Peluffo, G., Valez, V., Zhang, H., Kalyanaraman, B., and Radi, R. (2007). Protein tyrosine nitration in hydrophilic and hydrophobic environments. *Amino Acids* 32, 501–515.
- Bartesaghi, S., Romero, N., and Radi, R. (2011). Nitric oxide and derived oxidants. In *Principles of Free Radical Biomedicine.*, pp. 43–74.
- Bartesaghi, S., Herrera, D., Martinez, D.M., Petruk, A., Demicheli, V., Trujillo, M., Martí, M.A., Estrín, D.A., and Radi, R. (2017). Tyrosine oxidation and nitration in transmembrane peptides is connected to lipid peroxidation. *Arch. Biochem. Biophys.* 622, 9–25.
- Becker, K.W., and Skaar, E.P. (2014). Metal limitation and toxicity at the interface between host and pathogen. *FEMS Microbiol. Rev.* 38, 1235–1249.
- Benhar, M., Forrester, M.T., and Stamler, J.S. (2009). Protein denitrosylation: Enzymatic mechanisms and cellular functions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10, 721–732.
- Berg, J.M., Tymoczko, J.L., and Stryer, L. (2002). Metabolism Consist of Highly Interconnected Pathways.
- Bhamra, I., Compagnone-Post, P., O'Neil, I.A., Iwanejko, L.A., Bates, A.D., and Cosstick, R. (2012). Base-pairing preferences, physicochemical properties and mutational behaviour of the DNA lesion 8-nitroguanine. *Nucleic Acids Res.* 40, 11126–11138.
- Bhuwan, M., Lees, H.J., Pengs, H.L., and Chang, H.Y. (2012). Histidine-containing phosphotransfer protein-B (HptB) regulates swarming motility through partner-switching system in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 strain. *J. Biol. Chem.* 287, 1903–1914.
- Bianco, P.R., Tracy, R.B., and Kowalczykowski, S.C. (1998). DNA strand exchange proteins: a biochemical and physical comparison. *Front. Biosci. J. Virtual Libr.* 3, D570-603.

- Bienert, G.P., and Chaumont, F. (2014). Aquaporin-facilitated transmembrane diffusion of hydrogen peroxide. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* *1840*, 1596–1604.
- Bienert, G.P., Schjoerring, J.K., and Jahn, T.P. (2006). Membrane transport of hydrogen peroxide. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* *1758*, 994–1003.
- Bienert, G.P., Møller, A.L.B., Kristiansen, K.A., Schulz, A., Møller, I.M., Schjoerring, J.K., and Jahn, T.P. (2007). Specific Aquaporins Facilitate the Diffusion of Hydrogen Peroxide across Membranes. *J. Biol. Chem.* *282*, 1183–1192.
- Blair, J.M., Parmelee, R.W., and Beare, M.H. (1990). Decay rates, nitrogen fluxes, and decomposer communities of single- and mixed-species foliar litter. *Ecology* *71*, 1976–1985.
- Blehert, D.S., Fox, B.G., and Chambliss, G.H. (1999). Cloning and sequence analysis of two *Pseudomonas* flavoprotein xenobiotic reductases. *J. Bacteriol.* *181*, 6254–6263.
- Bligh, E.G., Dyer, W.J., E, B., and Dyer, W.J. (1959). a Rapid Method of Total Lipid Extraction and Purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* *37*, 911–917.
- Blough, N. V., and Zafiriou, O.C. (1985). Reaction of superoxide with nitric oxide to form peroxynitrite in alkaline aqueous solution. *Inorg. Chem.* *24*, 3502–3504.
- Bodilis, J., Nsague-Meilo, S., Besaury, L., and Quillet, L. (2012). Variable copy number, intra-genomic heterogeneities and lateral transfers of the 16S rRNA gene in *Pseudomonas*. *PLoS ONE* *7*, e35647.
- Bogdan, C. (2015). Nitric oxide synthase in innate and adaptive immunity: An update. *Trends Immunol.* *36*, 161–178.
- Boichu, M., Oppenheimer, C., Roberts, T.J., Tsanev, V., and Kyle, P.R. (2011). On bromine, nitrogen oxides and ozone depletion in the tropospheric plume of Erebus volcano (Antarctica). *Atmos. Environ.* *45*, 3856–3866.
- Bonamore, A., and Boffi, A. (2008). Flavohemoglobin: Structure and reactivity. *IUBMB Life* *60*, 19–28.
- Bonini, M.G., and Augusto, O. (2001). Carbon dioxide stimulates the production of thiyl, sulfinyl, and disulfide radical anion from thiol oxidation by peroxynitrite. *J. Biol. Chem.* *276*, 9749–9754.
- Bordi, C., Lamy, M.C., Ventre, I., Termine, E., Hachani, A., Fillet, S., Roche, B., Bleves, S., Méjean, V., Lazdunski, A., et al. (2010). Regulatory RNAs and the HptB/RetS signalling pathways fine-tune *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. *Mol. Microbiol.* *76*, 1427–1443.
- Borrero-de Acuña, J.M., Timmis, K.N., Jahn, M., and Jahn, D. (2017). Protein complex formation during denitrification by *Pseudomonas aeruginosa*. *Microb. Biotechnol.* *10*, 1523–1534.
- Bos, R., Van Der Mei, H.C., and Busscher, H.J. (1999). Physico-chemistry of initial microbial adhesive interactions - Its mechanisms and methods for study. *FEMS Microbiol. Rev.* *23*, 179–229.
- Botti, H., Trostchansky, A., Batthyány, C., and Rubbo, H. (2005). Reactivity of Peroxynitrite and Nitric Oxide with LDL. *IUBMB Life Int. Union Biochem. Mol. Biol. Life* *57*, 407–412.
- Brencic, A., and Lory, S. (2009). Determination of the regulon and identification of novel mRNA targets of *Pseudomonas aeruginosa* RsmA. *Mol. Microbiol.* *72*, 612–632.
- Brenner, D.J., Krieg, N.R., Staley, J.T., and Garrity, G.M. (2005). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (New-York: Springer).
- Brown, S.M., Howell, M.L., Vasil, M.L., Anderson, A.J., and Hassett, D.J. (1995). Cloning and characterization of the katB gene of *Pseudomonas aeruginosa* encoding a hydrogen peroxide-inducible

- catalase: purification of KatB, cellular localization, and demonstration that it is essential for optimal resistance to hydrogen peroxide. *J. Bacteriol.* *177*, 6536–6544.
- Brüggemann, T.C., and Keil, F.J. (2008). Theoretical Investigation of the Mechanism of the Selective Catalytic Reduction of Nitric Oxide with Ammonia on H-Form Zeolites. *J. Phys. Chem. C* *112*, 17378–17387.
- Brunori, M., and Rotilio, G. (1984). [2] Biochemistry of Oxygen Radical Species. *Methods Enzymol.* *105*, 22–35.
- Bueno, E., Mesa, S., Bedmar, E.J., Richardson, D.J., and Delgado, M.J. (2012). Bacterial Adaptation of Respiration from Oxidic to Microoxidic and Anoxic Conditions: Redox Control. *Antioxid. Redox Signal.* *16*, 819–852.
- Bunker, S., Bates, T., and Oliver, J. (2004). Effects of temperature on detection of plasmid or chromosomally encoded gfp- and lux-labeled *Pseudomonas fluorescens* in soil. *Environ. Biosafety Res.* *2*, 83–90.
- Burney, S., Caulfield, J.L., Niles, J.C., Wishnok, J.S., and Tannenbaum, S.R. (1999). The chemistry of DNA damage from nitric oxide and peroxynitrite. *Mutat. Res.* *424*, 37–49.
- Burrows, S.M., Elbert, W., Lawrence, M.G., and Pöschl, U. (2009). Bacteria in the global atmosphere – Part 1: Review and synthesis of literature data for different ecosystems. *Atmospheric Chem. Phys.* *9*, 9263–9280.
- Byrd, M.S., Sadovskaya, I., Vinogradov, E., Lu, H., Sprinkle, A.B., Richardson, S.H., Ma, L., Ralston, B., Parsek, M.R., Anderson, E.M., et al. (2009). Genetic and biochemical analyses of the *Pseudomonas aeruginosa* Psl exopolysaccharide reveal overlapping roles for polysaccharide synthesis enzymes in Psl and LPS production. *Mol. Microbiol.* *73*, 622–638.
- Cáliz, J., Triadó-Margarit, X., Camarero, L., and Casamayor, E.O. (2018). A long-term survey unveils strong seasonal patterns in the airborne microbiome coupled to general and regional atmospheric circulations. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *115*, 12229–12234.
- Camargo, J.A., and Alonso, Á. (2006). Ecological and toxicological effects of inorganic nitrogen pollution in aquatic ecosystems: A global assessment. *Environ. Int.* *32*, 831–849.
- Campolo, N., Bartesaghi, S., and Radi, R. (2014). Metal-catalyzed protein tyrosine nitration in biological systems. *Redox Rep.* *19*, 221–231.
- Cao, L., Srikumar, R., and Poole, K. (2004). MexAB-OprM hyperexpression in NaIC-type multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: identification and characterization of the naIC gene encoding a repressor of PA3720-PA3719. *Mol. Microbiol.* *53*, 1423–1436.
- Capaldi, R.A., Darley-Usmar, V., Fuller, S., and Millett, F. (1982). Structural and functional features of the interaction of cytochrome c with complex III and cytochrome c oxidase. *FEBS Lett.* *138*, 1–7.
- Caranto, J.D., and Lancaster, K.M. (2017). Nitric oxide is an obligate bacterial nitrification intermediate produced by hydroxylamine oxidoreductase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *114*, 201704504.
- Carballal, S., Bartesaghi, S., and Radi, R. (2014). Kinetic and mechanistic considerations to assess the biological fate of peroxynitrite. *Biochim. Biophys. Acta* *1840*, 768–780.
- Castiglione, N., Rinaldo, S., Giardina, G., and Cutruzzolà, F. (2009). The transcription factor DNR from *Pseudomonas aeruginosa* specifically requires nitric oxide and haem for the activation of a target promoter in *Escherichia coli*. *Microbiology* *155*, 2838–2844.

- Caulfield, J.L., Wishnok, J.S., and Tannenbaum, S.R. (1998). Nitric oxide-induced deamination of cytosine and guanine in deoxynucleosides and oligonucleotides. *J. Biol. Chem.* *273*, 12689–12695.
- Chapalain, A., Rossignol, G., Lesouhaitier, O., Merieau, A., Gruffaz, C., Guerillon, J., Meyer, J.-M.J.-M., Orange, N., and Feuilloley, M.G.J.G.J. (2008). Comparative study of 7 fluorescent pseudomonad clinical isolates. *Can. J. Microbiol.* *54*, 19–27.
- Chen, H., Hu, J., Chen, P.R., Lan, L., Li, Z., Hicks, L.M., Dinner, A.R., and He, C. (2008). The *Pseudomonas aeruginosa* multidrug efflux regulator MexR uses an oxidation-sensing mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *105*, 13586–13591.
- Chen, H., Yi, C., Zhang, J., Zhang, W., Ge, Z., Yang, C.-G., and He, C. (2010). Structural insight into the oxidation-sensing mechanism of the antibiotic resistance of regulator MexR. *EMBO Rep.* *11*, 685–690.
- Cheng, Q. (2008). Perspectives in Biological Nitrogen Fixation Research. *J. Integr. Plant Biol.* *50*, 786–798.
- Chevalier, S., Bouffartigues, E., Bodilis, J., Maillot, O., Lesouhaitier, O., Feuilloley, M.G.J., Orange, N., Dufour, A., and Cornelis, P. (2017). Structure, function and regulation of *Pseudomonas aeruginosa* porins. *FEMS Microbiol. Rev.* *41*, 698–722.
- Cirz, R.T., Chin, J.K., Andes, D.R., De Crécy-Lagard, V., Craig, W.A., and Romesberg, F.E. (2005). Inhibition of mutation and combating the evolution of antibiotic resistance. *PLoS Biol.* *3*, 1024–1033.
- Coburn, B., Sekirov, I., and Finlay, B.B. (2007). Type III secretion systems and disease. *Clin. Microbiol. Rev.* *20*, 535–549.
- Coles, B., Bloodsworth, A., Eiserich, J.P., Coffey, M.J., McLoughlin, R.M., Giddings, J.C., Lewis, M.J., Haslam, R.J., Freeman, B.A., and O'Donnell, V.B. (2002). Nitrolinoleate Inhibits Platelet Activation by Attenuating Calcium Mobilization and Inducing Phosphorylation of Vasodilator-stimulated Phosphoprotein through Elevation of cAMP. *J. Biol. Chem.* *277*, 5832–5840.
- Comper, W.D. (1996). Extracellular matrix (Harwood Academic Publishers).
- Cornelis, P., and Matthijs, S. (2002). Diversity of siderophore-mediated iron uptake systems in fluorescent pseudomonads: Not only pyoverdines. *Environ. Microbiol.* *4*, 787–798.
- Cornelis, P., Matthijs, S., and Van Oeffelen, L. (2009). Iron uptake regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Biometals Int. J. Role Met. Ions Biol. Biochem. Med.* *22*, 15–22.
- Costerton, J.W. (1995). Overview of microbial biofilms. *J. Ind. Microbiol.* *15*, 137–140.
- Costerton, J.W., Stewart, P.S., and Greenberg, E.P. (1999). Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* *284*, 1318–1322.
- Couillerot, O., Prigent-Combaret, C., Caballero-Mellado, J., and Moënnelocoz, Y. (2009). *Pseudomonas fluorescens* and closely-related fluorescent pseudomonads as biocontrol agents of soil-borne phytopathogens. *Lett. Appl. Microbiol.* *48*, 505–512.
- Crack, J.C., and Le Brun, N.E. (2017). Redox-sensing iron-sulfur cluster regulators. *Antioxid. Redox Signal. ars.2017.7369*.
- Crane, B.R. (2008). The enzymology of nitric oxide in bacterial pathogenesis and resistance. *Biochem. Soc. Trans.* *36*, 1149–1154.
- Crane, B.R., Sudhamsu, J., and Patel, B.A. (2010). Bacterial Nitric Oxide Synthases. *Annu. Rev. Biochem.* *79*, 445–470.

- Crawford, M.J., and Goldberg, D.E. (1998). Regulation of the *Salmonella typhimurium* flavohemoglobin gene. A new pathway for bacterial gene expression in response to nitric oxide. *J. Biol. Chem.* *273*, 34028–34032.
- Cruz-Ramos, H., Crack, J., Wu, G., Hughes, M.N., Scott, C., Thomson, A.J., Green, J., and Poole, R.K. (2002). NO sensing by FNR: regulation of the *Escherichia coli* NO-detoxifying flavohaemoglobin, Hmp. *EMBO J.* *21*, 3235–3244.
- Daims, H., Lücker, S., and Wagner, M. (2016). A New Perspective on Microbes Formerly Known as Nitrite-Oxidizing Bacteria. *Trends Microbiol.* *24*, 699–712.
- Dalamaga, M., Karmaniolas, K., Chavelas, C., Liatis, S., Matekovits, H., and Migdalis, I. (2005). *Pseudomonas fluorescens* cutaneous abscess and recurrent bacteremia following a dog bite. *Int. J. Dermatol.* *44*, 347–349.
- Darwin, Andrew J., and Stewart, V. (1996). The NAR Modulon Systems: Nitrate and Nitrite Regulation of Anaerobic Gene Expression. In *Regulation of Gene Expression in Escherichia coli* SE - 17, (Boston, MA: Springer US), pp. 343–359.
- DeLeon-Rodriguez, N., Lathem, T.L., Rodriguez-R, L.M., Barazesh, J.M., Anderson, B.E., Beyersdorf, A.J., Ziemba, L.D., Bergin, M., Nenes, A., and Konstantinidis, K.T. (2013). Microbiome of the upper troposphere: species composition and prevalence, effects of tropical storms, and atmospheric implications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *110*, 2575–2580.
- Denicola, A., Freeman, B.A., Trujillo, M., and Radi, R. (1996). Peroxynitrite reaction with carbon dioxide/bicarbonate: kinetics and influence on peroxynitrite-mediated oxidations. *Arch. Biochem. Biophys.* *333*, 49–58.
- Denicola, A., Souza, J.M., and Radi, R. (1998). Diffusion of peroxynitrite across erythrocyte membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *95*, 3566–3571.
- Depayras, S., Kondakova, T., Heipieper, H.J., Feuilleley, M.G., Orange, N., and Duclairoir-Poc, C. (2018). The Hidden Face of Nitrogen Oxides Species: From Toxic Effects to Potential Cure? In *Emerging Pollutants - Some Strategies for the Quality Preservation of Our Environment*, S. Soloneski, and M. L. Larramendy, eds. (InTech), p.
- Deppisch, C., Herrmann, G., Graepler-Mainka, U., Wirtz, H., Heyder, S., Engel, C., Marschal, M., Miller, C.C., and Riethmüller, J. (2016). Gaseous nitric oxide to treat antibiotic resistant bacterial and fungal lung infections in patients with cystic fibrosis: a phase I clinical study. *Infection* *44*, 513–520.
- Derbyshire, E.R., and Marletta, M.A. (2012). Structure and Regulation of Soluble Guanylate Cyclase. *Annu. Rev. Biochem.* *81*, 533–559.
- Després, Viviane R., Huffman, J.A., Burrows, S.M., Hoose, C., Safatov, Aleksandr S., Buryak, G., Fröhlich-Nowoisky, J., Elbert, W., Andreae, Meinrat O., Pöschl, U., et al. (2012). Primary biological aerosol particles in the atmosphere: a review. *Tellus B Chem. Phys. Meteorol.* *64*, 15598.
- Deupree, S.M., and Schoenfisch, M.H. (2009). Morphological analysis of the antimicrobial action of nitric oxide on Gram-negative pathogens using atomic force microscopy. *Acta Biomater.* *5*, 1405–1415.
- Devahasdin, S., Fan, C., Li, K., and Chen, D.H. (2003). TiO₂ photocatalytic oxidation of nitric oxide: transient behavior and reaction kinetics. *J. Photochem. Photobiol. Chem.* *156*, 161–170.
- Dickson, R.P., Erb-Downward, J.R., Prescott, H.C., Martinez, F.J., Curtis, J.L., Lama, V.N., and Huffnagle, G.B. (2014). Cell-associated bacteria in the human lung microbiome. *Microbiome* *2*, 28.

- Diggle, S.P., Winzer, K., Lazdunski, A., Williams, P., and Camara, M. (2002). Advancing the quorum in *Pseudomonas aeruginosa*: MvaT and the regulation of N-Acylhomoserine Lactone production and virulence gene expression. *J. Bacteriol.* *184*, 2576–2586.
- Ding, H., and Demple, B. (1998). Thiol-mediated disassembly and reassembly of [2Fe-2S] clusters in the redox-regulated transcription factor SoxR. *Biochemistry* *37*, 17280–17286.
- Ding, H., and Demple, B. (2000). Direct nitric oxide signal transduction via nitrosylation of iron-sulfur centers in the SoxR transcription activator. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *97*, 5146–5150.
- Duclairoir Poc, C., Verdon, J., Groboillot, A., Barreau, M., Toucourou, H., Mijouin, L., Leclerc, C., Maillot, O., Kondakova, T., Hulen, C., et al. (2014). Airborne fluorescent pseudomonads: What potential for virulence? *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci* *3*, 708–722.
- Duclairoir-Poc, C., Meylheuc, T., Ngoya, S., Groboillot, A., Bodilis, J., Taupin, L., Merieau, A., Feuilloley, M.G.J., and Orange, N. (2011). Influence of Growth Temperature on Cyclolipopeptides Production and on Adhesion Behaviour in Environmental Strains of *Pseudomonas fluorescens*. *J. Bacteriol. Parasitol.* *04*.
- Eastman, A., and Barry, M.A. (1992). The origins of DNA breaks: a consequence of DNA damage, DNA repair, or apoptosis? *Cancer Invest.* *10*, 229–240.
- Einsle, O. (2011). Structure and Function of Formate-Dependent Cytochrome c Nitrite Reductase, NrfA. In *Methods in Enzymology*, pp. 399–422.
- Einsle, O., Messerschmidt, A., Stach, P., Bourenkov, G.P., Bartunik, H.D., Huber, R., and Kroneck, P.M.H. (1999). Structure of cytochrome c nitrite reductase. *Nature* *400*, 476–480.
- El-Sayed, A.K., Hothersall, J., and Thomas, C.M. (2001). Quorum-sensing-dependent regulation of biosynthesis of the polyketide antibiotic mupirocin in *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 10586. *Microbiol. Read. Engl.* *147*, 2127–2139.
- Ernster, L., and Forsmark-Andrée, P. (1993). Ubiquinol: an endogenous antioxidant in aerobic organisms. *Clin. Investig.* *71*, S60-5.
- Ertesvåg, H., Sletta, H., Senneset, M., Sun, Y.-Q., Klinkenberg, G., Konradsen, T.A., Ellingsen, T.E., and Valla, S. (2017). Identification of genes affecting alginate biosynthesis in *Pseudomonas fluorescens* by screening a transposon insertion library. *BMC Genomics* *18*, 11.
- European Environment Agency, E. (2015). Air quality in Europe — 2015 report (Copenhagen).
- European Environment Agency, E. (2018). Air quality in Europe — 2018 report (Copenhagen).
- Fahey, R.C., Brown, W.C., Adams, W.B., and Worsham, M.B. (1978). Occurrence of glutathione in bacteria. *J. Bacteriol.* *133*, 1126–1129.
- Fang, F.C., Frawley, E.R., Tapscott, T., and Vázquez-Torres, A. (2016). Bacterial Stress Responses during Host Infection. *Cell Host Microbe* *20*, 133–143.
- Fargier, E., Aogáin, M.M., Mooij, M.J., Woods, D.F., Morrissey, J.P., Dobson, A.D.W., Adams, C., and O’Gara, F. (2012). MexT Functions as a Redox-Responsive Regulator Modulating Disulfide Stress Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* *194*, 3502–3511.
- Feelisch, M., and Martin, J.F. (1995). The early role of nitric oxide in evolution. *Trends Ecol. Evol.* *10*, 496–499.
- Ferguson, S.J. (1994). Denitrification and its control. *Antonie Van Leeuwenhoek* *66*, 89–110.

- Ferguson, S.J. (1998). Nitrogen cycle enzymology. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2, 182–193.
- Ferrer-Sueta, G., and Radi, R. (2009). Chemical biology of peroxyxynitrite: kinetics, diffusion, and radicals. *ACS Chem. Biol.* 4, 161–177.
- Ferrer-Sueta, G., Campolo, N., Trujillo, M., Bartesaghi, S., Carballal, S., Romero, N., Alvarez, B., and Radi, R. (2018). Biochemistry of Peroxyxynitrite and Protein Tyrosine Nitration. *Chem. Rev.* 118, 1338–1408.
- Fetar, H., Gilmour, C., Klinoski, R., Daigle, D.M., Dean, C.R., and Poole, K. (2011). mexEF-oprN Multidrug Efflux Operon of *Pseudomonas aeruginosa*: Regulation by the MexT Activator in Response to Nitrosative Stress and Chloramphenicol. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55, 508–514.
- Fitzpatrick, J., and Kim, E. (2015). Synthetic Modeling Chemistry of Iron–Sulfur Clusters in Nitric Oxide Signaling. *Acc. Chem. Res.* 48, 2453–2461.
- Fleming, D., and Rumbaugh, K. (2017). Approaches to Dispersing Medical Biofilms. *Microorganisms* 5, 15.
- Fontecave, M., and Ollagnier-de-Choudens, S. (2008). Iron-sulfur cluster biosynthesis in bacteria: Mechanisms of cluster assembly and transfer. *Arch. Biochem. Biophys.* 474, 226–237.
- Franklin, M.J., Nivens, D.E., Weadge, J.T., and Howell, P.L. (2011). Biosynthesis of the *Pseudomonas aeruginosa* Extracellular Polysaccharides, Alginate, Pel, and Psl. *Front. Microbiol.* 2, 167.
- Fraud, S., and Poole, K. (2011). Oxidative stress induction of the MexXY multidrug efflux genes and promotion of aminoglycoside resistance development in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55, 1068–1074.
- Fraud, S., Campigotto, A.J., Chen, Z., and Poole, K. (2008). MexCD-OprJ multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*: involvement in chlorhexidine resistance and induction by membrane-damaging agents dependent upon the AlgU stress response sigma factor. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52, 4478–4482.
- Frey, A.D., and Kallio, P.T. (2003). Bacterial hemoglobins and flavohemoglobins: Versatile proteins and their impact on microbiology and biotechnology. *FEMS Microbiol. Rev.* 27, 525–545.
- Friedberg, E.C., Walker, G.C., and Siede, W. (1995). DNA repair and mutagenesis (ASM Press).
- Frungillo, L., Skelly, M.J., Loake, G.J., Spoel, S.H., and Salgado, I. (2014). S-nitrosothiols regulate nitric oxide production and storage in plants through the nitrogen assimilation pathway. *Nat. Commun.* 5, 5401.
- Fuchs, B., Schiller, J., Süß, R., Schürenberg, M., and Suckau, D. (2007). A direct and simple method of coupling matrix-assisted laser desorption and ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) to thin-layer chromatography (TLC) for the analysis of phospholipids from egg yolk. *Anal. Bioanal. Chem.* 389, 827–834.
- Fukuto, J.M., Cho, J.Y., and Switzer, C.H. (2000). The Chemical Properties of Nitric Oxide and Related Nitrogen Oxides. In *Nitric Oxide*, (Elsevier), pp. 23–40.
- Fuzzi, S., Andreae, M.O., Huebert, B.J., Kulmala, M., Bond, T.C., Boy, M., Doherty, S.J., Guenther, A., Kanakidou, M., Kawamura, K., et al. (2006). Critical assessment of the current state of scientific knowledge, terminology, and research needs concerning the role of organic aerosols in the atmosphere, climate, and global change. *Atmospheric Chem. Phys.* 6, 2017–2038.
- Gale, E.F. (1940). The production of amines by bacteria: The decarboxylation

of amino-acids by strains of *Bacterium coli*. *Biochem. J.* **34**, 392–413.

Gallique, M., Bouteiller, M., and Merieau, A. (2017). The type VI secretion system: A dynamic system for bacterial communication? *Front. Microbiol.* **8**, 1454.

Gardner, P.R., Costantino, G., Szabó, C., and Salzman, A.L. (1997). Nitric oxide sensitivity of the aconitases. *J. Biol. Chem.* **272**, 25071–25076.

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

Gardner, P.R., Costantino, G., and Salzman, A.L. (1998b). Constitutive and adaptive detoxification of nitric oxide in *Escherichia coli*. Role of nitric-oxide dioxygenase in the protection of aconitase. *J. Biol. Chem.* **273**, 26528–26533.

Gates, K.S. (2009). An overview of chemical processes that damage cellular DNA: Spontaneous hydrolysis, alkylation, and reactions with radicals. *Chem. Res. Toxicol.* **22**, 1747–1760.

Geisseler, D., Horwath, W.R., Joergensen, R.G., and Ludwig, B. (2010). Pathways of nitrogen utilization by soil microorganisms - A review. *Soil Biol. Biochem.* **42**, 2058–2067.

Ghaffari, A., Neil, D.H.H., Ardakani, A., Road, J., Ghahary, A., and Miller, C.C.C. (2005). A direct nitric oxide gas delivery system for bacterial and mammalian cell cultures. *Nitric Oxide* **12**, 129–140.

Ghaffari, A., Miller, C.C., McMullin, B., and Ghahary, A. (2006). Potential application of gaseous nitric oxide as a topical antimicrobial agent. *Nitric Oxide - Biol. Chem.* **14**, 21–29.

Ghosh, S., Cremers, C.M., Jakob, U., and Love, N.G. (2011). Chlorinated phenols control the expression of the multidrug resistance efflux pump MexAB-OprM in

Pseudomonas aeruginosa by interacting with NaCl. *Mol. Microbiol.* **79**, 1547–1556.

Giel, J.L., Nesbit, A.D., Mettert, E.L., Fleischhacker, A.S., Wanta, B.T., and Kiley, P.J. (2013). Regulation of iron-sulphur cluster homeostasis through transcriptional control of the Isc pathway by [2Fe-2S]-IscR in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **87**, 478–492.

Goldstein, S., and Rabani, J. (2007). Mechanism of nitrite formation by nitrate photolysis in aqueous solutions: the role of peroxyxynitrite, nitrogen dioxide, and hydroxyl radical. *J. Am. Chem. Soc.* **129**, 10597–10601.

Gomila, M., Peñ̃a, A., Mulet, M., Lalucat, J., and Garc̃a-Vald̃os, E. (2015). Phylogenomics and systematics in *Pseudomonas*. *Front. Microbiol.* **6**, 214.

Gorman, G.S., Chinnery, P.F., DiMauro, S., Hirano, M., Koga, Y., McFarland, R., Suomalainen, A., Thorburn, D.R., Zeviani, M., and Turnbull, D.M. (2016). Mitochondrial diseases. *Nat. Rev. Dis. Primer* **2**, 16080.

Goss, S.P.A., Singh, R.J., Hogg, N., and Kalyanaraman, B. (1999). Reactions of ·NO, ·NO₂ and peroxyxynitrite in membranes: Physiological implications. *Free Radic. Res.* **31**, 597–606.

Gow, A.J., Farkouh, C.R., Munson, D.A., Posencheg, M.A., and Ischiropoulos, H. (2004). Biological significance of nitric oxide-mediated protein modifications. *Am. J. Physiol.-Lung Cell. Mol. Physiol.* **287**, L262–L268.

Graham, J.A., Grant, L.D., Folinsbee, L.J., Kotchmar, D.J., Garner, J.H.B., and Organization, W.H. (2010). Nitrogen oxides. In *WHO Guidelines for Indoor Air Quality: Selected Pollutants.*, W. World Health Organization, ed. (Geneva: Geneva : World Health Organization), p.

Gu, M., and Imlay, J.A. (2011). The SoxRS response of *Escherichia coli* is directly activated by redox-cycling drugs rather

- than by superoxide. *Mol. Microbiol.* **79**, 1136–1150.
- Guerreiro, C., González Ortiz, A., and Frank de Leeuw (2017). Air quality in Europe - 2017 report.
- Guillemet, E., Leréec, A., Tran, S.-L., Royer, C., Barbosa, I., Sansonetti, P., Lereclus, D., and Ramarao, N. (2016). The bacterial DNA repair protein Mfd confers resistance to the host nitrogen immune response. *Sci. Rep.* **6**, 29349.
- Gupta, K.J., Igamberdiev, A.U., Manjunatha, G., Segu, S., Moran, J.F., Neelawarne, B., Bauwe, H., and Kaiser, W.M. (2011). The emerging roles of nitric oxide (NO) in plant mitochondria. *Plant Sci.* **181**, 520–526.
- Gutknecht, J., Bisson, M.A., and Tosteson, F.C. (1977). Diffusion of carbon dioxide through lipid bilayer membranes: effects of carbonic anhydrase, bicarbonate, and unstirred layers. *J. Gen. Physiol.* **69**, 779–794.
- Hall, T.A. (1999). A User-Friendly Biological Sequence Alignment Editor and Analysis Program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.* **41**, 95–98.
- Halliwell, B., and Gutteridge, J.M.C. (1985). Free radicals in biology and medicine. *J. Free Radic. Biol. Med.* **1**, 331–332.
- Hamm, M.L., Rajguru, S., Downs, A.M., and Cholera, R. (2005). Base pair stability of 8-chloro- and 8-iodo-2'-deoxyguanosine opposite 2'-deoxycytidine: Implications regarding the bioactivity of 8-oxo-2'-deoxyguanosine. *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 12220–12221.
- Hanrahan, P.L. (1999). The Plume Volume Molar Ratio Method for Determining NO₂/NO_x Ratios in Modeling—Part II: Evaluation Studies. *J. Air Waste Manag. Assoc.* **49**, 1332–1338.
- Hardingham, T.E., and Fosang, A.J. (1992). Proteoglycans: many forms and many functions. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **6**, 861–870.
- Hasegawa, N., Arai, H., and Igarashi, Y. (1998). Activation of a consensus FNR-dependent promoter by DNR of *Pseudomonas aeruginosa* in response to nitrite. *FEMS Microbiol. Lett.* **166**, 213–217.
- Hassan, M.S., Mileva, M.M., Dweck, H.S., and Rosenfeld, L. (1998). Nitric Oxide Products Degrade Chondroitin Sulfates. *Nitric Oxide* **2**, 360–365.
- Hassett, D.J., Sokol, P.A., Howell, M.L., Ma, J.F., Schweizer, H.T., Ochsner, U., and Vasil, M.L. (1996). Ferric uptake regulator (Fur) mutants of *Pseudomonas aeruginosa* demonstrate defective siderophore-mediated iron uptake, altered aerobic growth, and decreased superoxide dismutase and catalase activities. *J. Bacteriol.* **178**, 3996–4003.
- Hausladen, A., Privalle, C.T., Keng, T., DeAngelo, J., and Stamler, J.S. (1996). Nitrosative stress: activation of the transcription factor OxyR. *Cell* **86**, 719–729.
- Heeb, S., Itoh, Y., Nishijyo, T., Schnider, U., Keel, C., Wade, J., Walsh, U., O'Gara, F., and Haas, D. (2000). Small, Stable Shuttle Vectors Based on the Minimal pVS1 Replicon for Use in Gram-Negative, Plant-Associated Bacteria. *Mol. Plant. Microbe Interact.* **13**, 232–237.
- Heicklen, J. (1987). The formation and inhibition of photochemical smog. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **502**, 145–159.
- Heinz, E., and Patlak, C.S. (1960). Energy expenditure by active transport mechanisms. *Biochim. Biophys. Acta* **44**, 324–334.
- Hess, D.T., Matsumoto, A., Kim, S.-O., Marshall, H.E., and Stamler, J.S. (2005). Protein S-nitrosylation: purview and parameters. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **6**, 150–166.

- Heydorn, A., Nielsen, A.T., Hentzer, M., Sternberg, C., Givskov, M., Ersboll, B.K., and Molin, S. (2000). Quantification of biofilm structures by the novel computer program COMSTAT. *Microbiology* 146, 2395–2407.
- Heydorn, A., Ersbøll, B., Kato, J., Hentzer, M., Parsek, M.R., Tolker-Nielsen, T., Givskov, M., and Molin, S. (2002). Statistical analysis of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development: Impact of mutations in genes involved in twitching motility, cell-to-cell signaling, and stationary-phase sigma factor expression. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 2008–2017.
- Hilario, E., Buckley, T.R., and Young, J.M. (2004). Improved resolution on the phylogenetic relationships among *Pseudomonas* by the combined analysis of atpD, carA, recA and 16S rDNA. *Antonie Van Leeuwenhoek Int. J. Gen. Mol. Microbiol.* 86, 51–64.
- Hill, B.G., and Bhatnagar, A. (2012). Protein S-glutathiolation: Redox-sensitive regulation of protein function. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 52, 559–567.
- Hillion, M., and Antelmann, H. (2015). Thiol-based redox switches in prokaryotes. *Biol. Chem.* 396, 415–444.
- Hillion, M., Mijouin, L., Diaye, A.N., Percoco, G., Enault, J., Follet-Gueye, M.-L., Yvergnaux, F., Lefeuve, L., and Feuilloley, M.G. (2014). *Pseudomonas fluorescens*, a forgotten member of the human cutaneous microflora sensible to skin communication and defense peptides.
- Hoffman, B.M., Lukoyanov, D., Yang, Z.-Y., Dean, D.R., and Seefeldt, L.C. (2014). Mechanism of Nitrogen Fixation by Nitrogenase: The Next Stage. *Chem. Rev.* 114, 4041–4062.
- Hossain, S., and Boon, E.M. (2017). Discovery of a Novel Nitric Oxide Binding Protein and Nitric-Oxide-Responsive Signaling Pathway in *Pseudomonas aeruginosa*. *ACS Infect. Dis.* 3, 454–461.
- Howell, M.L., Alsabbagh, E., Ma, J.-F., Ochsner, U.A., Klotz, M.G., Beveridge, T.J., Blumenthal, K.M., Niederhoffer, E.C., Morris, R.E., Needham, D., et al. (2000). AnkB, a Periplasmic Ankyrin-Like Protein in *Pseudomonas aeruginosa*, Is Required for Optimal Catalase B (KatB) Activity and Resistance to Hydrogen Peroxide. *J. Bacteriol.* 182, 4545–4556.
- Hoyle, B.D., Alcantara, J., and Costerton, J.W. (1992). *Pseudomonas aeruginosa* biofilm as a diffusion barrier to piperacillin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 36, 2054–2056.
- Hu, H.-W., and He, J.-Z. (2017). Comammox—a newly discovered nitrification process in the terrestrial nitrogen cycle. *J. Soils Sediments* 17, 2709–2717.
- Hughes, M.N. (1999). Relationships between nitric oxide, nitroxyl ion, nitrosonium cation and peroxynitrite. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* 1411, 263–272.
- Hughes, M.N. (2008). Chemistry of Nitric Oxide and Related Species. In *Methods in Enzymology*, pp. 3–19.
- Hwang, G.B., Jung, J.H., Jeong, T.G., and Lee, B.U. (2010). Effect of hybrid UV-thermal energy stimuli on inactivation of *S. epidermidis* and *B. subtilis* bacterial bioaerosols. *Sci. Total Environ.* 408, 5903–5909.
- Hyduke, D.R., Jarboe, L.R., Tran, L.M., Chou, K.J.Y., and Liao, J.C. (2007). Integrated network analysis identifies nitric oxide response networks and dihydroxyacid dehydratase as a crucial target in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 8484–8489.
- Ignarro, L.J. (1990). Nitric oxide. A novel signal transduction mechanism for transcellular communication. *Hypertens. Dallas Tex* 1979 16, 477–483.
- Ignarro, L.J., and Murad, Ferid. (1995). Nitric oxide: biochemistry, molecular

biology, and therapeutic implications (Academic Press).

Iizuka, M., Inoue, Y., Murata, K., and Kimura, A. (1989). Purification and some properties of glutathione S-transferase from *Escherichia coli* B. *J. Bacteriol.* *171*, 6039–6042.

Ilari, A., Bonamore, A., Farina, A., Johnson, K.A., and Boffi, A. (2002). The X-ray Structure of Ferric *Escherichia coli* Flavohemoglobin Reveals an Unexpected Geometry of the Distal Heme Pocket. *J. Biol. Chem.* *277*, 23725–23732.

INERIS (2011). Oxydes d'azote NOx.

Ischiropoulos, H., Zhu, L., Chen, J., Tsai, M., Martin, J.C., Smith, C.D., and Beckman, J.S. (1992). Peroxynitrite-mediated tyrosine nitration catalyzed by superoxide dismutase. *Arch. Biochem. Biophys.* *298*, 431–437.

Iyer, L.M., Anantharaman, V., and Aravind, L. (2003). Ancient conserved domains shared by animal soluble guanylyl cyclases and bacterial signaling proteins. *BMC Genomics* *4*.

Jacobson, M.R., Cash, V.L., Weiss, M.C., Laird, N.F., Newton, W.E., and Dean, D.R. (1989). Biochemical and genetic analysis of the nifUSVWZM cluster from *Azotobacter vinelandii*. *MGG Mol. Gen. Genet.* *219*, 49–57.

Janion, C. (2008). Inducible SOS response system of DNA repair and mutagenesis in *Escherichia coli*. *Int. J. Biol. Sci.* *4*, 338–344.

Jarboe, L.R., Hyduke, D.R., Tran, L.M., Chou, K.J.Y., and Liao, J.C. (2008). Determination of the *Escherichia coli* S-nitrosoglutathione response network using integrated biochemical and systems analysis. *J. Biol. Chem.* *283*, 5148–5157.

Jennings, L.K., Storek, K.M., Ledvina, H.E., Coulon, C., Marmont, L.S., Sadvovskaya, I., Secor, P.R., Tseng, B.S., Scian, M., Filloux, A., et al. (2015). Pel is a cationic exopolysaccharide that cross-

links extracellular DNA in the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *112*, 11353–11358.

Jetten, M.S.M., Sliemers, O., Kuypers, M., Dalsgaard, T., van Niftrik, L., Cirpus, I., van de Pas-Schoonen, K., Lavik, G., Thamdrup, B., Le Paslier, D., et al. (2003). Anaerobic ammonium oxidation by marine and freshwater planctomycete-like bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* *63*, 107–114.

Jia, H.-P., and Quadrelli, E.A. (2014). Mechanistic aspects of dinitrogen cleavage and hydrogenation to produce ammonia in catalysis and organometallic chemistry: relevance of metal hydride bonds and dihydrogen. *Chem. Soc. Rev.* *43*, 547–564.

Jones, A.M., and Harrison, R.M. (2004). The effects of meteorological factors on atmospheric bioaerosol concentrations--a review. *Sci. Total Environ.* *326*, 151–180.

Juarez, P., Jeannot, K., Plésiat, P., and Llanes, C. (2017). Toxic Electrophiles Induce Expression of the Multidrug Efflux Pump MexEF-OprN in *Pseudomonas aeruginosa* through a Novel Transcriptional Regulator, CmrA. *Antimicrob. Agents Chemother.* *61*, e00585-17.

Jüngst, A., and Zumft, W.G. (1992). Interdependence of respiratory NO reduction and nitrite reduction revealed by mutagenesis of nirQ, a novel gene in the denitrification gene cluster of *Pseudomonas stutzeri*. *FEBS Lett.* *314*, 308–314.

Kaiser, J.C., and Heinrichs, D.E. (2018). Branching out: Alterations in bacterial physiology and virulence due to branched-chain amino acid deprivation. *MBio* *9*, e01188-18.

Kaiser, C., Franklin, O., Richter, A., and Dieckmann, U. (2015). Social dynamics within decomposer communities lead to nitrogen retention and organic matter build-up in soils. *Nat. Commun.* *6*, 8960.

- Kaplan, J.B. (2010). Biofilm Dispersal: Mechanisms, Clinical Implications, and Potential Therapeutic Uses. *J. Dent. Res.* *89*, 205–218.
- Kartal, B., Maalcke, W.J., de Almeida, N.M., Cirpus, I., Gloerich, J., Geerts, W., Op den Camp, H.J.M., Harhangi, H.R., Janssen-Megens, E.M., Francoijs, K.-J., et al. (2011). Molecular mechanism of anaerobic ammonium oxidation. *Nature* *479*, 127–130.
- Kennett, E.C., and Davies, M.J. (2007). Degradation of matrix glycosaminoglycans by peroxynitrite/peroxynitrous acid: Evidence for a hydroxyl-radical-like mechanism. *Free Radic. Biol. Med.* *42*, 1278–1289.
- Kennett, E.C., and Davies, M.J. (2009). Glycosaminoglycans are fragmented by hydroxyl, carbonate, and nitrogen dioxide radicals in a site-selective manner: implications for peroxynitrite-mediated damage at sites of inflammation. *Free Radic. Biol. Med.* *47*, 389–400.
- Kesawat, M.S., Das, B.K., and Kumar, M. (2015). An overview on Fe-S protein biogenesis from Prokaryotes to Eukaryotes. In *Biological Nitrogen Fixation* (Volume 1), F.J. de Bruijn, ed. pp. 59–74.
- van Kessel, M.A.H.J., Speth, D.R., Albertsen, M., Nielsen, P.H., Op den Camp, H.J.M., Kartal, B., Jetten, M.S.M., and Lüscher, S. (2015). Complete nitrification by a single microorganism. *Nature* *528*, 555–559.
- Khairutdinov, R.F., Coddington, J.W., and Hurst, J.K. (2000). Permeation of phospholipid membranes by peroxynitrite. *Biochemistry* *39*, 14238–14249.
- Kim, S.-H., Lee, B.-Y., Lau, G.W., and Cho, Y.-H. (2009). IscR modulates catalase A (KatA) activity, peroxide resistance and full virulence of *Pseudomonas aeruginosa* PA14. *J. Microbiol. Biotechnol.* *19*, 1520–1526.
- Kim, S.O., Oori, Y., Lloyd, D., Hughes, M.N., and Poole, R.K. (1999). Anoxic function for the *Escherichia coli* flavohaemoglobin (Hmp): reversible binding of nitric oxide and reduction to nitrous oxide. *FEBS Lett.* *445*, 389–394.
- Kim, S.O., Merchant, K., Nudelman, R., Beyer, W.F., Keng, T., DeAngelo, J., Hausladen, A., and Stamler, J.S. (2002). OxyR: a molecular code for redox-related signaling. *Cell* *109*, 383–396.
- Kindrachuk, K.N., Fernández, L., Bains, M., and Hancock, R.E.W. (2011). Involvement of an ATP-Dependent Protease, PA0779/AsrA, in Inducing Heat Shock in Response to Tobramycin in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* *55*, 1874–1882.
- Kinugawa, T., Enami, S., Yabushita, A., Kawasaki, M., Hoffmann, M.R., and Colussi, A.J. (2011). Conversion of gaseous nitrogen dioxide to nitrate and nitrite on aqueous surfactants. *Phys. Chem. Chem. Phys.* *13*, 5144.
- Kobayashi, K., and Tagawa, S. (2004). Activation of SoxR-Dependent Transcription in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biochem. (Tokyo)* *136*, 607–615.
- Köhler, T., Michea-Hamzehpour, M., Henze, U., Gotoh, N., Kocjancic Curty, L., and Pechère, J.-C. (1997). Characterization of MexE-MexF-OprN, a positively regulated multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* *23*, 345–354.
- Köhler, T., Michéa-Hamzehpour, M., Henze, U., Gotoh, N., Curty, L.K., and Pechère, J.C. (1997). Characterization of MexE-MexF-OprN, a positively regulated multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* *23*, 345–354.
- Kondakova, T., Merlet-Machour, N., Chapelle, M., Preterre, D., Dionnet, F., Feuilloley, M., Orange, N., and Duclairoir Poc, C. (2015). A new study of the bacterial lipidome: HPTLC-MALDI-TOF imaging enlightening the presence of phosphatidylcholine in airborne

- Pseudomonas fluorescens* MFAF76a. Res. Microbiol. 166, 1–8.
- Kondakova, T., Catovic, C., Barreau, M., Nusser, M., Brenner-Weiss, G., Chevalier, S., Dionnet, F., Orange, N., and Poc, C.D. (2016). Response to Gaseous NO₂ Air Pollutant of *P. fluorescens* Airborne Strain MFAF76a and Clinical Strain MFN1032. Front. Microbiol. 7, 379.
- Kong, W., Chen, L., Zhao, J., Shen, T., Surette, M.G., Shen, L., and Duan, K. (2013). Hybrid sensor kinase PA1611 in *Pseudomonas aeruginosa* regulates transitions between acute and chronic infection through direct interaction with RetS. Mol. Microbiol. 88, 784–797.
- Koskenkorva, T., Aro-Kärkkäinen, N., Bachmann, D., Arai, H., Frey, A.D., and Kallio, P.T. (2008). Transcriptional activity of *Pseudomonas aeruginosa* fhp promoter is dependent on two regulators in addition to FhpR. Arch. Microbiol. 189, 385–396.
- Koskenkorva-Frank, T.S., and Kallio, P.T. (2009). Induction of *Pseudomonas aeruginosa* fhp and fhpR by reactive oxygen species. Can. J. Microbiol. 55, 657–663.
- Kosmachevskaya, O.V., Shumaev, K.B., and Topunov, A.F. (2015). Carbonyl Stress in Bacteria: Causes and Consequences. Biochem. Biokhimiia 80, 1655–1671.
- Kostakioti, M., Hadjifrangiskou, M., and Hultgren, S.J. (2013). Bacterial biofilms: Development, dispersal, and therapeutic strategies in the dawn of the postantibiotic era. Cold Spring Harb. Perspect. Med. 3, a010306.
- Kracke, F., Vassilev, I., and Krömer, J.O. (2015). Microbial electron transport and energy conservation - The foundation for optimizing bioelectrochemical systems. Front. Microbiol. 6, 575.
- Kraft, B., Strous, M., and Tegetmeyer, H.E. (2011). Microbial nitrate respiration - Genes, enzymes and environmental distribution. J. Biotechnol. 155, 104–117.
- Kulasakara, H., Lee, V., Brencic, A., Liberati, N., Urbach, J., Miyata, S., Lee, D.G., Neely, A.N., Hyodo, M., Hayakawa, Y., et al. (2006). Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* diguanylate cyclases and phosphodiesterases reveals a role for bis-(3'-5')-cyclic-GMP in virulence. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 103, 2839–2844.
- Kuypers, M.M.M., Marchant, H.K., and Kartal, B. (2018). The microbial nitrogen-cycling network. Nat. Rev. Microbiol. 16, 263–276.
- Latza, U., Gerdes, S., and Baur, X. (2009). Effects of nitrogen dioxide on human health: Systematic review of experimental and epidemiological studies conducted between 2002 and 2006. Int. J. Hyg. Environ. Health 212, 271–287.
- Lau, C.H.-F., Fraud, S., Jones, M., Peterson, S.N., and Poole, K. (2013). Mutational Activation of the AmgRS Two-Component System in Aminoglycoside-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob. Agents Chemother. 57, 2243–2251.
- Laval, J., Jurado, J., Sapparbaev, M., and Sidorkina, O. (1998). Antimutagenic role of base-excision repair enzymes upon free radical-induced DNA damage. In Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, pp. 93–102.
- Lechner, M., Lirk, P., and Rieder, J. (2005). Inducible nitric oxide synthase (iNOS) in tumor biology: The two sides of the same coin. Semin. Cancer Biol. 15, 277–289.
- Lee, C., and Park, C. (2017). Bacterial Responses to Glyoxal and Methylglyoxal: Reactive Electrophilic Species. Int. J. Mol. Sci. 18.
- Lee, Y.-N., and Schwartz, S.E. (1981). Evaluation of the rate of uptake of nitrogen dioxide by atmospheric and surface liquid water. J. Geophys. Res. 86, 11971.
- Lee, C., Kim, I., and Park, C. (2013). Glyoxal detoxification in *Escherichia coli* K-12 by NADPH dependent aldo-keto

- reductases. *J. Microbiol. Seoul Korea* 51, 527–530.
- Lee, D.G., Urbach, J.M., Wu, G., Liberati, N.T., Feinbaum, R.L., Miyata, S., Diggins, L.T., He, J., Saucier, M., Déziel, E., et al. (2006). Genomic analysis reveals that *Pseudomonas aeruginosa* virulence is combinatorial. *Genome Biol.* 7, R90.
- Lee, J.-S., Heo, Y.-J., Lee, J.K., and Cho, Y.-H. (2005). KatA, the major catalase, is critical for osmoprotection and virulence in *Pseudomonas aeruginosa* PA14. *Infect. Immun.* 73, 4399–4403.
- De Ley, J. (1992). The proteobacteria: ribosomal rna cistron similarities and bacterial taxonomy. In *The Prokaryotes, a Handbook on the Biology of Bacteria, Ecophysiology, Isolation, Identification and Applications*, A. Balows, H.G. Truper, M. Dworkin, W. Harder, and K.H. Schleifer, eds. (Berlin: Springer), pp. 2111–2140.
- Li, X.-Z., and Nikaido, H. (2009). Efflux-mediated drug resistance in bacteria: an update. *Drugs* 1555–1623.
- Li, X.-Z., and Plésiat, P. (2016). Antimicrobial Drug Efflux Pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. In *Efflux-Mediated Antimicrobial Resistance in Bacteria: Mechanisms, Regulation and Clinical Implications*, X.-Z. Li, C.A. Elkins, and H.I. Zgurskaya, eds. (Cham: Springer International Publishing), pp. 359–400.
- Li, X.Z., Nikaido, H., and Poole, K. (1995). Role of mexA-mexB-oprM in antibiotic efflux in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39, 1948–1953.
- Li, X.-Z., Plésiat, P., and Nikaido, H. (2015). The Challenge of Efflux-Mediated Antibiotic Resistance in Gram-Negative Bacteria. *Clin. Microbiol. Rev.* 28, 337–418.
- Li, Y., Heine, S., Entian, M., Sauer, K., and Frankenberg-Dinkel, N. (2013). NO-induced biofilm dispersion in *Pseudomonas aeruginosa* is mediated by an MHYT domain-coupled phosphodiesterase. *J. Bacteriol.* 195, 3531–3542.
- Liang, H., Deng, X., Li, X., Ye, Y., and Wu, M. (2014). Molecular mechanisms of master regulator VqsM mediating quorum-sensing and antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Nucleic Acids Res.* 42, 10307–10320.
- Lichstein, H.C., and Cohen, P.P. (1945). TRANSAMINATION IN BACTERIA. *J. Biol. Chem.* 157, 85–92.
- Liebeke, M., Pöther, D.-C., van Duy, N., Albrecht, D., Becher, D., Hochgräfe, F., Lalk, M., Hecker, M., and Antelmann, H. (2008). Depletion of thiol-containing proteins in response to quinones in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* 69, 1513–1529.
- Limoli, D.H., Jones, C.J., and Wozniak, D.J. (2015). Bacterial Extracellular Polysaccharides in Biofilm Formation and Function. *Microbiol. Spectr.* 3.
- Lister, P.D., Wolter, D.J., and Hanson, N.D. (2009). Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. *Clin. Microbiol. Rev.* 22, 582–610.
- Liu, L., Hausladen, A., Zeng, M., Que, L., Heitman, J., and Stamler, J.S. (2001). A metabolic enzyme for S-nitrosothiol conserved from bacteria to humans. *Nature* 410, 490–494.
- Liu, X., Miller, M.J., Joshi, M.S., Thomas, D.D., and Lancaster, J.R. (1998). Accelerated reaction of nitric oxide with O₂ within the hydrophobic interior of biological membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 2175–2179.
- Lobysheva, I.I., Stupakova, M. V, Mikoyan, V.D., Vasilieva, S. V, and Vanin, A.F. (1999). Induction of the SOS DNA repair response in *Escherichia coli* by nitric oxide donating agents: dinitrosyl iron complexes with thiol-containing ligands

- and S-nitrosothiols. *FEBS Lett.* **454**, 177–180.
- Lodish, H., Berk, A., Kaiser, C.A., Krieger, M., Scott, M.P., Bretscher, A., Ploegh, H., Matsudaira, P., and Free-, W.H. (2008). Biomembrane Structure. In *Molecular Cell Biology*, W.H. Freeman, ed. pp. 458–465; 1006–1013.
- Loeb, L.A., and Preston, B.D. (1986). Mutagenesis by Apurinic/Apyrimidinic Sites. *Annu. Rev. Genet.* **20**, 201–230.
- Loewen, P.C. (1979). Levels of glutathione in *Escherichia coli*. *Can. J. Biochem.* **57**, 107–111.
- Loper, J.E., Hassan, K.A., Mavrodi, D. V., Davis, E.W., Lim, C.K., Shaffer, B.T., Elbourne, L.D.H., Stockwell, V.O., Hartney, S.L., Breakwell, K., et al. (2012). Comparative genomics of plant-associated *Pseudomonas* spp.: Insights into diversity and inheritance of traits involved in multitrophic interactions. *PLoS Genet.* **8**, e1002784.
- Lynch, R.E., and Fridovich, I. (1978). Permeation of the erythrocyte stroma by superoxide radical. *J. Biol. Chem.* **253**, 4697–4699.
- Ma, Z., Jacobsen, F.E., and Giedroc, D.P. (2009). Coordination chemistry of bacterial metal transport and sensing. *Chem. Rev.* **109**, 4644–4681.
- Mahoney, L.R. (1970). Evidence for the formation of hydroxyl radicals in the isomerization of pernitrous acid to nitric acid in aqueous solution. *J. Am. Chem. Soc.* **92**, 5262–5263.
- Malhotra, S., Limoli, D.H., English, A.E., Parsek, M.R., and Wozniak, D.J. (2018). Mixed Communities of Mucoid and Nonmucoid *Pseudomonas aeruginosa* Exhibit Enhanced Resistance to Host Antimicrobials. *MBio* **9**.
- Mann, E.E., and Wozniak, D.J. (2012). *Pseudomonas* biofilm matrix composition and niche biology. *FEMS Microbiol. Rev.* **36**, 893–916.
- Maredia, R., Devineni, N., Lentz, P., Dallo, S.F., Yu, J., Guentzel, N., Chambers, J., Arulanandam, B., Haskins, W.E., and Weitao, T. (2012). Vesiculation from *Pseudomonas aeruginosa* under SOS. *ScientificWorldJournal* **2012**, 402919.
- Marla, S.S., Lee, J., and Groves, J.T. (1997). Peroxynitrite rapidly permeates phospholipid membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 14243–14248.
- Martens, D.A. (2005). DENITRIFICATION. In *Encyclopedia of Soils in the Environment*, (Elsevier), pp. 378–382.
- Martin, J.L. (1995). Thioredoxin -a fold for all reasons. *Structure* **3**, 245–250.
- Maseda, H., Saito, K., Nakajima, A., and Nakae, T. (2000). Variation of the mexT gene, a regulator of the MexEF-OprN efflux pump expression in wild-type strains of *Pseudomonas aeruginosa*. **192**.
- Maseda, H., Sawada, I., Saito, K., Uchiyama, H., Nakae, T., and Nomura, N. (2004). Enhancement of the mexAB-oprM efflux pump expression by a quorum-sensing autoinducer and its cancellation by a regulator, MexT, of the mexEF-oprN efflux pump operon in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**, 1320–1328.
- Masip, L., Veeravalli, K., and Georgiou, G. (2006). The Many Faces of Glutathione in Bacteria. *Antioxid. Redox Signal.* **8**, 753–762.
- Masse, E., and Gottesman, S. (2002). A small RNA regulates the expression of genes involved in iron metabolism in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99**, 4620–4625.
- Massé, E., Vanderpool, C.K., and Gottesman, S. (2005). Effect of RyhB small RNA on global iron use in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **187**, 6962–6971.
- Masuda, N., Sakagawa, E., Ohya, S., Gotoh, N., Tsujimoto, H., and Nishino, T.

- (2000a). Substrate Specificities of MexAB-OprM, MexCD-OprJ, and MexXY-OprM Efflux Pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* *44*, 3322–3327.
- Masuda, N., Sakagawa, E., Ohya, S., Gotoh, N., Tsujimoto, H., and Nishino, T. (2000b). Contribution of the MexX-MexY-oprM efflux system to intrinsic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* *44*, 2242–2246.
- McCarthy, K. (2015). *Pseudomonas aeruginosa*: evolution of antimicrobial resistance and implications for therapy. *Semin. Respir. Crit. Care Med.* *36*, 44–55.
- McDonald, M., Mavrodi, D. V, Thomashow, L.S., and Floss, H.G. (2001). Phenazine biosynthesis in *Pseudomonas fluorescens*: branchpoint from the primary shikimate biosynthetic pathway and role of phenazine-1,6-dicarboxylic acid. *J. Am. Chem. Soc.* *123*, 9459–9460.
- Meister, A. (1995). Glutathione metabolism. *Methods Enzymol.* *251*, 3–7.
- Melo, A.M.P., and Teixeira, M. (2016). Supramolecular organization of bacterial aerobic respiratory chains: From cells and back. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* *1857*, 190–197.
- Membrillo-Hernández, J., Coopamah, M.D., Channa, A., Hughes, M.N., and Poole, R.K. (1998). A novel mechanism for upregulation of the *Escherichia coli* K-12 hmp (flavo-haemoglobin) gene by the “NO releaser”, S-nitrosoglutathione: nitrosation of homocysteine and modulation of MetR binding to the glyA-hmp intergenic region. *Mol. Microbiol.* *29*, 1101–1112.
- Mena, K.D., and Gerba, C.P. (2009). Risk Assessment of *Pseudomonas aeruginosa* in Water. In *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, pp. 71–115.
- Meyer, J.M. (2000). Pyoverdines: pigments, siderophores and potential taxonomic markers of fluorescent *Pseudomonas* species. *Arch. Microbiol.* *174*, 135–142.
- Migula (1894). *Über ein neues System der Bakterien*.
- Migula, W. (1900). *System der Bakterien* (Jena).
- Mikami, T., and Kitagawa, H. (2013). Biosynthesis and function of chondroitin sulfate. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* *1830*, 4719–4733.
- Mikkelsen, H., McMullan, R., and Filloux, A. (2011). The *Pseudomonas aeruginosa* reference strain PA14 displays increased virulence due to a mutation in ladS. *PloS One* *6*, e29113.
- Miller, C., McMullin, B., Ghaffari, A., Stenzler, A., Pick, N., Roscoe, D., Ghahary, A., Road, J., and Av-Gay, Y. (2009). Gaseous nitric oxide bactericidal activity retained during intermittent high-dose short duration exposure. *Nitric Oxide - Biol. Chem.* *20*, 16–23.
- Miller, C.C., Miller, M.K., Ghaffari, A., and Kunimoto, B. (2004). Treatment of Chronic Nonhealing Leg Ulceration with Gaseous Nitric Oxide : A Case Study. 233–238.
- Mishra, S., and Imlay, J. (2012). Why do bacteria use so many enzymes to scavenge hydrogen peroxide? *Arch. Biochem. Biophys.* *525*, 145–160.
- Mohan, S.B., Schmid, M., Jetten, M., and Cole, J. (2004). Detection and widespread distribution of the nrfA gene encoding nitrite reduction to ammonia, a short circuit in the biological nitrogen cycle that competes with denitrification. *FEMS Microbiol. Ecol.* *49*, 433–443.
- Moir, J.W.B., and Wood, N.J. (2001). Nitrate and nitrite transport in bacteria. *Cell. Mol. Life Sci.* *58*, 215–224.
- Mok, Y.S., and Lee, H.-J. (2006). Removal of sulfur dioxide and nitrogen oxides by using ozone injection and absorption–reduction technique. *Fuel Process. Technol.* *87*, 591–597.

- Molina, C., Kissner, R., and Koppenol, W.H. (2013). Decomposition kinetics of peroxyxynitrite: influence of pH and buffer. *Dalton Trans.* *42*, 9898.
- Moller, M., Botti, H., Batthyany, C., Rubbo, H., Radi, R., and Denicola, A. (2005). Direct Measurement of Nitric Oxide and Oxygen Partitioning into Liposomes and Low Density Lipoprotein. *J. Biol. Chem.* *280*, 8850–8854.
- Möller, M.N., Li, Q., Vitturi, D.A., Robinson, J.M., Lancaster, J.R., and Denicola, A. (2007). Membrane “Lens” Effect: Focusing the Formation of Reactive Nitrogen Oxides from the • NO/O₂ Reaction. *Chem. Res. Toxicol.* *20*, 709–714.
- Möller, M.N., Lancaster, J.R., and Denicola, A. (2008). Chapter 2 The Interaction of Reactive Oxygen and Nitrogen Species with Membranes. *Curr. Top. Membr.* *61*, 23–42.
- Monteiro, H.P., Ogata, F.T., and Stern, A. (2017). Thioredoxin promotes survival signaling events under nitrosative/oxidative stress associated with cancer development. *Biomed. J.* *40*, 189–199.
- Moreno-Vivián, C., Cabello, P., Martínez-Luque, M., Blasco, R., and Castillo, F. (1999). Prokaryotic nitrate reduction: molecular properties and functional distinction among bacterial nitrate reductases. *J. Bacteriol.* *181*, 6573–6584.
- Morikawa, H., Higaki, A., Nohno, M., Takahashi, M., Kamada, M., Nakata, M., Toyohara, G., Okamura, Y., Matsui, K., Kitani, S., et al. (1998). More than a 600-fold variation in nitrogen dioxide assimilation among 217 plant taxa. *Plant Cell Environ.* *21*, 180–190.
- Morin, J.P., Preterre, D., Gouriou, F., Delmas, V., François, A., Orange, N., Grosboillot, A., Duclairioir-Poc, C., Moretti, M., Maillot, O., et al. (2013). Particules urbaines et céréalières, microorganismes, mycotoxines et pesticides. *Pollut. Atmospherique* 1–8.
- Morita, Y., Tomida, J., and Kawamura, Y. (2012). Primary mechanisms mediating aminoglycoside resistance in the multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate PA7. *Microbiol. Read. Engl.* *158*, 1071–1083.
- Mulder, A., Graaf, A.A., Robertson, L.A., and Kuenen, J.G. (1995). Anaerobic ammonium oxidation discovered in a denitrifying fluidized bed reactor. *FEMS Microbiol. Ecol.* *16*, 177–184.
- Mulet, M., Gomila, M., Scotta, C., Sánchez, D., Lalucat, J., and García-Valdés, E. (2012). Concordance between whole-cell matrix-assisted laser-desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and multilocus sequence analysis approaches in species discrimination within the genus *Pseudomonas*. *Syst. Appl. Microbiol.* *35*, 455–464.
- Mulet, M., Gomila, M., Ramírez, A., Cardew, S., Moore, E.R.B., Lalucat, J., and García-Valdés, E. (2017). Uncommonly isolated clinical *Pseudomonas*: identification and phylogenetic assignation. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* *36*, 351–359.
- Muller, C., Plésiat, P., and Jeannot, K. (2011). A two-component regulatory system interconnects resistance to polymyxins, aminoglycosides, fluoroquinolones, and β-lactams in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* *55*, 1211–1221.
- Müller, T., Walter, B., Wirtz, A., and Burkovski, A. (2006). Ammonium Toxicity in Bacteria. *Curr. Microbiol.* *52*, 400–406.
- Mungrue, I.N., and Bredt, D.S. (2004). nNOS at a glance: implications for brain and brawn. *J. Cell Sci.* *117*, 2627–2629.
- Muriel, C., Jalvo, B., Redondo-Nieto, M., Rivilla, R., and Martín, M. (2015). Chemotactic Motility of *Pseudomonas fluorescens* F113 under Aerobic and Denitrification Conditions. *PLOS ONE* *10*, e0132242.

- Myrold, D. (1998). Transformations of nitrogen. In Principles and Applications of Soil Microbiology, S.M. David, J.J. Fuhrmann, P.G. Hartel, and D.A. Zuberer, eds. (New Jersey), pp. 259–294.
- Netto, L.E.S., and Antunes, F. (2016). The Roles of Peroxiredoxin and Thioredoxin in Hydrogen Peroxide Sensing and in Signal Transduction. *Mol. Cells* 39, 65–71.
- Nnate, D., and Achi, N. (2016). Nitrate Metabolism: A Curse or Blessing to Humanity? *J. Sci. Res. Rep.* 11, 1–19.
- Ochsner, U.A., Vasil, M.L., Alsabbagh, E., Parvatiyar, K., and Hassett, D.J. (2000). Role of the *Pseudomonas aeruginosa* oxyR-recG operon in oxidative stress defense and DNA repair: OxyR-dependent regulation of katB-ankB, ahpB, and ahpC-ahpF. *J. Bacteriol.* 182, 4533–4544.
- O'Donnell, V.B., Eiserich, J.P., Chumley, P.H., Jablonsky, M.J., Krishna, N.R., Kirk, M., Barnes, S., Darley-Usmar, V.M., and Freeman, B.A. (1999). Nitration of Unsaturated Fatty Acids by Nitric Oxide-Derived Reactive Nitrogen Species Peroxynitrite, Nitrous Acid, Nitrogen Dioxide, and Nitronium Ion. *Chem. Res. Toxicol.* 12, 83–92.
- O'leary, W.M. (1962). The fatty acids of bacteria. *Bacteriol. Rev.* 26, 421–447.
- Organisation Mondiale de la Santé (2005). Lignes directrices OMS relatives à la qualité de l'air: particules, ozone, dioxyde d'azote et dioxyde de soufre (Genève).
- Orsi, M., Sanderson, W.E., and Essex, J.W. (2009). Permeability of Small Molecules through a Lipid Bilayer: A Multiscale Simulation Study. *J. Phys. Chem. B* 113, 12019–12029.
- Outten, F.W., and Theil, E.C. (2009). Iron-based redox switches in biology. *Antioxid. Redox Signal.* 11, 1029–1046.
- Outten, F.W., Djaman, O., and Storz, G. (2004). A suf operon requirement for Fe-S cluster assembly during iron starvation in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 52, 861–872.
- Pacher, P., Beckman, J.S., and Liaudet, L. (2007). Nitric Oxide and Peroxynitrite in Health and Disease. *Physiol. Rev.* 87, 315–424.
- Pacitto, A., Amato, F., Salmatonidis, A., Moreno, T., Alastuey, A., Reche, C., Buonanno, G., Benito, C., and Querol, X. (2019). Effectiveness of commercial face masks to reduce personal PM exposure. *Sci. Total Environ.* 650, 1582–1590.
- Pak, J.W., Knoke, K.L., Noguera, D.R., Fox, B.G., and Chambliss, G.H. (2000). Transformation of 2,4,6-trinitrotoluene by purified xenobiotic reductase B from *Pseudomonas fluorescens* I-C. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 4742–4750.
- Palleroni, N.J. (1984). Genus I. *Pseudomonas* Migula 1894, 237AL (nom. cons. Opin. 5, Jud. Comm. 1952, 237). In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Vol. I), N.R. Krieg, and J.G. Holt, eds. (Baltimore: Williams & Wilkins), pp. 141–199.
- Pang, Z., Raudonis, R., Glick, B.R., Lin, T.-J., and Cheng, Z. (2019). Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. *Biotechnol. Adv.* 37, 177–192.
- Panmanee, W., and Hassett, D.J. (2009). Differential roles of OxyR-controlled antioxidant enzymes alkyl hydroperoxide reductase (AhpCF) and catalase (KatB) in the protection of *Pseudomonas aeruginosa* against hydrogen peroxide in biofilm vs. planktonic culture. *FEMS Microbiol. Lett.* 295, 238–244.
- Petrova, O.E., Cherny, K.E., and Sauer, K. (2014). The *Pseudomonas aeruginosa* diguanylate cyclase GcbA, a homolog of *P. fluorescens* GcbA, promotes initial attachment to surfaces, but not biofilm formation, via regulation of motility. *J. Bacteriol.* 196, 2827–2841.
- Plate, L., and Marletta, M.A. (2013). Nitric oxide-sensing H-NOX proteins govern

- bacterial communal behavior. Trends Biochem. Sci. 38, 566–575.
- Poole, K. (2000). Efflux-Mediated Resistance to Fluoroquinolones in Gram-Negative Bacteria. Antimicrob. Agents Chemother. 44, 2233–2241.
- Poole, K. (2014). Stress responses as determinants of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: multidrug efflux and more. Can. J. Microbiol. 60, 783–791.
- Poole, R.K., and Hughes, M.N. (2000). New functions for the ancient globin family: bacterial responses to nitric oxide and nitrosative stress. Mol. Microbiol. 36, 775–783.
- Poole, K., Tetro, K., Zhao, Q., Neshat, S., Heinrichs, D.E., and Bianco, N. (1996a). Expression of the multidrug resistance operon *mexA-mexB-oprM* in *Pseudomonas aeruginosa*: *mexR* encodes a regulator of operon expression. Antimicrob. Agents Chemother. 40, 2021–2028.
- Poole, K., Gotoh, N., Tsujimoto, H., Zhao, Q., Wada, A., Yamasaki, T., Neshat, S., Yamagishi, J., Li, X.-Z., and Nishino, T. (1996b). Overexpression of the *mexC-mexD-oprJ* efflux operon in *nfxB*-type multidrug-resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa*. Mol. Microbiol. 21, 713–725.
- Poole, R.K., Anjum, M.F., Membrillo-Hernández, J., Kim, S.O., Hughes, M.N., and Stewart, V. (1996c). Nitric oxide, nitrite, and Fnr regulation of *hmp* (flavo-hemoglobin) gene expression in *Escherichia coli* K-12. J. Bacteriol. 178, 5487–5492.
- Poonsuk, K., and Chuanchuen, R. (2014). Detection of the Mex Efflux Pumps in *Pseudomonas aeruginosa* by Using a Combined Resistance-Phenotypic Markers and Multiplex RT-PCR. Open J. Med. Microbiol. 04, 153.
- Prather, M.J., Hsu, J., DeLuca, N.M., Jackman, C.H., Oman, L.D., Douglass, A.R., Fleming, E.L., Strahan, S.E., Steenrod, S.D., Søvdé, O.A., et al. (2015). Measuring and modeling the lifetime of nitrous oxide including its variability. J. Geophys. Res. Atmospheres JGR 120, 5693–5705.
- Preston, G.M., Bertrand, N., and Rainey, P.B. (2001). Type III secretion in plant growth-promoting *Pseudomonas fluorescens* SBW25. Mol. Microbiol. 41, 999–1014.
- Prieto-Alamo, M.J., Jurado, J., Gallardo-Madueno, R., Monje-Casas, F., Holmgren, A., and Pueyo, C. (2000). Transcriptional regulation of glutaredoxin and thioredoxin pathways and related enzymes in response to oxidative stress. J. Biol. Chem. 275, 13398–13405.
- Pruitt, B.A., McManus, A.T., Kim, S.H., and Goodwin, C.W. (1998). Burn wound infections: current status. World J. Surg. 22, 135–145.
- Purssell, A., Fruci, M., Mikalauskas, A., Gilmour, C., and Poole, K. (2015). *EsrC*, an envelope stress-regulated repressor of the *mexCD-oprJ* multidrug efflux operon in *Pseudomonas aeruginosa*. Environ. Microbiol. 17, 186–198.
- Putz, M., Schleusner, P., Rütting, T., and Hallin, S. (2018). Relative abundance of denitrifying and DNRA bacteria and their activity determine nitrogen retention or loss in agricultural soil. Soil Biol. Biochem. 123, 97–104.
- Raaijmakers, J.M., Vlami, M., and de Souza, J.T. (2002). Antibiotic production by bacterial biocontrol agents. Antonie Van Leeuwenhoek Int. J. Gen. Mol. Microbiol. 81, 537–547.
- Raaijmakers, J.M., De Bruijn, I., Nybroe, O., and Ongena, M. (2010). Natural functions of lipopeptides from *Bacillus* and *Pseudomonas*: more than surfactants and antibiotics. FEMS Microbiol. Rev. 34, 1037–1062.

- Radi, R. (1996). Reactions of Nitric Oxide with Metalloproteins. *Chem. Res. Toxicol.* *9*, 828–835.
- Radi, R. (2004). Nitric oxide, oxidants, and protein tyrosine nitration. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *101*, 4003–4008.
- Radi, R. (2013). Peroxynitrite, a Stealthy Biological Oxidant. *J. Biol. Chem.* *288*, 26464–26472.
- Radi, R., Denicola, A., and Freeman, B.A. (1998). Peroxynitrite reactions with carbon dioxide-bicarbonate. *Methods Enzymol.* *301*, 353–367.
- Radi, R., Denicola, A., Alvarez, B., Ferrer-Sueta, G., and Rubbo, H. (2000). The Biological Chemistry of Peroxynitrite. In *Nitric Oxide*, (Elsevier), pp. 57–82.
- Radi, R., Peluffo, G., Alvarez, M.N., Naviliat, M., and Cayota, A. (2001). Unraveling peroxynitrite formation in biological systems. *Free Radic. Biol. Med.* *30*, 463–488.
- Radke, J., and Fabian, P. (1991). [The ozone layer and its modification by N₂O and inhalation anesthetics]. *Anaesthesist* *40*, 429–433.
- Raines, E.W., Koyama, H., and Carragher, N.O. (2000). The extracellular matrix dynamically regulates smooth muscle cell responsiveness to PDGF. *Ann N Acad Sci* *902*, 32–39.
- Rajmohan, S., Dodd, C.E.R., and Waites, W.M. (2002). Enzymes from isolates of *Pseudomonas fluorescens* involved in food spoilage. *J. Appl. Microbiol.* *93*, 205–213.
- Ramamurthy, T., Ghosh, A., Pazhani, G.P., and Shinoda, S. (2014). Current Perspectives on Viable but Non-Culturable (VBNC) Pathogenic Bacteria. *Front. Public Health* *2*, 103.
- Rees, M.D., Kennett, E.C., Whitelock, J.M., and Davies, M.J. (2008). Oxidative damage to extracellular matrix and its role in human pathologies. *Free Radic. Biol. Med.* *44*, 1973–2001.
- Remold, S.K., Purdy-Gibson, M.E., France, M.T., and Hundley, T.C. (2015). *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas fluorescens* Species Group Recovery from Human Homes Varies Seasonally and by Environment. *PLOS ONE* *10*, e0127704.
- Ren, B., Zhang, N., Yang, J., and Ding, H. (2008). Nitric oxide-induced bacteriostasis and modification of iron-sulphur proteins in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.*
- Rhee, S.G., Yang, K.-S., Kang, S.W., Woo, H.A., and Chang, T.-S. (2005). Controlled Elimination of Intracellular H₂O₂: Regulation of Peroxiredoxin, Catalase, and Glutathione Peroxidase via Post-translational Modification. *Antioxid. Redox Signal.* *7*, 619–626.
- Richter, G., Schober, C., Süß, R., Fuchs, B., Müller, M., and Schiller, J. (2008). The reaction between phosphatidylethanolamines and HOCl investigated by TLC: Fading of the dye primuline is induced by dichloramines. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.* *867*, 233–237.
- Rietsch, A., Vallet-gely, I., Dove, S.L., and Mekalanos, J.J. (2005). ExsE, a secreted regulator of type III secretion genes in *Pseudomonas aeruginosa*.
- Rinaldo, S., Giardina, G., Brunori, M., and Cutruzzolà, F. (2006). N-oxide sensing and denitrification: the DNR transcription factors. *Biochem. Soc. Trans.* *34*, 185–187.
- Ritz, D., Patel, H., Doan, B., Zheng, M., Åslund, F., Storz, G., and Beckwith, J. (2000). Thioredoxin 2 is involved in the oxidative stress response in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* *275*, 2505–2512.
- Romero, N., Denicola, A., Souza, J.M., and Radi, R. (1999). Diffusion of Peroxynitrite in the Presence of Carbon Dioxide. *Arch. Biochem. Biophys.* *368*, 23–30.

- Romsang, A., Duang-Nkern, J., Leesukon, P., Saninjuk, K., Vattanaviboon, P., and Mongkolsuk, S. (2014). The iron-sulphur cluster biosynthesis regulator IscR contributes to iron homeostasis and resistance to oxidants in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS One* *9*, e86763.
- Roy, A.B., Petrova, O.E., and Sauer, K. (2012). The phosphodiesterase DipA (PA5017) is essential for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm dispersion. *J. Bacteriol.* *194*, 2904–2915.
- Ruas-Madiedo, P., Hugenholtz, J., and Zoon, P. (2002). An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *Int. Dairy J.* *12*, 163–171.
- Rubbo, H., Radi, R., Anselmi, D., Kirk, M., Barnes, S., Butler, J., Eiserich, J.P., and Freeman, B.A. (2000). Nitric oxide reaction with lipid peroxyl radicals spares alpha-tocopherol during lipid peroxidation. Greater oxidant protection from the pair nitric oxide/alpha-tocopherol than alpha-tocopherol/ascorbate. *J. Biol. Chem.* *275*, 10812–10818.
- Rubel, A.M., Stewart, M.L., and Stencel, J.M. (1995). Activated carbon for control of nitrogen oxide emissions. *J. Mater. Res.* *10*, 562–567.
- Ryjenkov, D.A., Tarutina, M., Moskvina, O. V., and Gomelsky, M. (2005). Cyclic diguanylate is a ubiquitous signaling molecule in bacteria: Insights into biochemistry of the GGDEF protein domain. *J. Bacteriol.* *187*, 1792–1798.
- Sadovskaya, I., Vinogradov, E., Li, J., Hachani, A., Kowalska, K., and Filloux, A. (2010). High-level antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm: The ndvB gene is involved in the production of highly glycerol-phosphorylated $\beta(1\rightarrow3)$ -glucans, which bind aminoglycosides. *Glycobiology* *20*, 895–904.
- Sarrazin, S., Lamanna, W.C., and Esko, J.D. (2011). Heparan sulfate proteoglycans. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *3*, 1–33.
- Sawa, T., Tatemichi, M., Akaike, T., Barbin, A., and Ohshima, H. (2006). Analysis of urinary 8-nitroguanine, a marker of nitrate nucleic acid damage, by high-performance liquid chromatography-electrochemical detection coupled with immunoaffinity purification: association with cigarette smoking. *Free Radic. Biol. Med.* *40*, 711–720.
- Sayed, N., Baskaran, P., Ma, X., van den Akker, F., and Beuve, A. (2007). Desensitization of soluble guanylyl cyclase, the NO receptor, by S-nitrosylation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *104*, 12312–12317.
- Scales, B.S., Dickson, R.P., LiPuma, J.J., and Huffnagle, G.B. (2014). Microbiology, Genomics, and Clinical Significance of the *Pseudomonas fluorescens* Species Complex, an Unappreciated Colonizer of Humans. *Clin. Microbiol. Rev.* *27*, 927–948.
- Schimmel, J.P., and Bennett, J. (2004). Nitrogen mineralization: Challenges of a changing paradigm. *Ecology* *85*, 591–602.
- Schmidt, A.J., Ryjenkov, D.A., and Gomelsky, M. (2005). The ubiquitous protein domain EAL is a cyclic diguanylate-specific phosphodiesterase: Enzymatically active and inactive EAL domains. *J. Bacteriol.* *187*, 4774–4781.
- Schreiber, K., Krieger, R., Benkert, B., Eschbach, M., Arai, H., Schobert, M., and Jahn, D. (2007). The anaerobic regulatory network required for *Pseudomonas aeruginosa* nitrate respiration. *J. Bacteriol.* *189*, 4310–4314.
- Schröder, I., Wolin, C.D., Cavicchioli, R., and Gunsalus, R.P. (1994). Phosphorylation and dephosphorylation of the NarX, NarY, and NarZ proteins of the nitrate-dependent two-component regulatory system of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* *176*, 4985–4992.
- Schumann, U., and Huntrieser, H. (2007). The global lightning-induced nitrogen

- oxides source. *Atmospheric Chem. Phys. Discuss.* **7**, 2623–2818.
- Schwarz, W.H.E. (2010). The full story of the electron configurations of the transition elements. *J. Chem. Educ.* **87**, 444–448.
- Scrutton, N.S., Berry, A., and Perham, R.N. (1987). Purification and characterization of glutathione reductase encoded by a cloned and over-expressed gene in *Escherichia coli*. *Biochem. J.* **245**, 875–880.
- Seo, S.W., Kim, D., Latif, H., O'Brien, E.J., Szubin, R., and Palsson, B.O. (2014). Deciphering Fur transcriptional regulatory network highlights its complex role beyond iron metabolism in *Escherichia coli*. *Nat. Commun.* **5**, 4910.
- Seo, S.W., Kim, D., Szubin, R., and Palsson, B.O. (2015). Genome-wide Reconstruction of OxyR and SoxRS Transcriptional Regulatory Networks under Oxidative Stress in *Escherichia coli* K-12 MG1655. *Cell Rep.* **12**, 1289–1299.
- Shapiro, R., Dubelman, S., Feinberg, A.M., Crain, P.F., and McCloskey, J.A. (1977). Isolation and Identification of Cross-Linked Nucleosides from Nitrous Acid Treated Deoxyribonucleic Acid. *J. Am. Chem. Soc.* **99**, 302–303.
- Shi, X., and Zhu, X. (2009). Biofilm formation and food safety in food industries. *Trends Food Sci. Technol.* **20**, 407–413.
- Shimizu, T., Huang, D., Yan, F., Stranova, M., Bartosova, M., Fojtíková, V., and Martínková, M. (2015). Gaseous O₂, NO, and CO in Signal Transduction: Structure and Function Relationships of Heme-Based Gas Sensors and Heme-Redox Sensors. *Chem. Rev.* **115**, 6491–6533.
- Shrimant Shridhar, B. (2012). Review: Nitrogen Fixing Microorganisms. *Int. J. Microbiol. Res.* **3**, 46–52.
- Sidorkina, O., Sapparbaev, M., and Laval, J. (1997). Effects of nitrous acid treatment on the survival and mutagenesis of *Escherichia coli* cells lacking base excision repair (hypoxanthine-DNA glycosylase-ALK A protein) and/or nucleotide excision repair. *Mutagenesis* **12**, 23–28.
- Silva Filho, L.V.R.F. da, Ferreira, F. de A., Reis, F.J.C., Britto, M.C.A. de, Levy, C.E., Clark, O., and Ribeiro, J.D. (2013). *Pseudomonas aeruginosa* infection in patients with cystic fibrosis: scientific evidence regarding clinical impact, diagnosis, and treatment. *J. Bras. Pneumol. Publicação Of. Soc. Bras. Pneumol. E Tisiologia* **39**, 495–512.
- Silveyra, P., Fuentes, N., and Rivera, L. (2017). Understanding the Intersection of Environmental Pollution, Pneumonia, and Inflammation: Does Gender Play a Role? In *Contemporary Topics of Pneumonia*, Z.C. Chronos, ed. (InTech), pp. 3–34.
- Simon, R., Priefer, U., and Pühler, A. (1983). A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering: Transposon mutagenesis in gram negative bacteria. *Bio/Technology* **1**, 784–791.
- Singh, A., and Agrawal, M. (2008). Acid rain and its ecological consequences. *J. Environ. Biol.* **29**, 15–24.
- Skalska, K., Miller, J.S., and Ledakowicz, S. (2010). Trends in NO_x abatement: A review. *Sci. Total Environ.* **408**, 3976–3989.
- Skiba, U., Smith, K.A., and fowler, D. (1993). Nitrification and denitrification as sources of nitric oxide and nitrous oxide in a sandy loam soil. *Soil Biol. Biochem.* **25**, 1527–1536.
- Smirnova, G. V, and Oktyabrsky, O.N. (2005). Glutathione in bacteria. *Biochem. Mosc.* **70**, 1199–1211.
- Smith, T.J., Sondermann, H., and O'Toole, G.A. (2018). Co-opting the Lap System of *Pseudomonas fluorescens* To Reversibly Customize Bacterial Cell Surfaces. *ACS Synth. Biol.* **7**, 2612–2617.

- Sobel, M.L., Neshat, S., and Poole, K. (2005). Mutations in PA2491 (*mexS*) promote MexT-dependent *mexEF-oprN* expression and multidrug resistance in a clinical strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* *187*, 1246–1253.
- Soldatova, A. V., Ibrahim, M., Olson, J.S., Czernuszewicz, R.S., and Spiro, T.G. (2010). New Light on NO Bonding in Fe(III) Heme Proteins from Resonance Raman Spectroscopy and DFT Modeling. *J. Am. Chem. Soc.* *132*, 4614–4625.
- Spek, E.J., Wright, T.L., Stitt, M.S., Taghizadeh, N.R., Tannenbaum, S.R., Marinus, M.G., and Engelward, B.P. (2001). Recombinational repair is critical for survival of *Escherichia coli* exposed to nitric oxide. *J. Bacteriol.* *183*, 131–138.
- Sperandio, D., Decoin, V., Latour, X., Mijouin, L., Hillion, M., Feuilloley, M.G.J., Orange, N., and Merieau, A. (2012). Virulence of the *Pseudomonas fluorescens* clinical strain MFN1032 towards *Dictyostelium discoideum* and macrophages in relation with type III secretion system. *BMC Microbiol.* *12*, 223.
- Srikumar, R., Li, X.Z., and Poole, K. (1997). Inner membrane efflux components are responsible for beta-lactam specificity of multidrug efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* *179*, 7875–7881.
- Stanier, R.Y., Palleroni, N.J., and Doudoroff, M. (1966). The Aerobic Pseudomonads: a Taxonomic Study.
- Starnbach, M.N., and Lory, S. (1992). The FliA (*rpoF*) gene of *Pseudomonas aeruginosa* encodes an alternative sigma factor required for flagellin synthesis. *Mol. Microbiol.* *6*, 459–469.
- Starr, L.M., Fruci, M., and Poole, K. (2012). Pentachlorophenol Induction of the *Pseudomonas aeruginosa* *mexAB-oprM* Efflux Operon: Involvement of Repressors NalC and MexR and the Antirepressor ArmR. *PLOS ONE* *7*, e32684.
- Stedman, D.H., and Niki, Hiromi. (1973). Photolysis of nitrogen dioxide in air as measurement method for light intensity. *Environ. Sci. Technol.* *7*, 735–739.
- Steenken, S., and Jovanovic, S. V. (1997). How easily oxidizable is DNA? One-electron reduction potentials of adenosine and guanosine radicals in aqueous solution. *J. Am. Chem. Soc.* *119*, 617–618.
- Stern, R., Kogan, G., Jedrzejewski, M.J., and Šoltés, L. (2007). The many ways to cleave hyaluronan. *Biotechnol. Adv.* *25*, 537–557.
- Stevanin, T.M., Ioannidis, N., Mills, C.E., Kim, S.O., Hughes, M.N., and Poole, R.K. (2000). Flavohemoglobin Hmp affords inducible protection for *Escherichia coli* respiration, catalyzed by cytochromes bo' or bd, from nitric oxide. *J. Biol. Chem.* *275*, 35868–35875.
- Stover, C.K., Pham, X.Q., Erwin, A.L., Mizoguchi, S.D., Warrener, P., Hickey, M.J., Brinkman, F.S.S.L., Hufnagle, W.O., Kowalk, D.J., Lagrou, M., et al. (2000). Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature* *406*, 959–964.
- Su, S., Panmanee, W., Wilson, J.J., Mahtani, H.K., Li, Q., VanderWielen, B.D., Makris, T.M., Rogers, M., McDaniel, C., Lipscomb, J.D., et al. (2014). Catalase (KatA) plays a role in protection against anaerobic nitric oxide in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS ONE* *9*, e91813.
- Sudhamsu, J., and Crane, B.R. (2009). Bacterial nitric oxide synthases : what are they good for? *Trends Microbiol.* *17*, 212–218.
- Sugii, T., Takagi, S., and Matsumoto, Y. (2005). A molecular-dynamics study of lipid bilayers: Effects of the hydrocarbon chain length on permeability. *J. Chem. Phys.* *123*, 184714.
- Szabó, C., Ischiropoulos, H., and Radi, R. (2007). Peroxynitrite: biochemistry,

- pathophysiology and development of therapeutics. *Nat. Rev. Drug Discov.* **6**, 662–680.
- Takahashi, Y., and Nakamura, M. (1999). Functional assignment of the ORF2-iscS-iscU-iscA-hscB-hscA-fdx-ORF3 gene cluster involved in the assembly of Fe-S clusters in *Escherichia coli*. *J. Biochem. (Tokyo)* **126**, 917–926.
- Takahashi, Y., and Tokumoto, U. (2002). A third bacterial system for the assembly of iron-sulfur clusters with homologs in archaea and plastids. *J. Biol. Chem.* **277**, 28380–28383.
- Tang, C.-H., Wei, W., and Liu, L. (2012). Regulation of DNA repair by S-nitrosylation. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* **1820**, 730–735.
- Tayeb, L.A., Lefevre, M., Passet, V., Diancourt, L., Brisse, S., and Grimont, P.A.D. (2008). Comparative phylogenies of Burkholderia, Ralstonia, Comamonas, Brevundimonas and related organisms derived from rpoB, gyrB and rrs gene sequences. *Res. Microbiol.* **159**, 169–177.
- Thornton, J.M. (1981). Disulphide bridges in globular proteins. *J. Mol. Biol.* **151**, 261–287.
- Tian, Z.-X., Fargier, E., Mac Aogáin, M., Adams, C., Wang, Y.-P., and O’Gara, F. (2009). Transcriptome profiling defines a novel regulon modulated by the LysR-type transcriptional regulator MexT in *Pseudomonas aeruginosa*. *Nucleic Acids Res.* **37**, 7546–7559.
- Torres, M.J., Simon, J., Rowley, G., Bedmar, E.J., Richardson, D.J., Gates, A.J., and Delgado, M.J. (2016). Nitrous Oxide Metabolism in Nitrate-Reducing Bacteria. pp. 353–432.
- Trostchansky, A., Batthyány, C., Botti, H., Radi, R., Denicola, A., and Rubbo, H. (2001). Formation of lipid-protein adducts in low-density lipoprotein by fluxes of peroxynitrite and its inhibition by nitric oxide. *Arch. Biochem. Biophys.* **395**, 225–232.
- Trunk, K., Benkert, B., Quäck, N., Münch, R., Scheer, M., Garbe, J., Jänsch, L., Trost, M., Wehland, J., Buer, J., et al. (2009). Anaerobic adaptation in *Pseudomonas aeruginosa*: definition of the Anr and Dnr regulons. *Environ. Microbiol.* **12**, 1719–1733.
- Trusca, D., Scott, S., Thompson, C., and Bramhill, D. (1998). Bacterial SOS checkpoint protein Sula inhibits polymerization of purified FtsZ cell division protein. *J. Bacteriol.* **180**, 3946–3953.
- Turan, N.N., Ark, M., and Demiryurek, A.T. (2005). Comparison of spectrophotometric, HPLC and chemiluminescence methods for 3-nitrotyrosine and peroxynitrite interaction. *Arch. Pharm. Res.* **28**, 358–363.
- Valentini, M., and Filloux, A. (2016). Biofilms and Cyclic di-GMP (c-di-GMP) Signaling: Lessons from *Pseudomonas aeruginosa* and Other Bacteria. *J. Biol. Chem.* **291**, 12547–12555.
- Valentini, M., Laventie, B.-J., Moscoso, J., Jenal, U., and Filloux, A. (2016). The Diguanylate Cyclase HsbD Intersects with the HptB Regulatory Cascade to Control *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm and Motility. *PLOS Genet.* **12**, e1006354.
- Vázquez-Torres, A. (2012). Redox active thiol sensors of oxidative and nitrosative stress. *Antioxid. Redox Signal.* **17**, 1201–1214.
- van der Veen, S., and Tang, C.M. (2015). The BER necessities: the repair of DNA damage in human-adapted bacterial pathogens. *Nat. Rev. Microbiol.* **13**, 83–94.
- Vercammen, K., Wei, Q., Charlier, D., Dötsch, A., Haüssler, S., Schulz, S., Salvi, F., Gadda, G., Spain, J., Rybtke, M.L., et al. (2015). *Pseudomonas aeruginosa* LysR PA4203 Regulator NmoR Acts as a Repressor of the PA4202 nmoA Gene, Encoding a Nitronate Monooxygenase. *J. Bacteriol.* **197**, 1026–1039.

- Vilar, R.E., Ghael, D., Li, M., Bhagat, D.D., Arrigo, L.M., Cowman, M.K., Dweck, H.S., and Rosenfeld, L. (1997). Nitric oxide degradation of heparin and heparan sulphate. *Biochem. J.* *324* (Pt 2, 473–479.
- Vincent, J.L., Sakr, Y., Sprung, C.L., Ranieri, V.M., Reinhart, K., Gerlach, H., Moreno, R., Carlet, J., Le Gall, J.R., and Payen, D. (2006). Sepsis in European intensive care units: Results of the SOAP study. *Crit. Care Med.* *34*, 344–353.
- De Vos, P., and De Ley, J. (1983). Intra- and Intergeneric Similarities of *Pseudomonas* and *Xanthomonas* Ribosomal Ribonucleic Acid Cistrons. *Int. J. Syst. Bacteriol.* *33*, 487–509.
- Walsh, U.F., Morrissey, J.P., and O’Gara, F. (2001). *Pseudomonas* for biocontrol of phytopathogens: from functional genomics to commercial exploitation. *Curr. Opin. Biotechnol.* *12*, 289–295.
- Wang, D., Seeve, C., Pierson, L.S., and Pierson, E.A. (2013). Transcriptome profiling reveals links between ParS/ParR, MexEF-OprN, and quorum sensing in the regulation of adaptation and virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *BMC Genomics* *14*, 618.
- Watmough, N.J., Butland, G., Cheesman, M.R., Moir, J.W.B., Richardson, D.J., and Spiro, S. (1999). Nitric oxide in bacteria: synthesis and consumption. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* *1411*, 456–474.
- Watson, J.D., and Crick, F.H.C. (1953). A structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* *171*, 737–738.
- Wei, B., Huang, T., Dalwadi, H., Sutton, C.L., Bruckner, D., and Braun, J. (2002). *Pseudomonas fluorescens* encodes the Crohn’s disease-associated I2 sequence and T-cell superantigen. *Infect. Immun.* *70*, 6567–6575.
- Wei, Q., Le Minh, P.N., Dötsch, A., Hildebrand, F., Panmanee, W., Elfarash, A., Schulz, S., Plaisance, S., Charlier, D., Hassett, D., et al. (2012). Global regulation of gene expression by OxyR in an important human opportunistic pathogen. *Nucleic Acids Res.* *40*, 4320–4333.
- Wei, X., Lyu, S., Yu, Y., Wang, Z., Liu, H., Pan, D., and Chen, J. (2017). Phylloremediation of Air Pollutants: Exploiting the Potential of Plant Leaves and Leaf-Associated Microbes. *Front. Plant Sci.* *8*, 1318.
- Weitzberg, E., and Lundberg, J.O.N. (1998). Nonenzymatic Nitric Oxide Production in Humans. *Nitric Oxide* *2*, 1–7.
- Westfall, L.W., Carty, N.L., Layland, N., Kuan, P., Colmer-Hamood, J.A., and Hamood, A.N. (2006). *mvaT* mutation modifies the expression of the *Pseudomonas aeruginosa* multidrug efflux operon *mexEF - oprN*. *FEMS Microbiol. Lett.* *255*, 247–254.
- Whipps, J.M., Hand, P., Pink, D., and Bending, G.D. (2008). Phyllosphere microbiology with special reference to diversity and plant genotype. *J. Appl. Microbiol.* *105*, 1744–1755.
- Whittaker, M., Bergmann, D., Arciero, D., and Hooper, A.B. (2000). Electron transfer during the oxidation of ammonia by the chemolithotrophic bacterium *Nitrosomonas europaea*. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* *1459*, 346–355.
- WHO (2000). Air quality guidelines for Europe. *Environ. Sci. Pollut. Res.* *3*, 23–23.
- Wingreen, N.S. (2013). Ammonia Transport. *EcoSal Plus* *1*, 1–6.
- Winogradsky, S. (1890). Recherches sur les organismes de la nitrification. In *Annales de l’Institut Pasteur*, pp. 213-231,257-275,760-771.
- Winterbourn, C.C. (1995). Toxicity of iron and hydrogen peroxide: the Fenton reaction. *Toxicol. Lett.* *82–83*, 969–974.
- Wong, V., Levi, K., Baddal, B., Turton, J., and Boswell, T.C. (2011). Spread of

- Pseudomonas fluorescens* due to contaminated drinking water in a bone marrow transplant unit. *J. Clin. Microbiol.* **49**, 2093–2096.
- Woodmansee, A.N., and Imlay, J.A. (2003). A mechanism by which nitric oxide accelerates the rate of oxidative DNA damage in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **49**, 11–22.
- Yakovlev, V.A., and Mikkelsen, R.B. (2010). Protein tyrosine nitration in cellular signal transduction pathways. *J. Recept. Signal Transduct. Res.* **30**, 420–429.
- Yamamoto, M., Ueda, A., Kudo, M., Matsuo, Y., Fukushima, J., Nakae, T., Kaneko, T., and Ishigatsubo, Y. (2009). Role of MexZ and PA5471 in transcriptional regulation of mexXY in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol. Read. Engl.* **155**, 3312–3321.
- Yamauchi, R. (1997). Vitamin E: Mechanism of Its Antioxidant Activity. *Food Sci. Technol. Int. Tokyo* **3**, 301–309.
- Yang, L., Chen, L., Shen, L., Surette, M., and Duan, K. (2011). Inactivation of MuxABC-OpmB transporter system in *Pseudomonas aeruginosa* leads to increased ampicillin and carbenicillin resistance and decreased virulence. *J. Microbiol. Seoul Korea* **49**, 107–114.
- Yang, W.F., Hsing, H.J., Yang, Y.C., and Shyng, J.Y. (2007). The effects of selected parameters on the nitric oxide removal by biofilter. *J. Hazard. Mater.* **148**, 653–659.
- Ye, R.W., Averill, B.A., and Tiedje, J.M. (1994). Denitrification: production and consumption of nitric oxide. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 1053–1058.
- Ye, Y.Z., Strong, M., Huang, Z.-Q., and Beckman, J.S. (1996). Antibodies that recognize nitrotyrosine. In *Methods in Enzymology*, pp. 201–209.
- Yen, H.-W., Ho, S.-H., Chen, C.-Y., and Chang, J.-S. (2015). CO₂, NO_x and SO_x removal from flue gas via microalgae cultivation: A critical review. *Biotechnol. J.* **10**, 829–839.
- Yeo, W.S., Lee, J.H., Lee, K.C., and Roe, J.H. (2006). IscR acts as an activator in response to oxidative stress for the suf operon encoding Fe-S assembly proteins. *Mol. Microbiol.* **61**, 206–218.
- Yermilov, V., Rubio, J., and Ohshima, H. (1995). Formation of 8-nitroguanine in DNA treated with peroxyxynitrite in vitro and its rapid removal from DNA by depurination. *FEBS Lett.* **376**, 207–210.
- Yoon, S.S., Hennigan, R.F., Hilliard, G.M., Ochsner, U.A., Parvatiyar, K., Kamani, M.C., Allen, H.L., DeKievit, T.R., Gardner, P.R., Schwab, U., et al. (2002). *Pseudomonas aeruginosa* anaerobic respiration in biofilms: relationships to cystic fibrosis pathogenesis. *Dev. Cell* **3**, 593–603.
- Young, L.S., and Armstrong, D. (1972). *Pseudomonas aeruginosa* infections. *CRC Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* **3**, 291–347.
- Yuan, J., Doucette, C.D., Fowler, W.U., Feng, X.-J., Piazza, M., Rabitz, H.A., Wingreen, N.S., and Rabinowitz, J.D. (2009). Metabolomics-driven quantitative analysis of ammonia assimilation in *E. coli*. *Mol. Syst. Biol.* **5**.
- Zaffagnini, M., De Mia, M., Morisse, S., Di Giacinto, N., Marchand, C.H., Maes, A., Lemaire, S.D., and Trost, P. (2016). Protein S-nitrosylation in photosynthetic organisms: A comprehensive overview with future perspectives. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Proteins Proteomics* **1864**, 952–966.
- Zehr, J.P., Jenkins, B.D., Short, S.M., and Steward, G.F. (2003). Nitrogenase gene diversity and microbial community structure: a cross-system comparison. *Environ. Microbiol.* **5**, 539–554.
- Zeller, T., and Klug, G. (2006). Thioredoxins in bacteria: functions in oxidative stress response and regulation of thioredoxin genes. *Naturwissenschaften* **93**, 259–266.

Zhao, Y., Vanhoutte, P.M., and Leung, S.W.S. (2015). Vascular nitric oxide: Beyond eNOS. *J. Pharmacol. Sci.* *129*, 83–94.

Zheng, L., Cash, V.L., Flint, D.H., and Dean, D.R. (1998). Assembly of iron-sulfur clusters. Identification of an iscSUA-hscBA-fdx gene cluster from *Azotobacter vinelandii*. *J. Biol. Chem.* *273*, 13264–13272.

Zheng, M., Wang, X., Templeton, L.J., Smulski, D.R., LaRossa, R.A., and Storz, G. (2001). DNA microarray-mediated transcriptional profiling of the *Escherichia coli* response to hydrogen peroxide. *J. Bacteriol.* *183*, 4562–4570.

Zhuang, J.C., Lin, C., Lin, D., and Wogan, G.N. (1998). Mutagenesis associated with nitric oxide production in macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *95*, 8286–8291.

Zimmermann, A., Reimann, C., Galimand, M., and Haas, D. (1991). Anaerobic growth and cyanide synthesis of *Pseudomonas aeruginosa* depend on *anr*, a regulatory gene homologous with *fnr* of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* *5*, 1483–1490.

Zumft, W.G. (1992). The denitrifying prokaryotes. In *The Prokaryotes: A Handbook of the Biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification, Application*, 2nd Ed., A.A. Balows, H.G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder, and K.H. Schleifer, eds. (New York: Springer Verlag), pp. 554–582.

Zumft, W.G. (1997). Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR* *61*, 533–616.

Annexes

I. Communications orales

- Congrès National de la Société Française de Microbiologie (Paris), 2018

Nitrogen dioxide: only a simple diffusible gas or a potential antibacterial agent against *Pseudomonas fluorescens*? **S. Depayras**, T. Kondakova, H.J. Heipieper, M. Feuilloley, N. Orange, C. Duclairoir-Poc

- JED 2018, Rouen

Nitrogen dioxide: only a simple diffusible gas or a potential antibacterial agent against *Pseudomonas fluorescens*? **S. Depayras**, T. Kondakova, H.J. Heipieper, M. Feuilloley, N. Orange, C. Duclairoir-Poc

- Congrès National de la Société Française de Microbiologie (Paris), 2017 :

***Pseudomonas fluorescens* response to gaseous NO₂: adaptation and virulence.** **S. Depayras**, T. Kondakova, N. Merlet-Machour, H. J. Heipieper, M. Barreau, C. Catovic, M. Feuilloley, N. Orange & C. Duclairoir-Poc

- Air Pollution organisée par le Wessex Institut, Cadiz (Espagne), 2017 :

Impact of gaseous NO₂ on *P. fluorescens* strain in the membrane adaptation and virulence, **S. Depayras**, T. Kondakova, N. Merlet-Machour, H.J. Heipieper, M. Barreau, C. Catovic, M. Feuilloley, N. Orange, C Duclairoir-Poc.

- GDR-CNRS Cosm'actifs, Andé (France), 2016:

Évaluation du potentiel applicatif en cosmétique de biosurfactants microbiens sécrétés par des souches de *Pseudomonas fluorescentes* aéroportées, **S. Depayras**, J. Verdon, E. Portier, C. Loiseau, H. Toucourou, M. Barreau, F. Koltalo, J.M. Berjeaud, N. Orange, C. Duclairoir Poc

II. Publications

Premier auteur :

- **Impact of gaseous NO₂ on *P. fluorescens* strain in the membrane adaptation and virulence.** **S. Depayras**, T. Kondakova, N. Merlet-Machour, H.J. Heipieper, M. Barreau, C. Catovic, M. Feuilloley, N. Orange, C. Duclairoir-Poc, *International Journal of Environmental Impacts*, 1, 2018, DOI :10.2495/EI-V1-N2-183-192

- **The hidden face of Nitrogen oxides species – from toxicity effect to potential cure?** **S. Depayras**, T. Kondakova, H. J. Heipieper, M.G.J. Feuilloley, N. Orange and C. Duclairoir-Poc, *InTechOpen*, 2018, <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.75822>
- **Production of Viscosinamides by the Clinical Strain of *Pseudomonas fluorescens* MFN1032: Potential Involvement in Biofilm Development, Virulence, and Communication**, **S. Depayras**, A. Merieau, M. Barreau, T. Kondakova, C. Barbey, H. Toucourou, M. Feuilloley, N. Orange, C. Duclairoir-Poc, *Scientific Report* (en cours de soumission)
- **The modulation of antibiotic resistance as a consequence of NO₂ induced membrane permeability in *P. fluorescens*?**, **S. Depayras**, T. Chautrand, T. Kondakova, D. Souak, R. Duchenes, H.J. Heipieper, Y. Konto, J. Hardouin, M. Gallique, A. Merieau, E. Bouffartigues, M.G.J. Feuilloley, N. Orange, C. Duclairoir-Poc, *Scientific Report*. (en cours de soumission)
- **Some elements on detoxification pathway in *P. fluorescens* under nitrosative stress**, **S. Depayras**, T. Chautrand, T. Kondakova, M.G.J. Feuilloley, N. Orange, C. Duclairoir-Poc, *Scientific Report* (en cours de soumission)

Autre :

- **Armadillidin H, a Glycine-Rich Peptide from the Terrestrial Crustacean *Armadillidium vulgare*, Displays an Unexpected Wide Antimicrobial Spectrum with Membranolytic Activity**, J. Verdon, P. Coutos-Thevenot, M. H. Rodier, C. Landon, **S. Depayras**, Cyril Noel, Sylvain La Camera, Bouziane Moumen, P. Greve, Didier Bouchon, J. M. Berjeaud and C. Braquart-Varnier, *Frontiers in Microbiology*, 7,pp.1484-, 2016, DOI: 10.3389/fmicb.2016.01484
- **The absence of SigX results in impaired carbon metabolism and membrane fluidity in *Pseudomonas aeruginosa***. Flécharde M, Duchesne R, Tahrioui A, Bouffartigues E, **Depayras S**, Hardouin J, Lagy C, Maillot O, Tortuel D, Azuama CO, Clamens T, Duclairoir-Poc C, Catel-Ferreira M, Gicquel G, Feuilloley MGJ, Lesouhaitier O, Heipieper HJ, Groleau MC, Déziel É, Cornelis P, Chevalier S. *Scientific Report*, 2018 Nov 21;8(1):17212. DOI: 10.1038/s41598-018-35503-3.
- **Highlighting the Potency of Biosurfactants Produced by *Pseudomonas* Strains as Anti-*Legionella* Agents**. Loiseau C, Portier E, Corre MH, Schlusshuber M, **Depayras S**, Berjeaud JM, Verdon J., *Biomed Res Int*. 2018 Oct 22;2018:8194368. DOI: 10.1155/2018/8194368.

- **Mechanism of action of the moonlighting protein EfTu as a Substance P sensor in *Bacillus cereus***, A. N'Diaye, V. Borrel, P.J. Racine, T. Clamens, **S. Depayras**, O. Maillot, B. Schaack, S. Chevalier, O. Lesouhaitier, M.G.J. Feuilloley, *Scientific Report*, (en cours de publication)

III. Posters

- **Congrès National de la Société Française de Microbiologie (Paris), 2017 :**
 - **Investigation in the roles of viscosinamides produced by *Pseudomonas fluorescens***. **S. Depayras**, A. Merieau, M. Barreau, T. Kondakova, C. Barbey, H. Toucourou, M. Feuilloley, N. Orange, C. Duclairoir-Poc
- **FEMS, Valence (Espagne), 2017**
 - **Impact of gaseous NO₂ on *P. fluorescens* strain in the membrane adaptation and virulence**. **S. Depayras**, T. Kondakova, N. Merlet-Machour, H.J. Heipieper, M. Barreau, C. Catovic, M. Feuilloley, N. Orange, C. Duclairoir-Poc.
 - **Investigation in the potential roles of viscosinamides produced by *P. fluorescens***. **S. Depayras**, A. Merieau, M. Barreau, T. Kondakova, C. Barbey, H. Toucourou, M. Feuilloley, N. Orange, C. Duclairoir-Poc
- **Journée de l'Ecole Doctorale, Le Havre, 2017 (Prix du meilleur poster) :**
 - **Impact of gaseous NO₂ on *P. fluorescens* strain in the membrane adaptation and virulence**. **S. Depayras**, T. Kondakova, N. Merlet-Machour, H.J. Heipieper, M. Barreau, C. Catovic, M. Feuilloley, N. Orange, C. Duclairoir-Poc.

Exemples de Posters:



INVESTIGATION IN THE POTENTIAL ROLES OF VISCOSINAMIDES PRODUCED BY *P. FLUORESCENS*

S. DEPAYRAS¹, A. MERIEAU¹, M. BARREAU¹, T. KONDAKOVA^{1,2}, C. BARBEY^{1,3}, H. TOUCOUCROU¹, M. FEUILLOLEY¹, N. ORANGE¹, C. DUCLAIR-POC¹

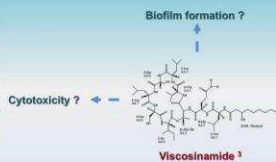
¹ Laboratory of Microbiology Signals and Microenvironment EA 4312, Normandy Univ., University of Rouen, S6Sa, Evreux, France
² Cronan Lab, Department of Microbiology, University of Illinois, Urbana, USA
³ Seeds Innovation Protection Research and Environment (SIPRE), Rue des Champs Potez, Achicourt, France

Contacts : segolene.depuyras@etu.univ-rouen.fr, cecile.duclairoir@univ-rouen.fr



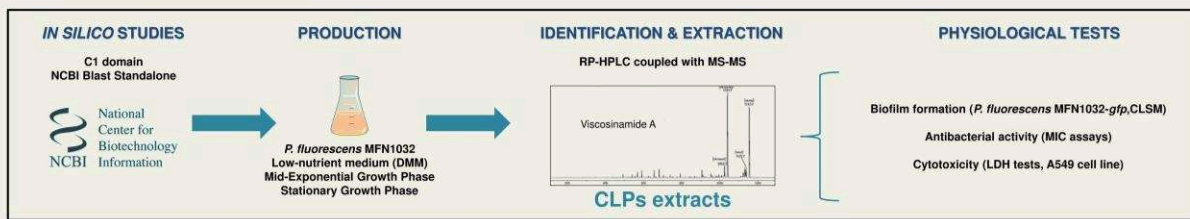

Introduction:

Pseudomonas species are widely spread in the environment which suggest their high adaptability¹. Among *Pseudomonas* spp., the genus *fluorescens* is more abundant and some of this strains are able to produce biosurfactants named cyclic lipopeptide (CLPs)¹. Several applications could be found for those compounds thanks to their low toxicity and high biodegradability².



However few studies focus on the potential role of cyclolipopeptides (CLPs), unlike well-known rhamnolipids. We investigated here new potential functions of viscosinamides, CLPs produced by a clinical *P. fluorescens* strain MFN1032. We focused on their implication in colonization and virulence toward eukaryotic and prokaryotic cells


Material and methods:



Results:

BIOPINFORMATIC SCREENING

Phylogenetic analysis of the putative C1 domain of *P. fluorescens* MFN1032 using NCBI Blast.



➢ High similarity between C1 domain of *P. fluorescens*

CLPs IDENTIFICATION


Identification by HTLC coupled with MALDI-TOF MS Imaging⁴

Retention time (min)	Retention time (min)	R _f (score)	Relative abundance (%)
3111.7	Viscosinamide B	45.0 ± 0.7	5
3125.7	Viscosinamide C	-	-
3125.7	Viscosinamide A	48.3 ± 0.9	92
3153.5	S	52.8 ± 0.6	1
3153.6	Viscosinamide D	55.7 ± 0.5	2

➢ Viscosinamide A : major CLP produced
➢ CLP production since the mid-exponential phase

INTERACTION WITH ABIOTIC SURFACE

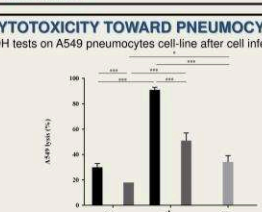
Observation of the biofilm formation under static conditions of MFN1032-*gfp* in low-nutrient medium (DMM) using CLSM



➢ Early apparition of prominences (2h)
➢ Observation of supracellular architectures of macrocolony biofilms

CYTOTOXICITY TOWARD PNEUMOCYTES

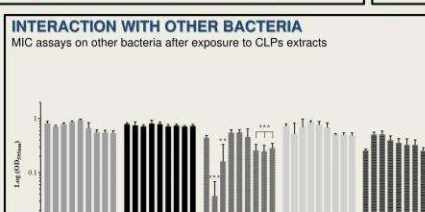
LDH tests on A549 pneumocytes cell-line after cell infection



➢ Limited lysis observed with CLP extracts of *P. fluorescens* MFN1032
➢ CLP : a virulence factor

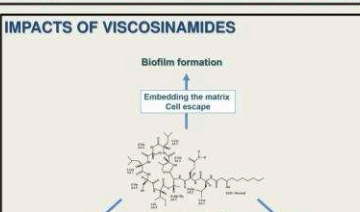
INTERACTION WITH OTHER BACTERIA

MIC assays on other bacteria after exposure to CLPs extracts



➢ Increase of the growth of *S. epidermidis* : metabolism?
➢ Decrease of the growth of *E. faecalis* : antibacterial effect?

IMPACTS OF VISCOSINAMIDES



➢ Biofilm formation (Embedding the matrix, Cell escape)
➢ Cytotoxicity (Toward pneumocytes)
➢ Antibacterial properties (Toward Gram+ bacteria)

Conclusion:

P. fluorescens MFN1032 produces abundantly viscosinamide A and poorly other viscosinamides. CLPs contribute in embedding the matrix but also take part in the escape of asocial cells out of microcolonies by motility alteration. CLPs extracts promote a limited lysis of pneumocytes compared to the cell-free supernatant emphasizing the potential contribution of CLPs in the cytotoxicity of the strain. Moreover, CLP extracts induce an alteration of the growth of Gram positive bacteria.

Impact of gaseous NO₂ on *P. fluorescens* strain in the membrane adaptation and virulence

S. DEPAYRAS¹, T. KONDAKOVA^{1,2}, N. MERLET-MACHOUR³, H.J. HEIPIEPER⁴, M. BARREAU¹, C. CATOVIC¹, M. FEUILLOLEY¹, N. ORANGE¹, C. DUCLAIRIOIR-POC¹

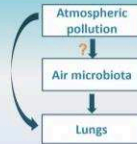
Int. J. Environ. Impacts, Vol. 1, No. 3 (2018) 1-10

¹Laboratory of Microbiology Signals and Microenvironment EA 4312, Normandie Univ., Univ. Rouen, IRIB, 27000 Evreux, France
²Cronan Lab, Department of Microbiology, University of Illinois, Urbana, USA
³Team Modified to Surface and Interface Analysis (SIMA), UMR 6014 COBRA, Normandy Univ., Univ. Rouen, 55 rue St Germain, 27000 Evreux, France
⁴Department of Environmental Biotechnology, UFZ Helmholtz Centre for Environmental Research, Permoserstr. 15, 04318 Leipzig, Germany

Contacts : segolene.depuyras@etu.univ-rouen.fr, cecile.duclairoir@univ-rouen.fr

Introduction:

Nowadays air pollution is clearly increasing due to anthropogenic activity despite more drastics regulations. Among all air pollutants, Nitrogen oxides (NOx), such as NO and NO₂, are predominant. It is well-known that these compounds exhibit direct high toxic effects on human health especially on skin and lung^{1,2}. However microorganisms are also exposed to them, but their synergy with microorganisms on microbial virulence is still not stated.



In this study, we tried to evaluate the response of an airborne strain of *P. fluorescens*, MFAF76a³ to a two hours exposure at 45ppm NO₂. The physiological behavior of the strain was measured using cultivability and growth kinetics. Moreover the membrane adaptation was assessed thanks to permeabilization tests and lipidomic studies. Then virulence factors such as biofilm formation and antibiotic resistance were studied.

Material and methods:

EXPOSURE PROTOCOL

EVALUATION of exposed bacteria compared to the control

- Cultivability
- Growth kinetics
- Live Dead
- Lipidomic
- Transcriptomic
- Biofilm formation

EXPOSURE CHAMBER

Results:

CULTIVABILITY

Quantification of colony forming units (CFU) from bacterial suspension

➤ Reduction of one log by NO₂

PHYSIOLOGY

Growth kinetics of bacteria after exposure

➤ Increase of lag phase and generation time of the growth of exposed bacteria

VIABILITY

Observation of membrane permeability through Live Dead tests (PI and SYTO9) using confocal microscopy

➤ More labelling with Propidium iodide → membrane permeability increased?
 ➤ Presence of bacterial amasses → parietal stress ?⁴

LIPIDOMIC STUDY⁵

Analysis of Glycerophospholipids (GP) content using HPTLC MALDI-TOF MS/MS

R _f	GP	Control	45 ppm NO ₂
0.62 ± 0.03	PG	PG [18.0 + 16.1] PG [16.0 + 18.1]	PG [18.0 + 16.1] PG [16.0 + 18.1]
0.43 ± 0.02	PE	PE [16.0 + 16.1] PE [16.0 + 17.1] PE [16.0 + 18.1]	PE [16.0 + 16.1] PE [16.0 + 17.1] PE [16.0 + 18.1]
0.26 ± 0.02	UGP	UGP [16.0 + 17.0] UGP [18.0 + 18.0] UGP [17.1 + 18.0]	None
0.24 ± 0.01	PC	PC [18.0 + 16.1] PC [16.0 + 18.1]	PC [18.0 + 16.1] PC [16.0 + 18.1]

➤ No modification of fatty acids insaturation
 ➤ Lack of an Unknown Glycerophospholipid (UGP) after exposure at 45ppm

BIOFILM FORMATION⁵

24h biofilm observed by confocal microscopy and image analysis using a Zeiss LSM710 confocal microscope and the Comstat2 software

Control

3D/z
2D

Max Thickness (µm): 9.25 ± 1.43
Total Biomass (µm³·µm⁻²): 0.64 ± 0.18

45ppm of NO₂

3D/z
2D

Max Thickness (µm): 22.50 ± 1.22
Total Biomass (µm³·µm⁻²): 0.78 ± 0.24

➤ Modification of the sessile structure by NO₂
 ➤ Presence of prominences → parietal stress?

TRANSCRIPTOMIC⁵

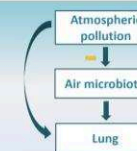
RT-qPCR analysis on RND efflux pump correlated with MIC assays

NO ₂ concentration (ppm)	Ciprofloxacin MIC (µg/mL)	Chloramphenicol MIC (µg/mL)
Control	6.25	50
45ppm	12.5	>100

➤ Increase of the expression of genes related to antibiotic resistance, specifically for fluoroquinolone resistance

Conclusion:

Deleterious effects of NO₂ (45ppm, 2h) were noticed for an airborne strain *Pseudomonas fluorescens* MFAF76a, with an important loss of cultivability and an increased lag-phase of the growth kinetics. A significant alteration of the membrane permeability was observed. However no significant modification of glycerophospholipids content was measured except for an Unknown Glycerophospholipid (UGP). The exposed strain seems to form more prominences highlighting the heterogeneity in the biofilm structure.



For virulence factors, NO₂ exposure increases the resistance of MFAF76a for fluoroquinolones confirmed by transcriptomic analysis and MIC assays. Now our project is focused on the impact of lower concentration of NO₂ mimicking the daily pollution rate which could be less toxic for bacteria. In such conditions, more phenotypes related to virulence and adaptability could be enhanced.

54, rue de Pannette, Appt 63, 27000 EVREUX
segolene.depayras@gmail.com
+33(0) 7.68.67.84.71
Née le 22 Avril 1991
Permis B



Ségolène DEPAYRAS

 <https://www.linkedin.com/in/s%C3%A9gol%C3%A8ne-depayras-434a666b/>
 https://www.researchgate.net/profile/Segolene_Depayras

Parcours professionnel



- 2018 Contrat d'ATER à temps plein (Section CNU 64/65)**
Laboratoire de Microbiologie - Signaux et Microenvironnement, EA4312, Université de Rouen Normandie, IUT d'Evreux
- 2019 Thèse en microbiologie sous la direction de Nicole Orange (Pr) et co-encadrée par Cécile Duclairoir-Poc (MCU)**
Laboratoire de Microbiologie - Signaux et Microenvironnement, EA4312, Université de Rouen Normandie
« NO₂BACTAIR : Exposition au polluant automobile NO₂, adaptation d'une BACTérie Aéroportée via son homéostasie membranaire et sa virulence »
- 2015 Stage de Master 2 recherche sous la direction de Julien Verdon (MCF)**
Laboratoire Écologie et Biologie des Interactions, UMR CNRS 7267, Université de Poitiers
« Identification de composés volatiles microbiens ainsi que leurs voies de production et étude de leurs effets sur *Legionella pneumophila* »
- 2014 Stage volontaire d'un mois sous la direction d'Annabelle MÉRIEAU (Dr)**
Laboratoire de Microbiologie - Signaux et Microenvironnement, EA4312, Université de Rouen Normandie
« Approches génétiques de la production de molécules volatiles antimicrobiennes produites par *Pseudomonas fluorescens* ».
- 2014 Stage de Master 1 de deux mois sous la direction de Julien Verdon (MCF)**
Laboratoire Écologie et Biologie des Interactions, UMR CNRS 7267, Université de Poitiers
« Approche moléculaire de l'interférence à longue distance entre *Pseudomonas sp* et *Legionella sp* physiquement séparées »
- 2013 Stage de Licence de deux mois sous la direction de Clarisse Vandebrouck (MCU)**
Laboratoire Signalisation et Transports Ioniques Membranaires CNRS ERL 7368, Université de Poitiers
« Immuno-localisation des 6 isoformes de canaux cationiques TRPV dans des cellules non mucoviscidiques et mucoviscidiques »

Formations



- 2015-18 Thèse en microbiologie**, Université de Rouen
- 2013-15 Master Physiologie, Neurosciences, Biologie Cellulaire et Moléculaire**, (Mention Bien) Université de Poitiers
- 2010-13 Licence Physiologie Animale et Neurosciences** (Mention Assez-Bien), Université de Poitiers
- 2009-10 Classe préparatoire Biologie, Chimie, Physique et Sciences de la Terre**, Lycée Camille Guérin, Poitiers
- 2009 Baccalauréat Scientifique Spécialité Biologie**, Mention Assez-Bien, Lycée Gay Lussac, Limoges

Divers



- Langues** Anglais : Expression et compréhension écrite et orale (**Score TOEIC : 830**, 2014)
Allemand : Connaissance de base (**Sprachdiplom niveaustufe B1**, 2008)
- Associatif** **Vice-trésorière** et **Webmaster** de l'Association Génération Bio-Santé (Poitiers, 2015-13)

Compétences scientifiques et techniques



Microbiologie	Culture de bactéries (niveau de sécurité 1 & 2), Tests d'interaction ; CMI ; Suivi de croissance
Biologie Cellulaire et Physiologie	Culture cellulaire ; Manipulation d'animaux ; Technique d'organes isolés, Test MTT/LDH
Biologie moléculaire	Extraction et purification d'ADN et d'ARN ; PCR et RTqPCR ; Séquençage (Sanger); Mutagenèse dirigée et aléatoire ; Western Blot
Biochimie	HPTLC MALDI-TOF MS-MS, GC-MS ; SPME ; Extraction de lipides, protéines et de biosurfactant
Imagerie	Microscopie confocale ; Microscopie à épifluorescence ; Microscopie électronique
Immunologie	Immunofluorescence
Bioinformatique	Représentation de données (Pack Office, GraphPad Prism) ; Analyse bioinformatique (Blast Standalone, Serial Cloner, Primer express, myRast, Chromas Lite) ; Biostatistiques (Programmation R, PAST3); Gestion de la bibliographie (Mendeley, Zotéro, Pubmed); Planification (Gantt, Microsoft Project), Traitement d'image (GIMP2)
Autres	Habilitation à la conduite d'autoclave, Manipulation de bouteilles de gaz, Risques chimiques, Risques biologiques, Chargé d'évacuation

Référents



Cécile Duclairoir-Poc (MCU)
cecile.poc@univ-rouen.fr
+33(0)2 32 29 15 00

Julien Verdon (MCF)
julien.verdon@univ-poitiers.fr
+33 (0)5 49 45 36 93

Étude des mécanismes de détection, d'adaptation et de protection d'une souche de *Pseudomonas fluorescens* isolée de l'air en réponse au NO₂ gazeux, marqueur de pollution automobile

Les polluants atmosphériques de type oxydes d'azote (NO_x), principalement constitués du NO, NO₂ et leurs dérivés, représentent une énorme menace d'un point de vue environnemental et sanitaire. Leurs propriétés chimiques sont largement exploitées à l'échelle du vivant pour leur rôle dans divers processus de signalisation (systèmes nerveux et cardiovasculaire) ou l'élimination de pathogènes (système immunitaire). Néanmoins, des dérégulations dans la production cellulaire ou l'apport exogène de ces composés est à l'origine de nombreuses pathologies humaines (e.g. pulmonaires), généralement attribuées à la pollution. Toutefois, un grand nombre de microorganismes aéroportés sont continuellement exposés à ces composés délétères, intimement connectés aux espèces réactives de l'oxygène (ROS). Ainsi l'hypothèse de l'ensemble de ce travail a porté sur l'impact du NO₂, NO_x majoritairement retrouvés dans l'atmosphère, sur une souche aéroportée de *P. fluorescens*, espèce désormais associée aux voies aériennes et potentiellement pathogène.

À l'issue d'une exposition à 45 ppm de NO₂, la survie de *P. fluorescens* MFAF76a est significativement impactée suggérant un effet bactériostatique, conforté par l'impact observé sur le métabolisme énergétique. De plus, le NO₂ induit un stress d'enveloppe via la perte d'un glycérophospholipide (UGP) et le remaniement de divers composants membranaires (LPS, peptidoglycane, acides gras). La pompe à efflux MexEF-OprN semblent participer à la stabilisation de la membrane et pourraient être également impliquée dans l'efflux des oxydes d'azotes, mécanismes confortés par l'étude d'un mutant MFAF76a- Δ *oprN*. La porine majoritaire OprF semble également contribuer à la stabilisation de la membrane externe, néanmoins son implication reste à confirmer. De plus, une interconnexion entre ROS et NO_x dans la signalisation (OxyR, IscR), et les mécanismes de détoxification, a été observée. La flavohémoprotéine Hmp semble être un élément crucial dans la détoxification des NO_x chez *P. fluorescens* comme l'illustre un mutant MFAF76a- Δ *hmp*. Les similitudes importantes entre les effets connus du NO et ceux observés lors d'une exposition au NO₂ suggèrent une conversion non enzymatique du NO₂, une fois pénétré dans la cellule, en NO. Désormais, une étude plus approfondie est nécessaire afin de décrypter (i) les mécanismes impliqués dans la régulation de la pompe à efflux RND MexEF-OprN et de la flavohémoprotéine Hmp, (ii) d'autres acteurs intervenant dans la réponse au stress d'enveloppe et la détoxification ainsi que (iii) le devenir de NO₂ dans la cellule.

Mots clés : NO_x, *P. fluorescens*, stress d'enveloppe, antibiorésistance, détoxification

Decrypting detection, adaptation and protection mechanisms of an airborne *Pseudomonas fluorescens* strain in response to gaseous NO₂, an automobile pollution marker

Nitrogen oxides (NO_x) atmospheric pollutants, mainly constituted of NO, NO₂ and derived compounds, are a big threat to the environment and health. Their chemical properties are largely exploited at the cellular scale for their role in diverse physiological processes such as signalisation (nervous and cardiovascular systems) or in pathogens eradication (immunity system). However, dysregulation in production pathways or exogenous input of these compounds lead to several pathologies (e.g. respiratory diseases), usually attributed to atmospheric pollution. However, a wide range of airborne microorganisms are constantly exposed to these deleterious compounds, intimately connected to reactive oxygen species (ROS). Thus, the hypothesis of this work deals with the impact of NO₂, the main atmospheric NO_x, on an airborne *P. fluorescens*, a strain usually neglected but yet associated with human airways, and potentially pathogenic.

Following an exposure to 45 ppm of NO₂, the survival of *P. fluorescens* MFAF76a is severely impaired, suggesting a bacteriostatic effect, as comforted by NO₂ impact on energetic metabolism. Moreover, an exposure to NO₂ induces an envelope stress through the loss of an Unknown Glycerophospholipid (UGP) and the reorganisation of membrane constituents (LPS, peptidoglycan, fatty acids). The efflux pump MexEF-OprN is involved in membrane stabilization and could also efflux NO_x, as highlighted by a MFAF76a- Δ *oprN* mutant. The major porin OprF could also contribute in external membrane stabilisation, however its implication is still under investigation. Moreover, ROS and NO_x are interconnected as illustrated by their shared signalisation (OxyR, IscR) and detoxification pathways. The flavohemoprotein Hmp is a crucial element in the detoxification of NO_x in *P. fluorescens* as illustrated in an MFAF76a- Δ *hmp* mutant. The similarities between the known effects of NO and those observed in the case of an exposure to NO₂, suggest a non-enzymatic conversion of NO₂, following cell penetration, into NO. Henceforth, deeper studies are required to decode (i) the mechanisms involved in the regulation of the RND efflux pump MexEF-OprN and the flavohemoprotein Hmp, (ii) other relevant actor implicated in the envelope stress response and in detoxification pathways as well as (iii) the fate of NO₂ within the cell.

Keywords : NO_x, *P. fluorescens*, envelope stress, antibiotic resistance, detoxification