Clonage et modification du génome de Mycoplasma hominis dans la levure Saccharomyces cerevisiae

Fabien Rideau

▶ **To cite this version:**

Fabien Rideau. Clonage et modification du génome de Mycoplasma hominis dans la levure Saccharomyces cerevisiae. Médecine humaine et pathologie. Université de Bordeaux, 2018. Français. NNT : 2018BORD0227 . tel-02138642

HAL Id: tel-02138642
https://theses.hal.science/tel-02138642

Submitted on 24 May 2019

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 PRÉSENTÉE

POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ

SPÉCIALITÉ MICROBIOLOGIE - IMMUNOLOGIE

Par Fabien RIDEAU

Clonage et modification du génome de *Mycoplasma hominis* dans la levure *Saccharomyces cerevisiae*

Sous la direction de : Cécile BÉBÉAR

Soutenue le 15 novembre 2018

Membres du jury :

M. BLANCHARD Alain, Professeur à l'Université de Bordeaux	Président
M. RODRIGUE Sébastien, Professeur agrégé à l'Université de Sherbrooke (Canada)	Rapporteur
Mme TARDY Florence, Directeur de Recherche à l'ANSES de Lyon	Rapporteur
Mme DORDET-FRISONI Émilie, Chargée de Recherche à l'INRA de Toulouse	Examinateur
Mme LARTIGUE Carole, Chargée de Recherche à l'INRA de Bordeaux	Invitée
Mme BÉBÉAR Cécile, PU-PH à l'Université de Bordeaux	Directeur de thèse

Pour ce qui est de l'avenir, il ne s'agit pas de le prévoir mais de le rendre possible.
(Antoine de Saint-Exupéry, 1900-1944)

REMERCIEMENTS

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier ma directrice de thèse, Madame le Professeur Cécile Bébéar, Directeur de l'USC EA3671, Infections humaines à mycoplasmes et chlamydiae de l'Université de Bordeaux. Merci de m'avoir accueilli, de m'avoir donné la chance de faire partie de l'équipe pendant trois ans, merci pour la confiance que vous m'avez témoignée et pour l'autonomie que vous m'avez accordée. Merci pour votre présence et votre réactivité, malgré vos multiples obligations et votre emploi du temps chargé. Cela a été un immense plaisir de travailler et d'apprendre avec vous pendant ces années, soyez assurée de mes plus sincères remerciements.

J'adresse mes remerciements à Monsieur le Professeur Alain Blanchard, directeur de l'Institut des Sciences de la Vigne et du Vin, pour l'honneur d'avoir accepté de juger mon travail et de présider mon jury de thèse. Merci également pour votre aide et votre collaboration durant ces trois années.

Je remercie Monsieur le Professeur Sébastien Rodrigue du département de Biologie de l'Université de Sherbrooke (Canada) de me faire l'honneur de participer et de juger mes travaux de thèse en étant rapporteur de mon travail.

Je remercie Madame le Docteur Florence Tardy, Directeur de recherche de l'UMR Mycoplasmoses des ruminants à l'ANSES de Lyon pour l'honneur que vous me faites en acceptant d'être rapporteur de ma thèse et de juger mon travail.

J'adresse mes remerciements à Madame le Docteur Emilie Dordet-frisoni, Chargé de recherche à l'ENVT de Toulouse, pour l'honneur que vous me faites en acceptant d'être examinateur de ma thèse et de juger mon travail.

Je tiens à remercier Madame le Docteur Carole Lartigue, Chargé de recherche à l'INRA de Villenave d'Ornon pour l'honneur que tu me fais en participant à mon jury de thèse. Je tiens à te remercier pour ton aide durant ces trois années, pour tout ce que tu m'as apporté, humainement et scientifiquement. Merci pour tout ton soutien, pour tous tes commentaires toujours pertinents, pour m'avoir permis de venir travailler avec toi, pour m'avoir aiguillé et pour toutes ces discussions passionnées sur les mycoplasmes. Merci pour ta gentillesse, ce fut un réel plaisir de travailler et d'apprendre avec toi, et sois assurée de l'estime que je te porte.

Je voudrais tout d'abord remercier toute l'équipe du laboratoire USC EA 3671 IHMC, pour son accueil, sa sympathie, sa gentillesse, son soutien, son aide, je n'ai pas les mots pour témoigner ma reconnaissance et mon amitié. Chloé, ma binôme, ma partenaire, toujours là quand il faut, merci de ton aide, j'ai beaucoup appris pendant ces trois ans grâce à toi, merci pour les pauses café, les pauses brainstorming, les petites astuces sur power point :P, merci pour les espaces insécables, pour ton travail à mes côtés sur notre projet, vraiment merci pour tout, je sais que nos chemins ne se sépareront pas à la fin de ma thèse, sois assurée de ma profonde amitié (J'en profite pour remercier Cédric le maitre pour les soirées foot et les conseils course à pied). Bribri, merci pour ta gentillesse, ton écoute, pour tous ces moments où tu es là pour les autres et où tu as aussi été là pour moi, tant dans le professionnel que dans le personnel, je n'oublierai pas que dans la vie, le but c'est d'être heureux, un seul mot, merci (Et merci pour l'horoscope du midi aussi ah ah). Cécilau, merci pour ta compagnie, tous ces fous rires, ces débats, ton écoute, ta gentillesse, reste comme tu es (et merci pour l'apprentissage

des bonnes manières et de la langue française, ainsi que pour les expérimentations sur la carbo). Merci à Arabella, toujours dans les bons plans commérages, bières ou badminton. Merci à Nadège (et à Yannick pour les soirées films et séries ☺) et Marie, pour votre sympathie et les discussions toujours animées du midi☺. Merci à Angélique, ma très bonne voisine de bureau depuis ces derniers mois (malgré le bruit que tu fais avec tes enveloppes☺). Merci à Sabine, pour tes conseils et ta gentillesse, merci à Olivia (même si je sais que le bruit de la hotte est assez pénible ah ah), merci à Elodie, Bertille, Alexandra et Julien (même si je n'ai pas eu l'occasion de te côtoyer très longtemps ce fut un plaisir à chaque fois). Merci à Hélène, de m'avoir initié à la culture des mycoplasmes à mon arrivée. Enfin merci aux personnes de passage, notamment Maxime et Chloé. Ce n'est pas simple de remercier en écrivant mais, réellement je voudrais tou(te)s vous dire à quel point je suis reconnaissant pour ces trois belles années, qui n'auraient pas été les mêmes sans votre présence.

Je tiens à remercier sincèrement mes petits stagiaires, supervisés au cours de ces trois ans, mes petits padawans, Gabrielle, Thomas, Pauline, j'espère avoir réussi à vous apprendre quelques toutes petites choses tout de même ; autant que j'ai pu apprendre de vous lors de votre venue. Je sais que nous continuerons à nous croiser autour d'un verre ou d'un terrain de badminton.

J'adresse également tous mes remerciements à l'équipe molli, de l'UMR BFP de l'INRA de Villenave d'Ornon. Merci pour votre accueil lors de mes passages, et de votre gentillesse pour faire en sorte que je sois toujours à l'aise à vos côtés. Merci à Carole, à Pascal et Laure B. pour des discussions toujours pertinentes et intéressantes, merci à Alain, GG et Yonathan. Merci à Estelle, les deux Vincent, Luis et Iason (pour tes précieux conseils sur les CRISPR). Merci à vous d'avoir été là durant cette épreuve qu'est la thèse, pour toute la décontraction que vous m'avez apportée.

Merci au laboratoire du Professeur Philippe Lehours de m'avoir permis de venir doser des acides nucléiques pendant ces années de thèse et merci à Brigitte Tauzin pour tes conseils, ta sympathie et ton aide lors des manips de séquençage.

J'ai une pensée pour le laboratoire MycSA de l'INRA de Villenave d'Ornon, merci à toutes les personnes qui m'ont vu passer et permis de grandir dans le monde de la recherche lors de mes stages de master. Merci à Enric, toi qui m'a enseigné toutes les bonnes pratiques de laboratoire et qui m'a donné goût à la biologie moléculaire. Merci à mes deux chefs Nadia et Florence, toujours là pour me pousser et me faire donner le meilleur de moi-même, merci de m'avoir donné goût à la recherche. Une pensée particulière pour les docteurs Ccori, Léa et Benoit, c'est aussi grâce à vous que j'en suis là actuellement, vous qui m'avez fait part de vos expériences personnelles pour me donner envie de rejoindre la grande aventure qu'est la thèse. Un grand merci vraiment.

J'aimerais remercier les copains thésards, avec qui j'ai eu le plaisir de partager cette épreuve, Paô, Marion-Michelle, Caro, Nono, Margot et Bastien. Merci pour les galères, les soirées, et les discussions autour de ces trois années de dur labeur.

Je tiens à remercier tous les membres actifs de l'association 2D2B, pour laquelle j'ai eu l'occasion d'œuvrer, merci particulièrement aux deux Julien, Clément, Pauline, Julie et aux autres membres.

Merci aux membres du conseil scientifique de l'Ecole Doctorale, pour nous avoir permis de sortir de notre labo pour assister aux réunions, aux débats, tout en prenant en compte nos avis de doctorants.

D'un point de vue extra-professionnel, je tiens réellement à remercier tous les copains, pour avoir essayé de comprendre plus ou moins ce que je faisais durant ma thèse (sans forcément un grand succès), merci de m'avoir permis de me relaxer, un grand merci aux potes de Tours, particulièrement le Gang Artour pour sa présence lors de mes remontées dans le Nord, merci à tou(te)s les Biogosses. Merci à mes frérots, Aurel, Thomas, Eddy, Bastien, Freddy et à ma binôme pour leur présence malgré la distance (bon ok Thomas la distance pas tellement, mais aux chiottes l'OM quand même) et merci à leur petite femme. Un réel merci à Julie pour avoir partagé une partie de cette aventure avec moi. Merci à tous les autres, Gad, Juliette, Victor, Yaya, Estelle, Lucie, PH, Jenoch etc. Je pourrais tous vous citer mais ça en deviendrait bien trop long pour les gens qui se seraient déjà amusés à lire ces lignes de remerciements jusque-là. Merci à vous tous pour avoir su rythmer ces années (et surtout mes weekends et mes soirées).

J'ai une pensée pour les copains du bad, Lison, François, Séb et Axelle, pour m'avoir permis de me défouler sur eux après les journées de travail. Un énorme merci à Mann Chev, ma coach et partner de course à pied, pour m'avoir permis de réaliser le marathon pendant la thèse.

Un merci tout particulier à Marie, pour ta présence et ton soutien lors de la dernière ligne droite (et pour Netflix aussi).

J'aimerais (presque) terminer en remerciant ma famille, sans laquelle je n'aurais pas réussi, pour leur amour, leur soutien, et pour m'avoir permis d'en arriver là. Un grand merci à mes parents, Véronique et Joël, pour avoir toujours cru en moi, à mon frère Séb, mon pilier toujours présent (Et à Marion aussi, ma petite belle-sœur), mes grands-parents, Jean-Luc. Je vous aime et j'espère vous rendre fiers.

Je voudrais dédier cette thèse à Claudine, partie bien trop tôt, en nous laissant un immense vide.

Un réel merci à toutes les personnes qui ont participé à cette aventure, de près ou de loin, tous vous nommer seraient bien trop laborieux et j'espère que vous m'en excuserez. J'ai pu grandir et évoluer grâce à vous tous, donc juste un immense MERCI.

LISTE DES ABRÉVIATIONS

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
ARNr	Acide ribonucléique ribosomique
ARS	Autonomously Replicating Sequence
ATP	Adénosine Tri-Phosphate
B	Bases
BS	Biologie de Synthèse (ou Biologie Synthétique)
CARDS	Community-Acquired Respiratory Distress Syndrome
Cas	CRISPR-associated gene
CDS	Coding sequence
CEN	Centromere
CMI	Concentration minimale inhibitrice
CRISPR	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
ER	Enzyme de restriction
gRNA (sgRNA)	Guide ARN
HGT	Horizontal Gene Transfer
HR (HDR)	Homology Direct Repair
ICE	Integrative and Conjugative Element
IL	Interleukine
IS	Insertion Sequence
JCVI	John Craig Venter Institute
Kb	Kilo paire de bases
LCR	Liquide Céphalo-Rachidien
Lmp	Large membrane protein
MALDI-Tof	Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation - Time of Flight
ME	Méthylase (ou méthyltransférase)
MLSK	Macrolide - Lincosamide - Streptogramine - Kétolide
MLST	MultiLocus Sequence Typing
MLVA	Multiple Loci VNTR Analysis
Mmc	*Mycoplasma mycoides* subsp. *capri*
Mmm	*Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides*
NHEJ	Non Homologous End Joining
Nt	Nucléotide
OriC	Origine de réplication chromosomique
Pb	Paire de bases
PCR	Polymerase Chain Reaction (Réaction en chaîne par polymérase)
PEG	Polyéthylène glycol
PFGE	Pulsed Field Gel Electrophoresis
PPLO	Pleuropneumonia-Like Organisms
QRDR	Quinolone-Resistance Determining Region
RT-PCR	Reverse Transcriptase - PCR
SRM	Système de Restriction-Modification
TALEN	Transcription Activator-Like Effector Nuclease

TAR	Tranformation-Associated Recombination
TILLING	Targeting Induced Local Lesions in Genomes
TREC	Tandem Repeat Coupled with Endonuclease Cleavage
TREC-IN	TREC-assisted gene knock-in
UCC	Unité de Changement de Couleur
UFC	Unité Formant Colonie
Vaa	Variable adherence-associated antigen
VIH	Virus de l'Immunodéficience Humaine
VNTR	Variable Number of Tandem Repeats
YAC	Yeast Artificial Chromosome
ZFN	Zinc Finger Nuclease

TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS 2

LISTE DES ABRÉVIATIONS 5

TABLE DES MATIÈRES 7

LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES 10

INTRODUCTION ET OBJECTIFS 11

ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE 14

1. Les mycoplasmes et *Mycoplasma hominis* 14

1.1 Les mycoplasmes 14

1.2 *Mycoplasma hominis* 16

1.2.1 Caractéristiques du génome 16

1.2.2 Métabolisme énergétique 17

1.2.3 Pouvoir pathogène et facteurs de virulence 18

1.2.4 Infections à *M. hominis* 21

1.2.4.1 Présence à l'état commensal 21

1.2.4.2 Manifestations cliniques des infections à *M. hominis* 21

1.2.5 Diagnostic des infections à *M. hominis* 23

1.2.5.1 Culture, croissance et identification 23

1.2.5.2 Diagnostic moléculaire 25

1.2.6 Etude de la sensibilité aux antibiotiques 26

1.2.7 Résistance aux antibiotiques 27

1.2.7.1 Résistance naturelle et antibiotiques actifs 27

1.2.7.2 Résistance acquise 28

1.2.8 Traitements des infections à *M. hominis* 29

2. La biologie de synthèse 30

2.1 Généralités 30

2.2 Ingénierie de systèmes biologiques 32
2.3 Concept de cellule minimale 33
2.4 Limites de la biologie de synthèse 35
3. Systèmes de défense des bactéries contre l'ADN exogène 36
3.1 Systèmes de restriction-modification 36
3.1.1 Définition et nature des systèmes de restriction-modification 36
3.1.2 Chez les mycoplasmes 39
3.2 Systèmes CRISPR/Cas 40
3.2.1 Caractérisation du système CRISPR/Cas 40
3.2.2 Édition de génome par approche CRISPR/Cas9 43
3.2.3 Aspects éthiques 46
3.3 Autres systèmes de défense 47
4. Outils génétiques chez les mycoplasmes 47
4.1 La transformation 48
4.2 Mutagenèse aléatoire par transposition 50
4.3 La mutagenèse ciblée 51
4.3.1 La mutagenèse ciblée en utilisant des plasmides suicides 52
4.3.2 La mutagenèse ciblée en utilisant des plasmides *oriC* 52
4.4 Approche de biologie synthétique 54
4.5 Modifications génétiques chez *M. hominis* 56
CHAPITRE 1. CLONAGE, STABILITÉ ET MODIFICATION DU GÉNOME DE *MYCOPLASMA HOMINIS* DANS LA LEVURE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* 58
CONTEXTE 59
DONNÉES SUPPLÉMENTAIRES 72
POINTS ESSENTIELS 76
CHAPITRE 2. LA MUTAGENÈSE ALÉATOIRE ENGENDRE DE LARGES RÉARRANGEMENTS CHROMOSOMIQUES DANS LE GÉNOME DE *MYCOPLASMA HOMINIS* 77

CONTEXTE 78
POINTS ESSENTIELS 99
CONCLUSION ET DISCUSSION 100
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES 110
ANNEXE 141

LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES

LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES

Liste des tableaux

Tableau 1. Mycoplasmes isolés chez l'homme.

Tableau 2. Importance de l'association des mycoplasmes génitaux à différents tableaux cliniques.

Tableau 3. Critères d'interprétation des CMI des principaux antibiotiques actifs sur *M. hominis.*

Tableau 4. Ecart des CMI en µg/mL de différents antibiotiques vis-à-vis des mycoplasmes urogénitaux.

Tableau 5. Résistance acquise aux antibiotiques chez *M. hominis.*

Tableau 6. Caractéristiques et organisation des différents types de systèmes de restriction-modification (SRM).

Tableau 7. Classification des différents systèmes CRISPR.

Tableau 8. *Mollicutes* pour lesquels des outils génétiques sont disponibles.

Liste des figures

Figure 1. Clonage et modification du génome de *M. hominis* dans la levure *S. cerevisiae.*

Figure 2. Arbre phylogénétique des *Mollicutes*.

Figure 3. Métabolisme de l'arginine chez *M. hominis*.

Figure 4. Représentation des séquences d'acides aminés des six variants alléliques du gène *vaa*.

Figure 5. Culture de *M. hominis*.

Figure 6. Différentes trousses commerciales permettant la détection, la numération et/ou l'étude de la sensibilité aux antibiotiques de *Ureaplasma* spp. et *M. hominis.*

Figure 7. Le fonctionnement des systèmes de restriction-modification.

Figure 8. Organisation des différents types de locus CRISPR, en fonction des données de séquençage.

Figure 9. Mécanisme d'action du complexe CRISPR de type II.

Figure 10. Mécanisme d'édition de génome par la technologie CRISPR.

Figure 11. Délétion génétique sans trace par la méthode TREC.

Figure 12. Représentation du vecteur pMT85-Tet.

INTRODUCTION

INTRODUCTION ET OBJECTIFS

Mycoplasma hominis est un mycoplasme humain retrouvé à l'état commensal dans le tractus urogénital de l'homme et de la femme. Cette bactérie opportuniste peut être responsable d'infections du tractus urogénital, principalement chez la femme, d'infections néonatales ou d'infections disséminées notamment chez les immunodéprimés (Bébéar and Bébéar, 2017; Pereyre and Bébéar, in press; Waites and Bébéar, in press). Elle appartient à la classe des *Mollicutes*, bactéries sans paroi, et possède un génome de très petite taille. Le génome de la souche de référence *M. hominis* PG21 (ATCC 23114) a été entièrement séquencé par le laboratoire en 2009 (Pereyre *et al.*, 2009) et présente une taille de 665 kb. C'est une bactérie difficile à manipuler sur le plan génétique puisque non transformable à ce jour, ce qui limite les recherches concernant sa pathogénicité et son métabolisme particulier basé sur l'arginine. Des travaux récents, reposant sur des approches dites de biologie de synthèse (BS) ont ouvert des perspectives nouvelles en termes d'édition de génomes chez les mollicutes. L'originalité de ces approches, mises au point sur d'autres génomes de mycoplasmes, repose sur l'utilisation de la levure *Saccharomyces cerevisiae* comme un hôte intermédiaire pour modifier les génomes de mollicutes (Lartigue *et al.*, 2009).

L'objectif principal de mon doctorat a été d'étendre ces nouvelles technologies à *M. hominis* et de développer des méthodes de modification de génome efficaces qui permettront à terme d'explorer la fonction de gènes d'intérêt, comme ceux impliqués dans le pouvoir pathogène (**Figure 1**). La mise en place de ce cycle d'ingénierie, nécessite (i) de cloner le génome entier de *M. hominis* dans la levure *S. cerevisiae* par la technique de « Transformation-Associated Recombination cloning » (Larionov *et al.*, 1997), (ii) d'utiliser les outils génétiques disponibles chez cet organisme comme le système d'édition CRISPR/Cas9 (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/Cas), (DiCarlo *et al.*, 2013; Tsarmpopoulos *et al.*, 2016) et (iii) de transplanter le génome modifié dans une espèce receveuse adéquate (*M. hominis* ou *M. arthritidis*, espèce transformable la plus proche phylogénétiquement de *M. hominis*, si nous n'arrivons pas à transformer *M. hominis*) et (iv) d'obtenir des mycoplasmes génétiquement modifiés qui peuvent être caractérisés au niveau génotypique et phénotypique (**Figure 1**).

Au début de mon doctorat, deux transformants de levure contenant le génome de *M. hominis* PG21, B3-2 et B3-4, avaient déjà été obtenus au laboratoire. Le premier axe de mes travaux a été d'étudier la stabilité de ces génomes au sein la levure. Le deuxième axe concernait

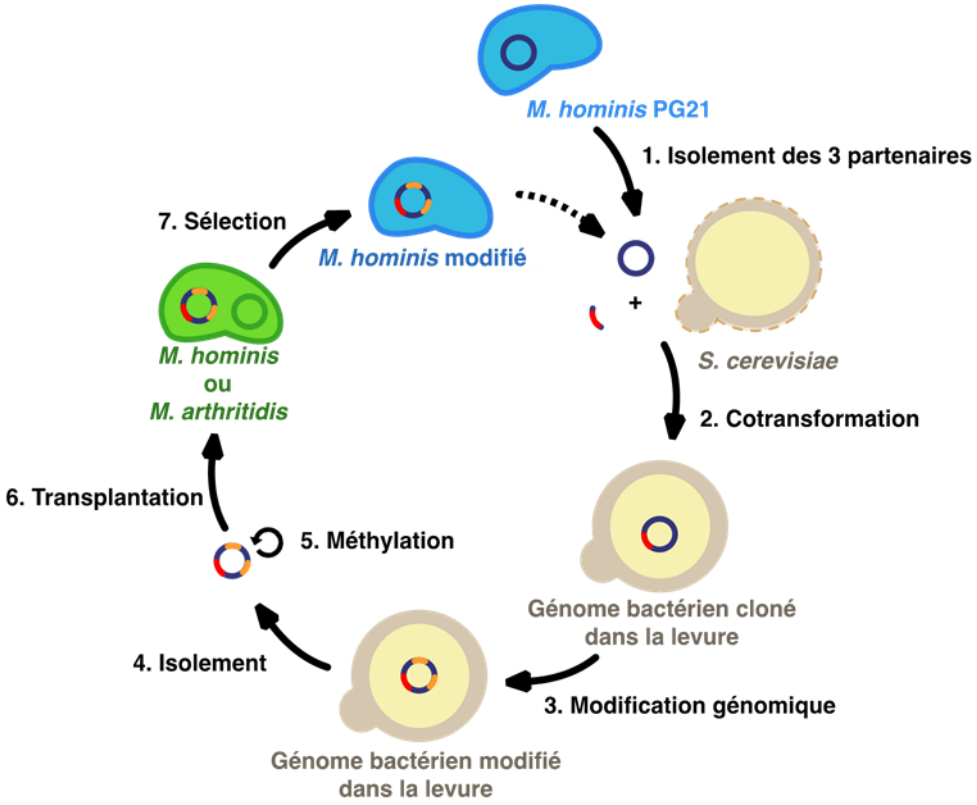


Figure 1. Clonage et modification du génome de *M. hominis* dans la levure *S. cerevisiae*.
Adapté de Lartigue *et al*. (2009).

la modification du génome cloné dans la levure et le troisième, le développement de la technique de transformation/transplantation chez *M. hominis*.

Afin d'étudier la stabilité du génome de *M. hominis* PG21 cloné dans *S. cerevisiae*, les clones obtenus B3-2 et B3-4 ont été mis en culture en milieu sélectif pendant 30 passages. L'intégrité des génomes a été déterminée par PCR multiplex et électrophorèse en champ pulsé (PFGE). Nous avons observé que le génome de *M. hominis* était maintenu dans les levures jusqu'au 10ème passage pour le clone B3-2 et jusqu'au 20ème passage pour le clone B3-4. Il était ensuite progressivement dégradé au cours des passages. Ces données indiquent l'importance de travailler avec des clones à faibles passages et de vérifier l'intégrité des génomes clonés à chaque étape expérimentale. En outre, les analyses de génomique comparées réalisées sur des sous-clones possédant des génomes incomplets ont suggéré que l'environnement génomique pourrait favoriser la perte de certaines régions du génome, notamment par le manque de séquences ARS (« yeast Autonomously Replicative Sequences ») et/ou la présence de longues séquences répétées dans le génome.

Le clonage du génome de *M. hominis* PG21 a donc été réalisé avec succès. L'étape suivante a été de démontrer que la modification de ce génome était possible par les outils génétiques disponibles chez la levure. Pour cela, nous avons choisi de supprimer un gène impliqué dans le pouvoir pathogène : le gène *vaa* codant pour une adhésine putative majeure du mycoplasme (Henrich *et al.*, 1996). La délétion du gène a été faite par la technique CRISPR/Cas9 (DiCarlo *et al.*, 2013; Tsarmpopoulos *et al.*, 2016) chez les clones B3-2 et B3-4 au passage 2. Grâce à cet outil, 13 transformants B3-4 Δ*vaa* ont pu être obtenus et confirmés par PCR simplex et multiplex, par séquençage du locus et par PFGE. **Ces travaux ont été publiés dans un premier article en 2017 (Rideau *et al.*, 2017).**

En parallèle des deux premiers axes une technique de transformation a été élaborée chez *M. hominis*, adaptée du protocole réalisé chez *Ureaplasma parvum* (Aboklaish *et al*., 2014) et chez *M. arthritidis* (Voelker and Dybvig, 1996). La technique a été mise au point chez la souche de référence M132 (ATCC 43521, numéro d'accession SRA : SRX4047436) et non pas la souche type PG21, qui reste non transformable à ce jour. Après de nombreuses tentatives et plus de 150 conditions testées, un protocole reproductible a été mis au point, permettant l'obtention de transformants avec des efficacités de transformation faible (de 10^{-10} à 10^{-9} transformants/UFC/µg de plasmide). L'hypothèse avancée pour justifier la difficulté à transformer *M. hominis* concerne la présence de multiples systèmes de restriction-modification chez ce mycoplasme. Nous avons pu comparer les génomes de la plupart des espèces de mycoplasmes transformables à celui de *M. hominis* grâce à des analyses bio-informatiques et

constater *in silico* la diversité (types I, II et III) et le nombre important de ces systèmes chez *M. hominis*. Actuellement, le plasmide utilisé est méthylé avant transformation par la CpG méthyltransférase *Sss*I, qui permet de contrer seulement une partie des systèmes de type II. Ce protocole nous a permis d'obtenir un mutant possédant un transposon dans le gène codant la protéine P75, adhésine majeure *M. hominis* (Henrich *et al.*, 2017). Une analyse de l'expression du gène par RT-PCR a permis de montrer l'inactivation du gène. Un test d'adhésion a été mis en place mais aucune différence d'adhésion n'a été observée entre le mutant et la souche parentale.

Enfin une analyse par séquençage du génome de deux transformants a mis en évidence l'intégration de multiples copies du transposon chez ces clones, ainsi qu'une intégration du plasmide entier au cours de la transformation. Ces analyses ont également montré des réarrangements de grands fragments d'ADN, notamment une inversion de 300 kb chez le clone 28-1 et une duplication de 9 kb chez le clone 29-1. **Ces travaux sont soumis à publication et sont présentés dans le chapitre 2 de ce document.**

ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE

ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Mon projet a été d'appliquer les outils de biologie de synthèse chez *M. hominis*, c'est pourquoi je développerai quatre axes dans mon étude bibliographique : les mycoplasmes et *M. hominis*, la biologie de synthèse, les systèmes de défense des bactéries contre l'ADN exogène et les outils génétiques chez les mycoplasmes.

1. **Les mycoplasmes et *Mycoplasma hominis***

1.1 Les mycoplasmes

Les mycoplasmes sont des microorganismes ubiquitaires retrouvés chez l'homme, les animaux vertébrés, les arthropodes et les plantes. Le terme « mycoplasma » (du grecque mykes qui signifie « fungus » et plasma qui signifie « forme ») a été employé dans les années 1950 et a remplacé le terme de PPLO (« PleuroPneumonia-Like Organisms »). Ils appartiennent à la classe des *Mollicutes* (du latin *mollis* « souple » et *cutis* « peau ») qui regroupe des bactéries sans paroi. Cette classe comprend actuellement quatre ordres, les Mycoplasmatales, les Entomoplasmatales, les Acholeplasmatales et les Anaeroplasmatales. Cette classification a été établie en 1993, sur la base d'études phylogénétiques et phénotypiques (Tully *et al.*, 1993). Le terme « mycoplasme » est souvent employé pour désigner l'ensemble des mollicutes ; sur un plan taxonomique, il ne s'applique cependant qu'à l'ordre des Mycoplasmatales, qui contient une famille, les *Mycoplasmataceae*, qui comprend les genres *Mycoplasma* et *Ureaplasma*. C'est l'usage qui en sera fait dans ce manuscrit. Les mycoplasmes sont les plus petits procaryotes capables de se multiplier de façon autonome. Ils ont initialement été confondus avec des virus, en raison de leur filtrabilité. C'est le cas de *M. pneumoniae* cultivé en 1944 sur oeuf embryonné (Eaton *et al.*, 1944) et identifié comme un mycoplasme en 1962, après culture sur milieu acellulaire (Chanock *et al.*, 1962).

L'étude des séquences d'ADN ribosomique (ADNr) 16S permet de penser que les mycoplasmes sont des formes évoluées, dérivées de bactéries à Gram positif à faible teneur en guanine + cytosine (G+C%), tels que *Clostridia innocum* et *Clostridia ramosum* (Woese *et al.*, 1980; Weisburg *et al.*, 1989). Les mycoplasmes auraient évolué depuis ces ancêtres par réduction de leur génome et pertes successives de gènes, ayant, entre autre, pour conséquence la perte de la paroi. D'après les séquences d'ADNr 16S, les mollicutes sont séparés en cinq groupes phylogénétiques, le groupe Anaeroplasma (appelé sous-groupe AAP pour Acholeplasma, Anaeroplama et Phytoplasma), le groupe Spiroplasma, le groupe Hominis, le

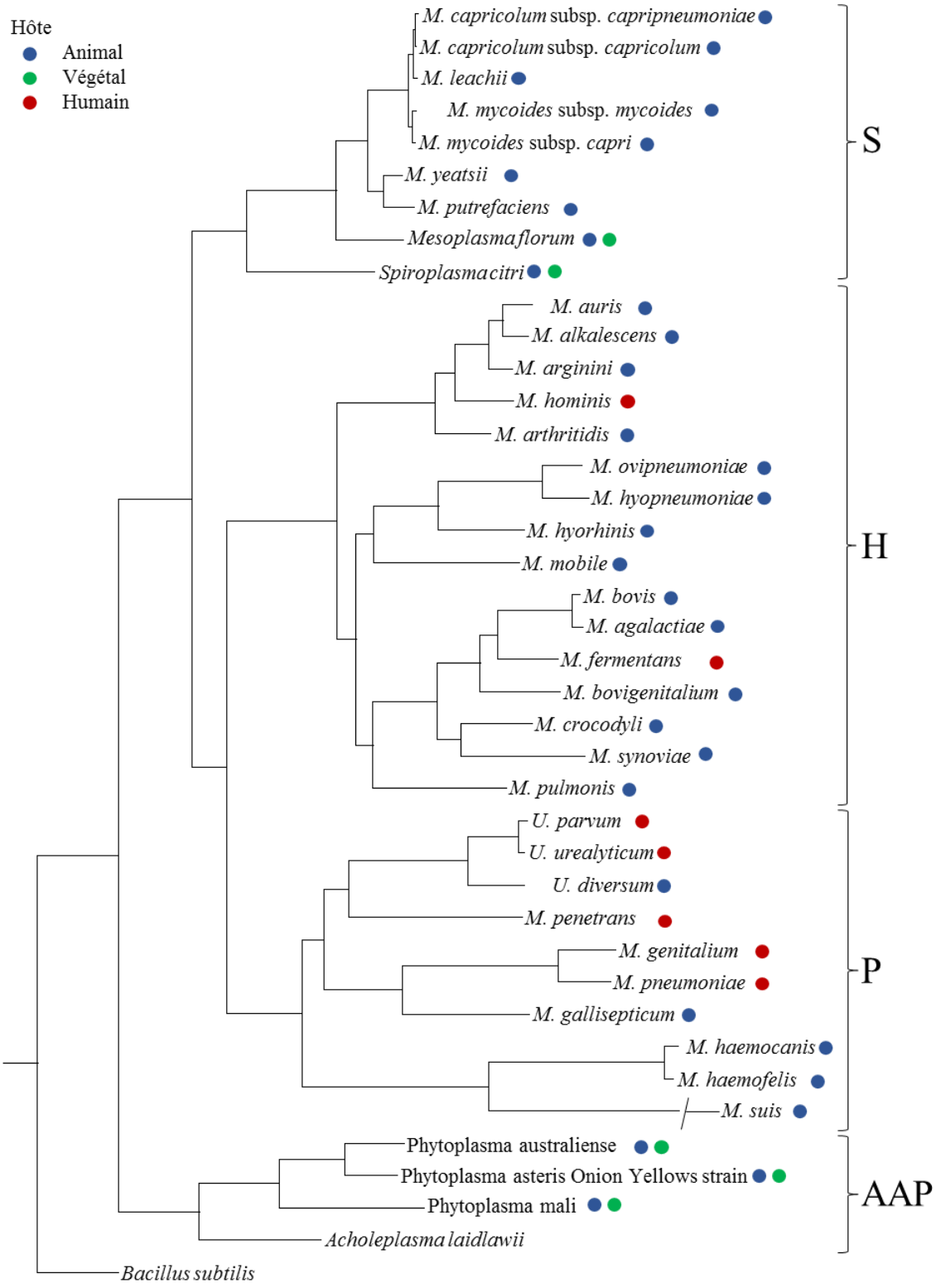


Figure 2. Arbre phylogénétique des mollicutes adapté de Grosjean *et al.*, 2014 . L'arbre phylogénétique a été réalisé par la méthode du maximum de vraisemblance à partir des alignements multiples concaténés de 79 protéines codées par des gènes présents en une copie dans chaque génome. Les principaux groupes phylogénétiques sont les suivants : S, Spiroplasma ; H, Hominis ; P, Pneumoniae ; AAP, Acholeplasma/Phytoplasma.

groupe Pneumoniae et le groupe Asteroleplasma (Weisburg *et al.*, 1989) (**Figure 2**). *M. hominis* appartient au groupe phylogénétique Hominis tandis que les autres principaux mycoplasmes pathogènes humains appartiennent au groupe Pneumoniae.

Les mycoplasmes sont largement répandus dans la nature. Chez l'homme, ils colonisent les muqueuses respiratoires et génitales. Dix-huit des 107 espèces connues chez les mycoplasmes ont été isolées chez l'homme (Waites and Bébéar, in press). À l'exception des espèces animales détectées occasionnellement, en général chez les patients immunodéprimés, elles sont classées selon leur site d'isolement ; on distingue ainsi les mycoplasmes respiratoires et les mycoplasmes génitaux. La plupart des mycoplasmes respiratoires n'ont pas de pouvoir pathogène connu. Seul *M. pneumoniae* colonise les voies respiratoires basses et possède un pouvoir pathogène certain (**Tableau 1**) (Bébéar and Bébéar, 2017; Waites and Bébéar, in press). Parmi les mycoplasmes génitaux, *M. genitalium, Ureaplasma spp*. et *M. hominis* ont un pouvoir pathogène avéré. Leur rôle est reconnu dans les infections génito-urinaires. Le diagnostic microbiologique est souvent difficile du fait du caractère fastidieux de la croissance de certaines espèces ou en raison de problèmes d'interprétation.

Les mollicutes sont de très petites bactéries (entre 0,3 et 0,8 µm de diamètre) et possèdent un génome réduit avec des tailles comprises entre 580 kb pour *M. genitalium* et 2 200 kb pour *Spiroplasma ixodeti*. Ces organismes ont un pourcentage en G+C faible de 27,3 % en moyenne, allant de 23,7 % pour *M. capricolum* subsp. *capricolum* à 40 % pour *M. pneumoniae*. Enfin, les mollicutes utilisent un code génétique spécifique, dans lequel le codon UGA code un tryptophane au lieu d'un codon stop dans le code génétique universel, exceptés pour les groupes Acholeplasma et Phytoplasma (Blanchard, 1990).

Ces génomes réduits font l'objet d'un grand intérêt scientifique à propos du concept de cellule minimale et de génome synthétique. C'est ainsi qu'en 2007, a été fabriqué au John Craig Venter Institute (JCVI), le premier génome de synthèse, copie quasi exacte du génome de *M. genitalium* (Gibson *et al.*, 2008a). Depuis, la première bactérie contrôlée par un génome de synthèse, appelé Syn 1.0, a été obtenue après synthèse et transplantation du génome de *M. mycoides* subsp. *capri* (Gibson *et al.*, 2010). Plus récemment, la synthèse d'un génome minimal de *M. mycoides* subsp. *capri* ainsi que sa transplantation, ont permis la création de la bactérie minimale Syn 3.0 (Hutchison *et al.*, 2016).

Tableau 1. Mycoplasmes isolés chez l'homme.

Espèce	Site primaire d'isolement	Pouvoir pathogène	Fermentation glucose	Hydrolyse arginine	Hydrolyse urée
M. pneumoniae	respiratoire	+	+	-	-
M. hominis	génital	+	-	+	-
M. genitalium	génital	+	+	-	-
M. amphoriforme	respiratoire	?	+	-	-
M. fermentans	génital	?	+	+	-
M. penetrans	génital	?	+	+	-
M. salivarium	respiratoire	-	-	+	-
M. orale	respiratoire	-	-	+	-
M. buccale	respiratoire	-	-	+	-
M. faucium	respiratoire	-	-	+	-
M. lipophilum	respiratoire	-	-	+	-
M. primatum	respiratoire	-	-	+	-
M. spermatophilum	génital	?	-	-	-
M. pirum	?	?	+	+	-
U. parvum	génital	+	-	-	+
U. urealyticum	génital	+	-	-	+
A. laidlawii [1]	respiratoire	-	+	-	-
A. oculi	?	-	+	-	-

A : *Acholeplasma* ; M : Mycoplasma ; U : Ureaplasma

1.2 *Mycoplasma hominis*

1.2.1 Caractéristiques du génome

M. hominis est considéré comme le deuxième plus petit génome capable de se répliquer de façon autonome après *M. genitalium*. En effet, le génome de la souche type PG21 (ATCC 23114) a été séquencé au laboratoire en 2009 et possède une taille de 665 445 pb, un pourcentage en G+C de 27,1 %, et code seulement 537 gènes ; 345 codent des protéines de fonctions connues, 86 codent des protéines hypothétiques conservées et 106 des protéines hypothétiques (Pereyre *et al.*, 2009). Aucun transposon, séquence d'insertion ou plasmide n'a été retrouvé dans le génome de la souche PG21. Cinq clusters de gènes auraient été échangés par transfert horizontal avec *U. parvum*, phylogénétiquement éloigné de *M. hominis*, mais partageant la même niche naturelle, le tractus urogénital humain (Pereyre *et al.*, 2009), comme cela a pu être montré chez d'autres mycoplasmes (Sirand-Pugnet *et al.*, 2007a; Sirand-Pugnet *et al.*, 2007b). L'espèce *M. hominis* apparait hétérogène, des analyses en électrophorèse en champs pulsé ont montré des écarts de taille de génome de plus de 15 % selon les souches (Ladefoged and Christiansen, 1992). Ces variations de taille peuvent être liées à des éléments génétiques mobiles rapportés dans les souches plus récemment séquencées. Il a ainsi été décrit un prophage de 15,9 kb avec 14 gènes, MhoV-1, dans la souche LBD4 (ATCC 27545) (Calcutt and Foecking, 2015a), un transposon de 25,3 kb portant le gène *tet*(M) dans la souche Sprott (ATCC33131) (Calcutt and Foecking, 2015b), un prophage putatif de 15,2 kb chez la souche AF1 (Allen-Daniels *et al.*, 2015), similaire à celui de *M. fermentans* phiMFV1 et un transposon de 26,6 kb contenant le gène *tet*(M) et similaire à celui de la souche Sprott dans la souche PL5 (Allen-Daniels *et al.*, 2015). La présence de nombreuses séquences répétées peut également expliquer la variation de taille du génome de ces souches. Enfin, il est intéressant de noter qu'aucun plasmide n'est présent chez les mycoplasmes humains alors qu'il en existe chez certains mycoplasmes du groupe mycoides (groupe comprenant *M. leachii*, *M. capricolum*, *M. mycoides* subsp. *mycoides* et *M. mycoides* subsp. *capri*) et les spiroplasmes (Renaudin *et al.*, 2014).

La composition du génome minimal nécessaire à la réplication des mycoplasmes a été évaluée par la comparaison du génome de *M. hominis* PG21 avec celui de *M. genitalium* et de *U. parvum* (Pereyre *et al.*, 2009). Ces trois espèces sont des bactéries pathogènes urogénitales de l'homme présentant des petits génomes. Elles partagent un groupe de gènes communs constituant un « core » de 247 gènes codant pour des protéines intervenant dans les grandes

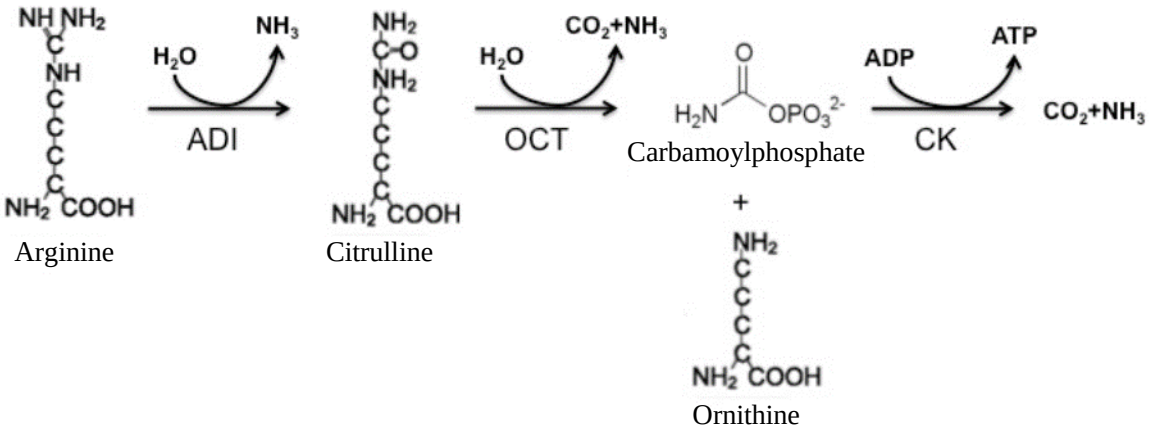


Figure 3. Métabolisme de l'arginine chez *M. hominis*.
ADI, arginine déiminase ; OCT, ornithine carbamoyl transférase ; CK, carbamate transférase.

fonctions cellulaires comme le métabolisme de l'ADN, la synthèse des protéines, la synthèse des nucléotides, les systèmes de transport, la capture de substrats et le métabolisme des acides gras et des phospholipides. La plupart de ces 247 gènes communs sont susceptibles d'être essentiels. En effet, 213 d'entre eux (86,2 %) ne pouvaient pas être inactivés par mutagénèse aléatoire chez *M. genitalium* (Glass *et al.*, 2006). Les gènes spécifiques de *M. hominis*, *M. genitalium* et *U. parvum* codent essentiellement pour les enzymes intervenant dans les voies métaboliques et énergétiques telles que l'hydrolyse de l'arginine pour *M. hominis*, l'hydrolyse du glucose pour *M. genitalium* et l'hydrolyse de l'urée pour *U. parvum*. Parmi les gènes non essentiels retrouvés chez *M. hominis*, un certain nombre sont impliqués dans la virulence et l'adhésion de *M. hominis*. Ce sont par exemple les gènes codant les lipoprotéines P120, P120', Vaa et les lipoprotéines de la famille des « large membrane proteins » (Lmp).

1.2.2 Métabolisme énergétique

M. hominis fait partie des mycoplasmes non fermentants, incapables de métaboliser le glucose. L'analyse de son génome a révélé que les voies des pentoses phosphates, du glucose et du fructose sont incomplètes (Pereyre *et al.*, 2009). *M. hominis* PG21 produit son énergie principalement par hydrolyse de l'arginine, considérée comme son nutriment essentiel (Hahn and Kenny, 1974; Johansson and Pettersson, 2002). Ce métabolisme le distingue des autres mycoplasmes urogénitaux, *M. genitalium* et *Ureaplasma* spp., qui respectivement, fermentent le glucose et hydrolysent l'urée. Cette voie d'hydrolyse de l'arginine est mise à profit pour l'identification de l'espèce *M. hominis*. Elle est composée de trois enzymes, l'arginine déiminase (MHO_0690), l'ornithine carbamoyl transferase (MHO_0640) et la carbamate kinase (MHO_0630) (**Figure 3**).

L'arginine déiminase catalyse la transformation de l'arginine en citrulline par la modification du groupement guanidium. La citrulline est catabolisée par l'ornithine carbamoyl transférase en carbamoylphosphate et ornithine. Le carbamoylphosphate est à son tour dégradé par la carbamate transférase en CO_2 et NH_3 avec production d'une molécule d'ATP. L'inhibition de l'arginine déiminase par la canavanine, inhibiteur compétitif, empêche la multiplication de *M. hominis* en milieu de culture liquide (Pereyre *et al.*, 2009). De plus, une N-diméthylarginine diméthylaminohydrolase (MHO_2540) a été identifiée dans le génome de *M. hominis* PG21 (Pereyre *et al.*, 2009). Cette enzyme pourrait compléter cette voie énergétique en permettant l'utilisation d'un deuxième substrat, la diméthylarginine, qu'elle convertirait en citrulline. Cette enzyme n'est pas présente chez *U. parvum* et *M. genitalium*.

1.2.3 Pouvoir pathogène et facteurs de virulence

La plupart des mycoplasmes vivent à l'état commensal, étant même considérés comme symbiontes chez certains arthropodes. Vivant en harmonie avec leur hôte, les mycoplasmes se rapprochent même du concept de parasite idéal (Razin *et al.*, 1998). Ces microorganismes possèdent des mécanismes évolués permettant l'échappement au système immunitaire de l'hôte, ainsi que le transfert et la colonisation d'un nouvel hôte. Ces mécanismes incluent le mimétisme des antigènes de l'hôte, la survie dans les cellules phagocytaires et non phagocytaires et la génération d'une plasticité phénotypique (Rottem, 2003). Parmi les mécanismes d'échappement au système immunitaire, un complexe de protéine nommé MIB-MIP a été mis en évidence chez *M. mycoides* subsp. *capri*, l'association de ces deux protéines permettant la capture et le clivage des IgG produites par l'hôte (Arfi *et al.*, 2016). Les infections à mycoplasmes sont souvent asymptomatiques, ce qui rend l'identification des facteurs de virulence de mycoplasmes difficile (Citti and Blanchard, 2013). L'absence de réels outils génétiques efficaces rend également compliquée la validation de potentiels gènes impliqués dans la pathogénicité et la virulence (Voir section 4, modification génétique chez les mycoplasmes). De plus, les espèces de mycoplasmes sont reconnues pour avoir une stricte spécificité d'hôte, rendant difficile la mise en place de modèles animaux en laboratoire pour les étudier.

La virulence chez les humains et les animaux est due aux réponses inflammatoire et immune de l'hôte, ainsi qu'à un effet toxique direct des cellules bactériennes. Un moyen connu par lequel les mycoplasmes causent des dommages à leur hôte, est la production de composés toxiques en tant que sous-produits de leur métabolisme, tels que le peroxyde d'hydrogène ou l'ammoniaque, produit par l'hydrolyse de l'urée ou de l'arginine. Ces produits peuvent causer des dommages oxydatifs aux membranes de l'hôte (Almagor *et al.*, 1986; Pilo *et al.*, 2007; Hames *et al.*, 2009; Blotz and Stulke, 2017; Tsarmpopoulos, 2017). Une cytotoxine unique a été identifiée chez *M. pneumoniae* avec des homologues retrouvés chez *M. penetrans* et *M. iowae*. Il s'agit de la toxine CARDS (« Community Acquired Respiratory Distress Syndrome ») en rapport avec le syndrome clinique parfois associé à *M. pneumoniae*. Cette protéine possède une séquence d'acides aminés similaires à celle de la sous-unité S1 de la toxine pertussique (Kannan and Baseman, 2006).

Un autre facteur important de la pathogénicité des bactéries est la formation de biofilms (Wang *et al.*, 2017). Il permet une meilleure adhésion aux cellules hôtes et est généralement suivi par la formation d'une matrice de polysaccharides qui entoure les cellules. Ce mécanisme

a été décrit chez certains mycoplasmes tels que *M. pneumoniae, M. pulmonis*, *M. bovis, M. putrefaciens* et *M. agalactiae* (McAuliffe *et al.*, 2006; Simmons and Dybvig, 2009; 2015).

L'adhérence aux cellules est un des facteurs de virulence avéré des mycoplasmes. En effet, l'adhésion est un pré-requis pour la colonisation et l'infection. La perte de la capacité d'adhésion résulte en une baisse d'infectiosité et la restauration de cette capacité est accompagnée par un regain de virulence. Les adhésines, protéines membranaires responsables de l'adhésion, les mieux décrites chez les mycoplasmes sont les adhésines P1 et MgPa, respectivement retrouvée chez *M. pneumoniae* et *M. genitalium* (Razin *et al.*, 1998).

Enfin, la plupart des espèces de mycoplasmes sont capables d'exprimer des antigènes de surfaces de façon variable. Ces variations de protéines de surface contribuent à la pathogénicité en permettant aux mycoplasmes de survivre dans différentes niches et/ou d'échapper au système immunitaire de l'hôte. Plusieurs mécanismes de variations ont pu être observés, la variation de phase, mécanisme le plus courant correspondant à une commutation ON/OFF et des variations antigéniques comme le remaniement de domaines, la dérive antigénique ou la variation de taille (Citti *et al.*, 2010). Les gènes codant des protéines de taille variable contiennent des régions répétées en tandem et la variation du nombre de répétitions entrainent une variation de la taille de l'antigène (Dybvig and Voelker, 1996).

Concernant *M. hominis*, c'est une bactérie extracellulaire qui adhère à la surface des cellules-hôtes. Elle peut cependant pénétrer dans les cellules, avec 0,5 % de mycoplasmes retrouvés en position intracellulaire après 24-48h d'infection et jusqu'à 10 % en cas d'infection chronique de lignées cellulaires (Hopfe *et al.*, 2013). Chez la souche type PG21, des gènes codant 48 lipoprotéines ont été rapportés (Pereyre *et al.*, 2009; Goret *et al.*, 2016). Parmi ces protéines exposées à la surface du mycoplasme, certaines présentent des variations antigéniques (Ladefoged, 2000) et sont associées à l'adhésion et à la virulence de *M. hominis*. Peuvent être citées par exemple P120, P120' (Mardassi *et al.*, 2007), Vaa (Boesen *et al.*, 2004) ou les lipoprotéines de la famille des Lmp. Un grand nombre de protéine de cette famille a été mis en évidence chez PG21 par séquençage, certaines présentant jusqu'à 15 fois un motif de 57 acides aminés (Pereyre *et al.*, 2009; Goret *et al.*, 2016). Cette variabilité génétique pourrait jouer un rôle dans l'adaptation de la réponse du mycoplasme aux mécanismes de défense de l'hôte. La protéine Vaa est une protéine de surface abondante capable d'interagir avec les cellules épithéliales humaines notamment celles de la lignée HeLa (Henrich *et al.*, 1996; Zhang and Wise, 1997). Le gène *vaa* codant cette protéine possède une variabilité de séquence suivant les différentes souches de *M. hominis* (Zhang and Wise, 1996). Quarante-deux souches cliniques ont été analysées *in silico*, montrant que les 42 gènes *vaa* correspondants sont tous constitués

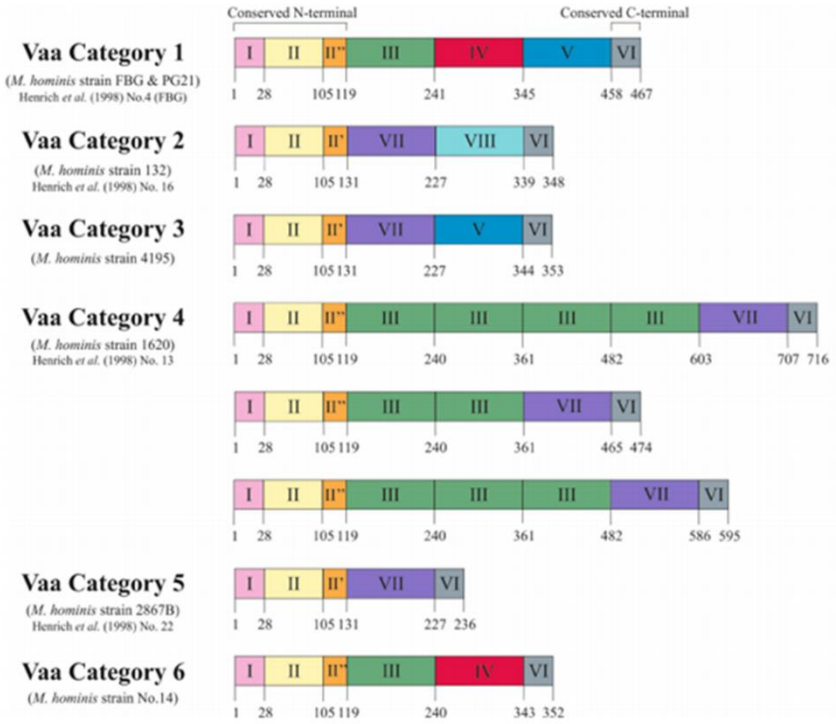


Figure 4. Représentation des séquences en acides aminés des six variants alléliques du gène *vaa*. Adapté d'après Henrich et *al*. (1998) et Boesen et *al*. (1998). Les modules I, II et II" forment l'extrémité N-terminale conservée de la protéine et le module VI représente les 10 acides aminés conservés à l'extrémité C-terminale. Les modules III, IV, V, VII et VIII forment les cassettes interchangeables.

d'une région conservée à l'extrémité N-terminale suivie par un nombre variable de cassettes interchangeables codant environ 110 acides aminés puis d'une région C-terminale codant 10 acides aminés (Boesen *et al.*, 1998; Boesen *et al.*, 2004) (**Figure 4**). Un mécanisme d'expression ON/OFF de la lipoprotéine Vaa, suite à une mutation ponctuelle entrainant l'apparition d'un codon stop a également été décrit (Zhang and Wise, 1997). La variation de la taille de Vaa contribuerait à l'évasion de l'immunité humorale et à l'adaptation de l'organisme chez son hôte.

M. hominis peut également produire une inflammation chez l'homme, certainement par l'intermédiaire de ses lipoprotéines. Il entraine une production dose-dépendante de TNFα par les macrophages *via* la stimulation des Toll-like récepteurs de type 2 (Peltier *et al.*, 2005; Truchetet *et al.*, 2011). Il induit aussi une réponse immunitaire innée avec sécrétion d'IL1β par les cellules dendritiques et une réponse immunitaire adaptative avec sécrétion d'IL23 polarisant la réponse immunitaire vers la voie Th17 (Truchetet *et al.*, 2011; Goret *et al.*, 2017).

M. hominis pourrait aussi participer à la formation de biofilms puisqu'il a été associé à des biofilms microbiens lors d'une infection intra-amniotique (Romero *et al.*, 2008). L'hydrolyse de l'arginine, voie métabolique principale (Pereyre *et al.*, 2009), peut aussi avoir un rôle dans la physiopathologie de ce mycoplasme en raison de l'ammoniaque produit.

Enfin, *M. hominis* est retrouvé comme parasite intracellulaire de *Trichomonas vaginalis*, parasite humain infectant le même site urogénital. Jusqu'à 90% des souches isolées de *T. vaginalis* sont naturellement infectées avec *M. hominis*, mais la nature exacte de la symbiose entre ces deux organismes est encore peu comprise (Furnkranz *et al.*, 2018b). Comme *M. hominis*, *T. vaginalis* peut, dans certaines conditions, utiliser l'arginine comme source d'énergie et la présence intracellulaire de *M. hominis* chez *T. vaginalis* est associée à une déplétion de l'arginine extracellulaire et à une augmentation intracellulaire de l'ornithine, produit de catabolisme de l'arginine (Morada *et al.*, 2010). *M. hominis* pourrait se trouver protégé par sa position intracellulaire dans *T. vaginalis* et pourrait augmenter la virulence des souches de *T. vaginalis* infectées (Vancini *et al.*, 2008). Comme l'arginine est le substrat exclusif pour la synthèse d'oxyde nitrique (NO) par les macrophages de l'hôte lors de la réponse immunitaire, *M. hominis* pourrait protéger *T. vaginalis* en accentuant la déplétion en arginine et donc diminuer la production de NO par les macrophages de l'hôte. Jusqu'à aujourd'hui, il a été montré que *M. hominis* influençait la croissance de *T. vaginalis*, sa production d'ATP ainsi que son activité hémolytique (Margarita *et al.*, 2016). Il a également été déterminé que *M. hominis* pouvait influencer l'expression des gènes de *T. vaginalis* et notamment l'expression de ceux impliqués dans la résistance au métronidazole (Furnkranz *et al.*, 2018a).

Tableau 2. Importance de l'association des mycoplasmes génitaux à différents tableaux cliniques, d'après Bébéar et Bébéar (2017).

Pathologie	*M. hominis*	*Ureaplasma* spp[a]	*M. genitalium*
Infections génitales masculines			
UNG[b]	-	+[c]	+
Epididymites, prostatites	-	±	±
Infertilités	-	±	±
Infections gynécologiques			
Vaginoses bactériennes	+	±	±
Cervicites	-	-	+
Endométrites	+	-	+
Salpingites	+	-	+
Infections au cours de la grossesse			
Chorioamniotites	+	+	?
Fièvres, endométrites post-partum	+	+	-
Avortements spontanés	±	±	±
Retards de croissance intra-utérins	-	±	?
Atteintes néonatales			
Prématurités - Faibles poids de naissance	-	+	±
Infections respiratoires, neurologiques, bactériémies, abcès	+	+	?
Dysplasies broncho-pulmonaires	-	±	?
Infections extragénitales			
Arthrites septiques	+	+	+
Arthrites réactionnelles	-	+	+
Pyélonéphrites	+	-	-
Autres localisations (surinfections de plaies sternales, abcès rétropéritonéaux, abcès du cerveau, septicémies…)	+	+	-

[a] Comprend 2 espèces, *U. urealyticum* et *U. parvum* ; [b] UNG : urétrite non gonococcique.

[c] + : association certaine ou rôle causal démontré ; ± : association non démontrée; - : pas d'association documentée ; ? : inconnu.

L'augmentation des CMI du métronidazole vis-à-vis de *T. vaginalis* pourrait en partie être expliquée par le fait que *M. hominis* n'est pas affecté par cette drogue *in vitro*, donnant lieu à de grandes densités de bactéries et à une diminution de la concentration finale du métronidazole (Furnkranz *et al.*, 2018a). Les mêmes auteurs montrent également un effet *in vitro* de cette symbiose sur le niveau de sensibilité de *M. hominis* aux antibiotiques, avec une augmentation allant jusqu'à un facteur 2 des CMI de la gentamicine, de la moxifloxacine et de la ciprofloxacine pour deux des trois souches de *M. hominis* infectant *T. vaginalis* étudiées (Furnkranz *et al.*, 2018b).

1.2.4 Infections à *M. hominis*

1.2.4.1 Présence à l'état commensal

M. hominis et *Ureaplasma* spp. appartiennent à la flore commensale du tractus génital. Il existe des différences entre les deux espèces, la colonisation étant nettement plus importante pour *Ureaplasma* spp. que pour *M. hominis*. Cette colonisation peut varier en fonction de l'âge, l'état hormonal (menstruations, ménopause et contraception), la race, le niveau socio-économique et l'activité sexuelle (Bébéar and Bébéar, 2017; Pereyre and Bébéar, in press; Waites and Bébéar, in press). Concernant *M. hominis*, le taux de colonisation chez les femmes reste assez faible, de 5 à 10 %, alors que pour *Ureaplasma* spp., il peut atteindre 30 à 50 % (Bébéar and Bébéar, 2017). Le taux est nettement moins élevé chez les hommes, en effet, les femmes sont plus souvent colonisées que les hommes et la grossesse est un facteur favorisant. L'enfant peut être colonisé au moment de l'accouchement par contact direct avec les muqueuses génitales de sa mère, au niveau du nez, de la gorge et des voies génitales. Dans ce cas, les mycoplasmes disparaissent alors assez vite pour réapparaitre à la puberté.

1.2.4.2 Manifestations cliniques des infections à *M. hominis*

A propos des infections urogénitales, *M. hominis* peut être mis en cause dans les infections féminines, contrairement aux uréaplasmes qui ne sont peu ou pas impliqués dans les infections gynécologiques en dehors de la grossesse (**Tableau 2**). *M. hominis* n'est pas l'agent de la vaginose bactérienne, mais y est fortement associé car il fait partie des bactéries qui prolifèrent au cours de ce syndrome caractérisé par un déséquilibre de la flore vaginale. En effet, il est retrouvé avec des charges jusqu'à 10 000 fois plus élevées chez deux tiers des patientes atteintes de vaginose, contre moins de 10 % chez les femmes saines (Waites and

Talkington, 2005; Foschi *et al.*, 2018; Pereyre and Bébéar, in press). La présence d'un grand nombre de mycoplasmes au niveau vaginal peut être le point de départ d'infections des voies génitales hautes ou d'infections pendant la grossesse. *M. hominis* ne cause pas de cervicite mais peut causer des endométrites. Il peut aussi être responsable de salpingites, mais plutôt comme agent de surinfection que comme agent pathogène primaire (Taylor-Robinson *et al.*, 1999). Chez l'homme, la présence de *M. hominis* au niveau urogénital est le reflet d'une colonisation. Il est parfois suspecté dans les cas d'urétrites non gonococciques ou d'épididymites mais sa responsabilité n'est pas démontrée, contrairement à *M. genitalium* ou *Ureaplasma* spp. (Srugo *et al.*, 2003; Zdrodowska-Stefanow *et al.*, 2006). *M. hominis* peut être responsable d'un petit nombre de pyélonéphrites aiguës chez les sujets immunocompétents (Waites and Talkington, 2005). Une obstruction ou un geste invasif au niveau du tractus urinaire pourrait être un facteur prédisposant.

Puisqu'il colonise le tractus génital, *M. hominis* peut être associé aux infections durant la grossesse. Cette bactérie pouvant résider dans la flore vaginale normale, la présence seule de cet organisme est donc insuffisante pour expliquer les pathologies (Capoccia *et al.*, 2013). *M. hominis* est associé à des chorioamniotites, mais moins fréquemment que *Ureaplasma* spp., avec isolement de mycoplasmes à partir du liquide amniotique malgré des membranes intactes, en l'absence de toute autre bactérie et en association à des lésions histologiques (Waites *et al.*, 2009; Cao *et al.*, 2018). L'atteinte initiale du chorion peut évoluer vers une invasion de la cavité amniotique et une infection du fœtus, responsables d'avortements spontanés. *M. hominis* est, en outre, un agent de poussées fébriles *post-partum* ou *post-abortum* dont le point de départ est une endométrite. Il s'agit souvent de simples décharges bactériémiques survenant lors du travail, ou alors de véritables septicémies avec hémocultures positives répétées, à distance du travail. Un retentissement sur le bébé est souvent noté, le mycoplasme étant retrouvée dans le sang de la mère et dans le prélèvement endotrachéal du bébé (Waites *et al.*, 2009). Les infections *in utero* à *M. hominis* sont plus fréquentes après une rupture prématurée des membranes. En effet, plus l'avortement spontané apparaît tôt pendant la grossesse, plus la fréquence de positivité des cultures de liquide amniotique est élevée (Taylor-Robinson and Lamont, 2011).

Concernant les infections chez les nouveaux-nés, la colonisation par les mycoplasmes génitaux peut se faire *in utero* mais elle a lieu plus fréquemment au moment de l'accouchement par voie basse, les taux de colonisation étant plus élevés chez les enfants hypotrophiques. *M. hominis*, tout comme *Ureaplasma* spp., est un agent de méningites chez les nouveaux-nés très prématurés et hypotrophiques (Waites *et al.*, 2009). Il peut aussi être responsable de

bactériémies (Goldenberg *et al.*, 2008) et de pneumonies (Waites and Talkington, 2005) (**Tableau 2**).

Enfin, *M. hominis* peut entrainer des infections extra-génitales (Pereyre and Bébéar, in press). C'est l'espèce la plus souvent en cause dans les infections systémiques à mycoplasmes, ce type d'infections survenant essentiellement chez les patients immunodéprimés, transplantés ou présentant des ruptures majeures des barrières anatomiques. Elles sont certainement sous-estimées car la responsabilité des mycoplasmes est évoquée tardivement, en l'absence d'autres étiologies ou lors d'échecs thérapeutiques. Les infections extra-génitales à *M. hominis* incluent bactériémies, ostéomyélites, abcès rétro-péritonéaux et péritonites, surinfections d'hématomes, infections vasculaires et sur cathéter, surinfections de plaies sternales avec médiastinites après chirurgie thoracique, pneumonies, endocardites, péricardites et abcès du cerveau (Pereyre and Bébéar, in press; Waites and Bébéar, in press). Dans le cas d'infections dues à des greffons, la relation entre infection du receveur et du donneur a pu être établie par technique de séquençage de génome complet de *M. hominis* (Novosad *et al.*, 2017; Smibert *et al.*, 2017). Les mycoplasmes peuvent aussi être responsables d'arthrites septiques chez les patients hypogammaglobulinémiques puisque 40 % des cas d'arthrites chez ce type de patients immunodéprimés seraient dues aux mycoplasmes (Pereyre and Bébéar, in press). *M. hominis* a été détecté par culture ou PCR, mais *Ureaplasma* spp. reste l'espèce la plus fréquemment retrouvée. *M. hominis* a aussi été mis en cause dans des cas d'arthrites septiques pour d'autres types d'immunodépressions spontanées ou induites, mais pas dans les arthrites réactionnelles.

1.2.5 Diagnostic des infections à *M. hominis*

Il s'agit d'un diagnostic direct détectant la présence de la bactérie ou de ses composants. La présence des mycoplasmes à l'état commensal au niveau du tractus urogénital rend difficile l'appréciation de leur pouvoir pathogène. Le diagnostic a donc pour but de mettre en évidence les mycoplasmes responsables d'une pathologie en tenant compte de leur présence à l'état commensal. Une appréciation quantitative peut aider à l'interprétation des résultats bactériologiques.

1.2.5.1 Culture, croissance et identification

Les fluides biologiques, les écouvillonnages et les biopsies de tissus sont appropriés à la recherche et à la culture de mycoplasmes. Les mycoplasmes étant des bactéries adhérentes aux cellules, tout prélèvement par écouvillonnage doit retenir des cellules. Quel que soit la

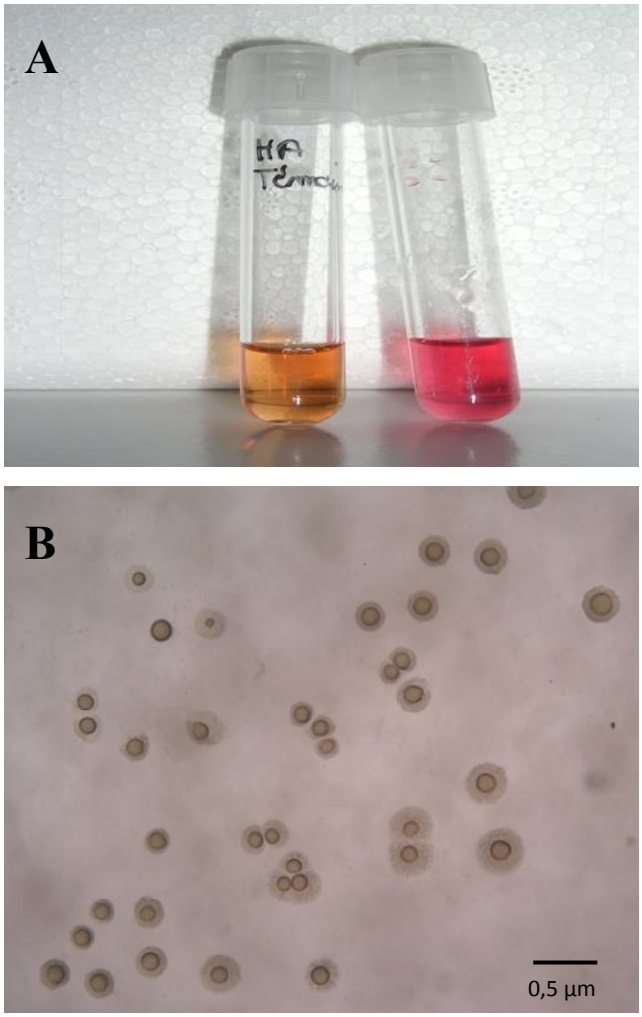


Figure 5. Culture de *M. hominis*. (A) Culture liquide de *M. hominis* en milieu Hayflick supplémenté en arginine. Le tube témoin est le tube orangé et le tube de culture est le tube devenu rose framboise par alcalinisation du milieu de culture. (B) Culture solide de *M. hominis* sur gélose Hayflick. Les colonies ont un aspect typique en œuf sur le plat (Photographies H. Renaudin).

méthode, le prélèvement doit être adapté à la localisation de l'infection. *M. hominis* peut être recherché à partir de prélèvements vaginaux, cervico-vaginaux, endométriaux, brossage tubaire, liquide de Douglas, sperme, liquide amniotique, placenta, prélèvements endo-trachéaux et liquide gastrique chez le nouveau-né, mais aussi selon la localisation de l'infection, liquide céphalo-rachidien, liquides articulaires, biopsies synoviales, prélèvements cutanéo-muqueux ou de sang (Bébéar *et al.*, 2015; Pereyre and Bébéar, in press). Pour les milieux classiques pour hémocultures contenant des anticoagulants, inhibiteurs des mycoplasmes, il est recommandé d'ensemencer rapidement le sang sur des milieux adaptés à la culture des mycoplasmes. Les mycoplasmes étant sensibles à la dessiccation, l'utilisation de milieux de transport adapté est nécessaire. Pour la mise en culture et le diagnostic par PCR, plusieurs milieux de transport peuvent être utilisés, comme le milieu saccharose-phosphate (2SP) enrichi de 5 % de sérum de veau fœtal ou le milieu de transport universel UTM (Copan) (Waites *et al.*, 2001; Bébéar *et al.*, 2015). Les échantillons peuvent être conservés à +4°C pendant 48h maximum, et à -80°C au-delà.

M. hominis croit sur milieu Hayflick modifié supplémenté avec 20 % de sérum de poulain ou sur le milieu commercialisé SP4, plus complexe, renfermant du sérum de veau fœtal (Waites *et al.*, 2001; Bébéar *et al.*, 2015; Pereyre and Bébéar, in press). Les milieux liquides à pH 7-7,2 contiennent de l'arginine et du rouge de phénol comme indicateur coloré. Il peut aussi occasionnellement pousser sur des géloses au sang ou sur des milieux plus acides utilisés pour *Ureaplasma* spp. tel que le milieu Shepard contenant de l'urée (Waites *et al.*, 2001). En pratique au laboratoire, des cultures liquides et solides sont effectuées en parallèle. En milieu liquide, la détection de la croissance se fait en 18 à 48h par virage de l'indicateur coloré de l'orange vers le rose framboise, dû au fait que *M. hominis* hydrolyse l'arginine en ammoniaque, entrainant l'alcalinisation du milieu de culture (**Figure 5**). Le prélèvement est dilué en série dans du milieu Hayflick afin de quantifier le nombre d'organismes. La positivité de la culture s'exprime en unités de changement de couleur (UCC) par mL. Sur milieu gélosé, une atmosphère enrichie en CO_2 facilite la croissance de *M. hominis*. L'apparition de colonies de petite taille (50 à 300 µM de diamètre), d'aspect typique en « œuf sur le plat » avec un centre pénétrant la gélose doit être observée à la loupe binoculaire après 2 à 5 jours d'incubation (**Figure 5**). *M. hominis* se distingue des autres mycoplasmes urogénitaux par sa capacité à hydrolyser l'arginine et à alcaliniser le milieu alors que *Ureaplasma* spp. hydrolyse l'urée et forment des colonies noires ponctiformes sur milieux solides. L'identification d'espèce se fait par la capacité à alcaliniser le milieu liquide ainsi que par l'aspect des colonies sur milieux solides. La technique de spectrométrie de masse de type MALDI-TOF permet aussi d'identifier *M. hominis* à partir d'un

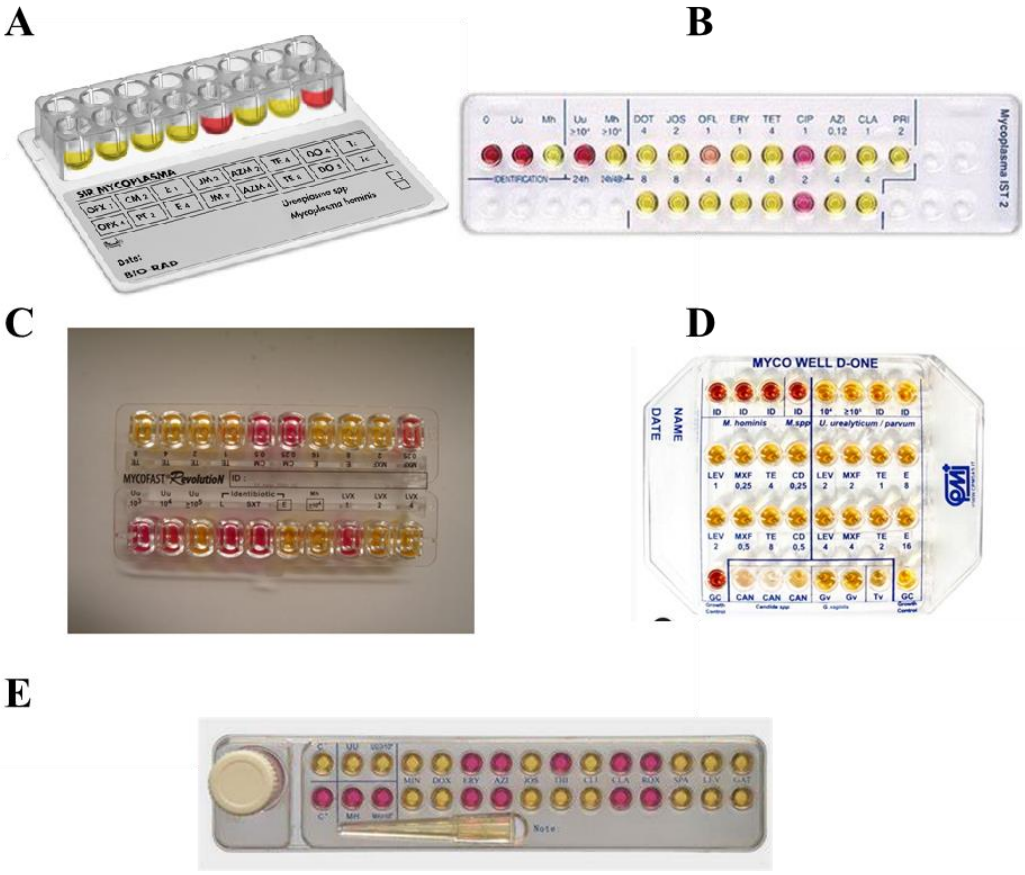


Figure 6. Différentes trousses commerciales permettant la détection, la numération et/ou l'étude de la sensibilité aux antibiotiques de *Ureaplasma spp*. et *M. hominis*. (A) Sir MYCOPLASMA, Bio-Rad (antibiogramme seul). **(B)** IST2, bioMérieux. **(C)** MYCOFAST-RevolutioN, Elitech. **(D)** Myco well D-One,CPM, SAS. **(E)** Mycoplasma IES, Autobio.

milieu de culture (Pereyre *et al.*, 2013). Différentes trousses commerciales existent pour la détection, la numération et/ou l'étude de la sensibilité aux antibiotiques de *Ureaplasma* spp. et *M. hominis* à partir de prélèvements génitaux (**Figure 6**). Elles donnent généralement des résultats similaires aux méthodes standard de culture en milieu liquide.

L'interprétation est aisée pour les prélèvements stériles car la présence de *M. hominis* confirme l'infection. Elle est plus délicate pour les prélèvements en contact avec une flore commensale car il devient important de distinguer colonisation et infection. Si la présence de *M. hominis* chez l'homme est le reflet d'une colonisation, une évaluation quantitative peut s'avérer nécessaire chez la femme (Bébéar *et al.*, 2015). Une quantité de *M. hominis* $\geq 10^4$ UCC/mL dans un prélèvement cervico-vaginal est fréquemment retrouvée au cours de vaginoses bactériennes, mais peut aussi évoquer une infection des voies génitales hautes. Chez le nouveau-né, la présence de mycoplasmes dans des prélèvements périphériques peut être due à une contamination. L'isolement de *M. hominis* à partir d'un prélèvement endotrachéal ou d'un liquide gastrique en quantité suffisante ($\geq 10^4$ UCC/mL) est plus significatif mais doit être relié à l'état clinique du nouveau-né.

1.2.5.2 Diagnostic moléculaire

Les techniques de PCR pour détecter *M. hominis* sont recommandées dans les échantillons où la culture manque de sensibilité, comme les liquides amniotiques, les échantillons génitaux hauts et extra-génitaux. Plusieurs protocoles de PCR « maison » en point final puis en temps réel ont été élaborés. Elles ciblent principalement l'ADNr 16S (Blanchard *et al.*, 1993; Grau *et al.*, 1994; Pascual *et al.*, 2010) et le gène *gap (*glycéraldehyde-3-phosphate deshydrogenase) (Baczynska *et al.*, 2004), mais des variabilités de séquences de ces gènes entre les souches limitent la sensibilité de ces techniques. Une PCR ciblant le gène conservé et spécifique *yid*C, codant pour une translocase membranaire, a aussi été mise au point (Férandon *et al.*, 2011). Cette PCR, plus sensible que la technique conventionnelle, est utilisée pour déterminer des quantités de *M. hominis* dans les prélèvements urogénitaux. *M. hominis* pouvant être associé à d'autres germes urogénitaux, tels que *Chlamydia trachomatis, Neisseria gonorrhoeae, M. genitalium, U. urealyticum, T. vaginalis*, et *Herpes simplex*, des PCR multiplexs ont été commercialisées pour leur détection simultanée (Waites and Bébéar, 2016). Enfin, bien qu'il y ait une diversité au sein de l'espèce *M. hominis*, quelques méthodes de typage moléculaire ont été élaborées par Multi-Locus Variable-Number Tandem-Repeat Analysis (MLVA) (Férandon *et al.*, 2013), Multi-Locus Sequence Typing (MLST) (Jironkin *et*

Tableau 3. Critères d'interprétation des CMI des principaux antibiotiques actifs sur *M. hominis* (CLSI M43-A, 31(19)).

Classe	Antibiotique	CMI (µg/mL)			Commentaires
		Critères d'interprétation			
		S	I	R	
Fluoroquinolones					
	Lévofloxacine	≤ 1	-	≥ 2	
	Moxifloxacine	≤ 0,25	-	≥ 0,5	
Tétracyclines					
	Tétracyline	≤ 4	-	≥ 8	Les organismes sensibles à la tétracycline sont aussi sensibles à la doxycycline.
Lincosamides					
	Clindamycine	≤ 0,25	-	≥ 0,5	

al., 2016) ou séquençage de génome complet (Novosad *et al.*, 2017; Smibert *et al.*, 2017). Elles restent cependant du domaine de la recherche fondamentale et de laboratoires spécialisés.

1.2.6 Etude de la sensibilité aux antibiotiques

Compte tenu des exigences nutritionnelles des mycoplasmes, les méthodes d'études de la sensibilité aux antibiotiques sont très différentes des conditions standard recommandées pour les bactéries classiques. Le CLSI (« Clinical and Laboratory Standards Institute ») a établi des recommandations en 2011 (Waites *et al.*, 2011) qui donnent des indications concernant la réalisation et l'interprétation des antibiogrammes. Elles incluent également les souches de référence contrôles à utiliser, les concentrations minimales inhibitrices attendues pour ces dernières, ainsi que les concentrations critiques nécessaires à la catégorisation des principaux antibiotiques actifs sur *M. hominis* (**Tableau 3**). Les tests de sensibilité aux antibiotiques peuvent être réalisés par des méthodes de dilution en milieu liquide et gélosé (Waites *et al.*, 2011). Elles utilisent un milieu adapté supplémenté en arginine avec une incubation à 35-37 °C sous 5 % de CO_2 pour les milieux gélosés pendant 48 à 72 h. Un inoculum de départ de 10^4 à 10^5 UCC/mL est recommandé (Waites *et al.*, 2011).

Les méthodes de dilution en milieu liquide sont les plus fréquemment utilisées. La CMI est définie comme la plus faible concentration inhibant le changement de couleur de l'indicateur de pH quand le témoin de croissance sans antibiotique a changé de couleur. Des trousses adaptées à *Ureaplasma* spp. et *M. hominis* sont disponibles dans le commerce, seules ou au sein de trousses réalisant en parallèle l'identification et la numération de ces espèces. Il s'agit de microplaques contenant des antibiotiques déshydratés à une ou deux concentrations correspondant aux valeurs critiques recommandées pour les bactéries standard pour les trousses les plus anciennes ou recommandées par le CLSI pour les trousses les plus récentes (Waites *et al.*, 2001; Waites *et al.*, 2011; Bébéar *et al.*, 2015). Elles peuvent être réalisées après culture primaire de l'échantillon ou directement à partir du prélèvement. Dans ce dernier cas, les résultats peuvent pécher par le manque de standardisation de l'inoculum de départ.

La méthode de dilution en milieu solide est plus lourde à réaliser (Waites *et al.*, 2001; Waites *et al.*, 2011). La CMI est alors définie comme la plus faible concentration inhibant la formation de colonies quand le témoin de croissance a poussé.

Tableau 4. Ecart des concentrations minimales inhibitrices en µg/mL de différents antibiotiques[a] vis-à-vis des mycoplasmes urogénitaux ne possédant pas de résistance aux antibiotiques étudiés, d'après Waites et Bébéar (2013).

Antibiotiques	***M. hominis***	***M. genitalium***	***Ureaplasma* spp.**
Tétracyclines			
Tétracycline	0,2 - 2	≤ 0,01 – 0,05	0,05 – 2
Doxycycline	0,1 - 2	≤ 0,01 – 0,3	0,02 – 1
Minocycline	0,03 – 1	≤ 0,01–0,2	0,06 – 1
Tigécycline	0,125 – 0,5	ND	1 – 16
Macrolides-lincosamides-streptogramines-kétolides			
Erythromycine	32 - > 1000	≤ 0,01	0,02 – 16
Roxithromycine	>16	0,01	0,1 – 2
Dirithromycine	> 64	≤ 0,015 – 0,125	0,25 – 4
Clarithromycine	16 – > 256	≤ 0,01 – 0,06	≤ 0,004 – 2
Azithromycine	4 – >64	≤0,01 – 0,03	0,06 – 4
Josamycine	0,05 – 2	0,01 – 0,02	0,03 – 4
Pristinamycine	0,1 – 0,5	≤ 0,01 – 0,02	0,1 – 1
Quinupristine-Dalfopristine	0,03 – 0,3	0,05	0,05 – 0,5
Clindamycine	≤ 0,008 – 2	0,2 – 1	0,2 – 64
Télithromycine	2 – 32	≤ 0,015	≤ 0,015 – 0,25
Céthromycine	≤ 0,008 – 0,031	ND	≤ 0,008 – 0,031
Fluoroquinolones			
Ofloxacine	0,1 – 4	1 – 2	0,2 – 4
Ciprofloxacine	0,1 – 4	2	0,1 – 16
Lévofloxacine	0,1 – 2	0,5 – 1	0,2 – 2
Moxifloxacine	0,06 – 0,125	0,03 – 0,06	0,125 – 1
Chloramphenicol	2 – 25	0,5 – 25	0,4 – 8
Aminosides			
Gentamicine	2–16	ND	0,1 – 13

[a]Compilation de données issues de publications dans lesquelles différentes méthodologies ont été utilisées pour l'étude de la sensibilité aux antibiotiques.
ND = données non disponibles.

1.2.7 Résistance aux antibiotiques

1.2.7.1 Résistance naturelle et antibiotiques actifs

Du fait de l'absence de paroi, tous les organismes appartenant à la classe des mollicutes sont naturellement résistants aux antibiotiques inhibiteurs de la synthèse de la paroi bactérienne, comme les β-lactamines, les glycopeptides et la fosfomycine. Ils résistent également aux polymixines, sulfamides, triméthoprime, acide nalidixique et rifampicine (Bébéar and Kempf, 2005; Bébéar, 2006). La résistance à ce dernier antibiotique consiste, au niveau moléculaire, en une mutation ponctuelle naturelle du gène *rpo*B codant pour la sous-unité β de l'ARN polymérase, cible de la rifampicine, empêchant la fixation de l'antibiotique à sa cible. Les classes Macrolides-Lincosamides-Streptogramines et Kétolides (MLSK) sont également concernées par les résistances naturelles liées à l'espèce. *M. hominis* résiste aux macrolides ayant un cycle à 14 et 15 chaînons. Il est sensible à certains macrolides à 16 chaînons tel que la josamycine, mais pas à la spiramycine. A l'inverse de *Ureaplasma* spp., *M. hominis* est sensible à la clindamycine mais résiste à la télithromycine (**Tableau 4**). La résistance intrinsèque de *M. hominis* à l'érythromycine est liée à une transition G → A en position 2057 de la boucle peptidyltransférase du domaine V de l'ARNr 23S (numérotation *Escherichia coli*) entrainant une diminution de la fixation de l'érythromycine aux ribosomes (Pereyre *et al.*, 2002). Cette transition présente au niveau des deux opérons ribosomiques de *M. hominis* a été associée à une résistance aux macrolides chez d'autres bactéries. Elle est absente chez *M. pneumoniae*, espèce naturellement sensible à l'érythromycine.

Les antibiotiques potentiellement actifs sur *M. hominis* et utilisés en thérapeutique sont les tétracyclines, certains antibiotiques du groupe des MLSK, et les fluoroquinolones (Bébéar and Kempf, 2005; Bébéar, 2006; Waites and Bébéar, 2013)(**Tableau 4**). Seules les fluoroquinolones ont un effet bactéricide *in vitro*. La tigécycline est aussi active que la tétracycline sur les souches sauvages de *M. hominis* mais présente l'avantage de conserver une activité sur les souches ayant acquis une résistance aux tétracyclines (Bébéar and Kempf, 2005). Les aminosides et le chloramphénicol peuvent être actifs sur les mycoplasmes mais ne sont qu'exceptionnellement utilisés en raison de leur potentielle toxicité et de leurs CMI plus élevées que les autres antibiotiques actifs.

Tableau 5. Résistance acquise aux antibiotiques chez *M. hominis,* adapté de Waites et Bébéar (2013).

Famille d'antibiotiques	**Résistance**		**Mécanisme**	**Écarts de CMI pour les isolats résistants (µg/mL)**
	In vitro	***In vivo***		
MLSK[a]	Oui	Oui	- Mutations de l'ARNr 23S en 2610, 2611, 2057, 2059, and 2062[b]	16-64 (clindamycine)
Tétracyclines	Oui	Oui	- Protection ribosomique (gène *tet*(M)) - Mutations de l'ARNr 16S en 346, 965, 966, 967 et 1054 (seulement *in vitro*)	8 - > 64 (tétracycline) 2-8 (tétracycline)
Fluoroquinolones	Oui	Oui	- Mutations au niveau des QRDR[c] des gènes *gyrA, gyrB, parC* ou *parE* - Efflux actif (seulement *in vitro* augmentant les CMI de la ciprofloxacine et de la norfloxacine)	2 - 32 (lévofloxacine)

[a] Macrolides, lincosamides, streptogramines et kétolides.
[b] Numérotation chez *E. coli*.
[c] QRDR, quinolone resistance determining region.

1.2.7.2 Résistance acquise

Des résistances aux trois grandes classes d'antibiotiques actifs utilisées en thérapeutique sont décrites chez *M. hominis*. Le support génétique de la résistance peut être soit des mutations de la cible, les mycoplasmes étant caractérisés par des fréquences de mutations élevées, soit un transfert de gène par transposon. Un mécanisme d'efflux actif a également été démontré *in vitro* (Bébéar and Kempf, 2005; Bébéar, 2006; Waites and Bébéar, 2013). La présence de plasmides de résistance n'a jamais été observée chez *M. hominis*. L'ensemble des mécanismes de résistance sont répertoriés dans le **Tableau 4**.

Concernant la résistance aux tétracyclines, la résistance la plus fréquente est due à la présence du déterminant *tet*(M) situé sur un transposon conjugatif, le Tn*916*. Ce gène code la protéine Tet(M) qui protège la sous-unité 30S du ribosome de l'action des tétracyclines et donne une résistance de haut niveau (CMI $\geq$ 8 µg/mL), tout en conférant une résistance croisée à toutes les tétracyclines (Waites *et al.*, 2014). De telles souches sont facilement détectées à l'antibiogramme et sont donc rendues résistantes à la tétracycline, à la doxycycline et à la minocycline. La détection génotypique peut se faire par amplification du gène *tet*(M) (de Barbeyrac *et al.*, 1996). Les glycylcylines comme la tigécycline conservent une activité vis-à-vis des souches possédant le gène *tet*(M) (Bébéar and Bébéar, 2002). Des souches possédant une résistance de bas niveau (CMI $\leq$ 2 µg/mL), ont été obtenues *in vitro* en présence de concentrations croissantes de tétracyclines (Dégrange *et al.*, 2008). La diminution de sensibilité était associée à des mutations de l'ADNr 16S au niveau de la poche de fixation des tétracyclines (**Tableau 5**). La prévalence de la résistance acquise aux tétracyclines varie selon les pays et l'exposition aux antibiotiques des populations. Une étude récente en France a montré une prévalence de la résistance aux tétracyclines chez *M. hominis* de près de 15 % entre 2010 et 2015 (Meygret *et al.*, 2018).

Quelques résistances aux MLSK ont été décrites chez *M. hominis* (**Tableau 5**). Deux souches cliniques multi-résistantes possédant une résistance aux macrolides à 16 chaînons et aux lincosamides ont été rapportées. La résistance était liée à des mutations ponctuelles dans le domaine V de l'ARNr 23S (Pereyre *et al.*, 2002). Ce profil a pu être retrouvé par des études en sélection *in vitro*, permettant d'obtenir des mutants résistants avec des mutations de l'ARNr 23S et des protéines ribosomiques L4 et L22 associées aux résistances aux MLSK (Pereyre *et al.*, 2006). La résistance acquise aux macrolides reste très rare et sa prévalence est inconnue.

Enfin, les principaux mécanismes entrainant une résistance acquise aux fluoroquinolones sont des mutations dans les gènes cibles de l'ADN gyrase, *gyr*A et *gyr*B, et de la topoisomerase IV, *par*C et *par*E. Cette résistance est croisée entre toutes les

fluoroquinolones et le niveau de résistance dépend des positions et du nombre de mutations. Certaines fluoroquinolones, comme la moxifloxacine, restent les plus efficaces contre les mutants, bien qu'elles perdent leur effet bactéricide *in vitro* (Bébéar *et al.*, 2008). La prévalence de cette résistance a été recherchée pour la lévofloxacine et la moxifloxacine entre 2010 et 2015 en France, et a été évaluée à respectivement 2,7 % et 1,6 % (Meygret *et al.*, 2018). Il a été montré, *in vitro* seulement, une résistance par efflux actif augmentant la CMI pour la ciprofloxacine et la norfloxacine (Waites and Bébéar, 2013). Les facteurs de risque d'acquisition de résistance aux fluoroquinolones sont un traitement antérieur par fluoroquinolones et une immunodépression.

1.2.8 Traitements des infections à *M. hominis*

Le choix des antibiotiques utilisés pour le traitement des infections à mycoplasmes génitaux doit tenir compte de l'espèce isolée, de ses associations possibles à d'autres micro-organismes et du terrain sur lequel interviennent ces infections.

Les tétracyclines sont le traitement de première intention des infections urogénitales à *M. hominis* chez l'adulte (Waites and Bébéar, 2013; Pereyre and Bébéar, in press). En cas d'échec thérapeutique, la clindamycine est un traitement de deuxième intention, efficace sur les souches résistantes à la tétracycline. Malgré la sensibilité *in vitro* des mycoplasmes vaginaux, les traitements à base de tétracyclines ou de clindamycine n'arrivent pas toujours à éradiquer le microorganisme. Les fluoroquinolones, seuls antibiotiques bactéricides *in vitro* pour *M. hominis*, sont une alternative intéressante.

Aucune publication ne compare à ce jour l'efficacité clinique des différents traitements antibiotiques pour les infections extra-génitales de l'adulte et les infections néo-natales. Des recommandations de traitement, essentiellement basées sur les données de sensibilité *in vitro* et les publications de cas cliniques, ont été émises en 2013 (Waites and Bébéar, 2013). Bien que contre-indiquées chez l'enfant avant huit ans, plusieurs publications démontrent l'efficacité de la doxycycline dans le traitement des infections du système nerveux central chez le nouveau-né. La clindamycine a aussi été utilisée avec succès et le chloramphénicol peut être exceptionnellement envisagé en raison de sa bonne diffusion dans le LCR. Enfin, la lévofloxacine et la moxifloxacine représentent une alternative intéressante dans le traitement des infections systémiques chez le patient immunodéprimé en raison de leur activité bactéricide *in vitro* (Waites and Bébéar, 2013; Pereyre *et al.*, 2015). Des associations de deux antibiotiques parmi la clindamycine, la doxycycline, et les fluoroquinolones peuvent aussi être envisagées

dans les infections systémiques graves ou en cas de suspicion de souches résistantes aux antibiotiques.

2. La biologie de synthèse

2.1 Généralités

La plupart des écrits place l'origine de la biologie de synthèse, ou biologie synthétique (BS) dans les années 1990, mais les prémices de cette discipline ont pu être observées dès le début du XXe siècle. En effet, le biologiste Hugo de Vries a songé à contrôler les mécanismes de l'évolution en laboratoire pour créer des formes de vies innovantes à partir de 1904 et a été un des premiers à utiliser le terme « synthétique » pour qualifier ses recherches. La première référence explicite à la « biologie synthétique » est venue du médecin français Stéphane Leduc dans son ouvrage intitulé *La Biologie Synthétique* publié en 1912 (Leduc, 1912). Il a été un des premiers à affirmer que pour comprendre pleinement un phénomène biologique la synthèse doit succéder à l'analyse : « C'est la méthode synthétique, la reproduction par les forces physiques des phénomènes biologiques, qui doit contribuer le plus à nous donner la compréhension de la vie ». Dans ses travaux, S. Leduc est connu pour avoir créé les jardins chimiques, une association de plusieurs substances chimiques et de sels métalliques, permettant l'observation d'une croissance à partir de composés inertes. Ces travaux restent controversés (Campos, 2010). Un autre scientifique controversé, le physicien John Butler Burke, s'est demandé si la vie pouvait être produite à partir de choses non-vivantes. Ces travaux ont porté sur la mise en contact de radium dans des boîtes de Petri contenant du bouillon, résultant en la production de formes « life-like » (Campos, 2006). Enfin, Jacques Loeb, physiologiste américain fut célèbre pour ses travaux sur la parthénogenèse artificielle. En effet, il fut capable de provoquer un début de développement embryonnaire d'œufs d'oursins sans présence de sperme, après des modifications chimiques de l'eau dans laquelle les œufs étaient maintenus (Loeb, 1900). Tous ces scientifiques ont ainsi contribué à l'initiation du concept de BS.

La modernisation de la BS comme nous la connaissons aujourd'hui a démarré dans les années 1970-1980, avec la naissance du domaine des biotechnologies. Cette période a vu la mise au point des techniques d'ADN recombinant et la première synthèse de gène en 1977 (Itakura *et al.*, 1977), la découverte des enzymes de restriction (Nathans and Smith, 1975) et l'invention de la réaction en chaine par polymérase (PCR) par Kary Mullis (Mullis *et al.*, 1986).

Toutes ces découvertes ont contribué à la naissance du génie génétique, concept important pour la BS.

Au cours des années 1990, la volonté de reprogrammer le vivant a encouragé les chercheurs à développer des outils de lecture (séquençage) et d'écriture (synthèse) de l'ADN. Ces avancées ont ainsi mené en 1995 aux premiers séquençages de génomes complets des bactéries *Haemophilus influenzae* (1,8 Mb) et *M. genitalium* (Fleischmann *et al.*, 1995; Fraser *et al.*, 1995), du génome eucaryote de la levure *S. cerevisiae* en 1996 (Goffeau *et al.*, 1996), du génome de *E. coli* en 1997 (Blattner *et al.*, 1997) et de l'achèvement du séquençage complet du génome humain en 2004 (International Human Genome Sequencing, 2004). Les progrès réalisés dans ces domaines ont ouvert la voie à l'ingénierie de génome et à la BS. Le séquençage permet de déterminer et analyser le contenu génétique d'un organisme donné et la synthèse de l'ADN permet fabriquer de l'ADN à partir des quatre nucléotides : adénine, cytosine, thymine et guanine. Toutes ces évolutions ont poussé certains informaticiens à se tourner vers la biologie, tels que Tom Knight, qui a introduit le concept de briques élémentaires ou « biobricks » suite aux premiers essais de Rebatchouck *et al.* en 1996 et Arkin et Endy qui ont développé en 1999 des pièces biologiques standardisées (Rebatchouk *et al.*, 1996; Knight, 2005a; Campos, 2010; Stephanopoulos, 2012). Toutes ces données ont permis l'émergence d'une nouvelle discipline, la BS, ou biologie synthétique dont l'acte de naissance officiel est daté du congrès Synthetic Biology 1.0 organisé au Massachusetts Institute of Technology (MIT) en 2004 et rapporté par T. Knight en 2005 (Knight, 2005b; Gardner and Hawkins, 2013).

La BS est donc un domaine de la biologie en pleine expansion depuis plus d'une décennie. Elle se situe à l'interface de nombreuses disciplines telles que la biologie, la chimie, la physique, l'informatique, les mathématiques ou encore l'ingénierie. Son but est de concevoir de nouveaux systèmes biologiques afin de permettre la compréhension du vivant (comprendre en construisant) et de développer des applications industrielles dans divers domaines tels que la santé, l'environnement ou l'agriculture. Depuis quelques années, les objectifs de la BS s'articulent autour de deux axes principaux, l'approche dite « top-down » qui consiste en la minimisation de systèmes biologiques complexes en systèmes simples que l'on peut maîtriser et l'approche dite « bottom-up », visant à construire des systèmes biologiques, connus ou non, à partir de blocs élémentaires (« biobricks ») et des données OMICS disponibles.

La BS diffère de la biologie des systèmes. Tandis que cette dernière englobe une approche combinée de l'étude des systèmes biologiques aux niveaux génomique, transcriptomique, protéomique et métabolomique, en faisant appel à la modélisation mathématique et à la simulation informatique, la BS consiste au développement de systèmes

artificiels en utilisant des outils d'ingénierie et les connaissances acquises en biologie des systèmes, pour explorer de nouvelles fonctions en modifiant des organismes existants, ou créer de nouveaux blocs et matériaux biologiques non naturels (Lam *et al.*, 2010).

2.2 Ingénierie de systèmes biologiques

L'ingénierie génomique liée à la BS amène à de nombreuses innovations dans les domaines de la santé, de l'industrie et de l'environnement. La combinaison entre les biotechnologies, le génie génétique, ainsi que l'informatique et la modélisation mathématique, permet l'ingénierie de systèmes biologiques, qui est un des objectifs majeurs de la BS, afin de rendre ces systèmes plus productifs et moins coûteux. L'obtention d'une cellule minimale (voir section 2.3, concept de cellule minimale) s'inscrit dans ce type de projet mais de nombreuses autres applications ont déjà pu être développées, notamment concernant la production de médicaments et de systèmes de diagnostic, d'outils de bio-remédiation, ou de bio-carburant par exemple. En 2015, 116 produits ou applications industriels issus de la BS ont été recensés (source : www.biologie-de-synthèse.fr).

Un des premiers exemples de modification attribué à la BS a été l'ingénierie d'une souche de *E. coli* capable de répondre comme un senseur biologique, après exposition à différentes lumières (Levskaya *et al.*, 2005). A l'heure actuelle, il existe des bactéries produites pour se comporter comme des capteurs biologiques, par exemple pour l'arsenic (Voigt, 2012).

La BS a permis la découverte de nouveaux composés thérapeutiques, en développant la production de métabolites, de circuits génétiques, l'activation de clusters de gènes silencieux ou l'utilisation de bactéries comme agents délivrant des antibiotiques (Krishnamurthy *et al.*, 2016; Guzman-Trampe *et al.*, 2017). Parmi ceux-ci, le développement de médicaments tels que l'artémisinine, traitement efficace contre le paludisme sont notamment retrouvés. Ce composé est extrait de la plante annuelle *Artesimia annua*, dont la culture est complexe, coûteuse, avec un faible rendement. En utilisant la BS, une souche de levure produisant l'acide artémisinique, précurseur de l'artémisinine, a été créée. Ce composé est ensuite transformé par un procédé chimique en artémisinine, ce qui a nettement amélioré sa production (Ro *et al.*, 2006; Paddon and Keasling, 2014).

La production de métabolites et de protéines recombinantes d'intérêt est très développée chez *E. coli* (Baeshen *et al.*, 2015). L'ingénierie de la voie des terpénoides chez une souche de *E. coli* pour entrainer une surproduction de taxol, molécule impliquée dans les traitements anti-cancéreux, peut être citée comme exemple (Ajikumar *et al.*, 2010).

Au niveau diagnostique la BS a permis par exemple, la création d'un outil permettant de détecter avec une grande sensibilité des molécules d'ARN appartenant aux virus du VIH et de l'hépatite, permettant un suivi précis des patients infectés par ces virus (source : www.biologie-de-synthèse.fr).

La BS a également un impact sur l'environnement, par le développement de bio-carburants, de bio-matériaux ou d'agents de bio-remédiation. En effet, le métabolisme de *E. coli* a pu être modifié en intégrant des voies métaboliques d'autres organismes, lui permettant de produire des hydrocarbures, utilisables comme bio-carburant (Lee *et al.*, 2008a; Gupta and Phulara, 2015). Des substituts renouvelables aux dérivés du pétrole, comme l'isoprène des pneus ou le plastique de certains emballages, ont pu être fabriqués par des micro-organismes (Amyris & Michelin 2011, Genencore & Goodyear 2008, Global energies 2012). Enfin, des souches des bactéries *Rhodococcus* et *Pseudomonas*, ainsi que la levure *S. cerevisiae*, ont pu être modifiées afin d'être utilisables dans le futur comme agent de dépollution des sols (Chen *et al.*, 2018; Gong *et al.*, 2018; Kim *et al.*, 2018).

Parmi cette liste non exhaustive des applications de la BS, nous pouvons retrouver le développement de la « cellule minimale ».

2.3 Concept de cellule minimale

Un des principaux axes de la BS est de développer la cellule la plus simple possible avec seulement les gènes essentiels permettant la survie et l'auto-réplication, c'est ce qui est appelé la cellule minimale (Lam *et al.*, 2010). Cette cellule pourrait servir de châssis pour y intégrer des circuits génétiques artificiels et promouvoir l'ingénierie des systèmes biologiques. Ce concept repose sur plusieurs idées ; la cellule minimale ne contiendrait que les gènes essentiels pour une croissance indépendante des conditions idéales de laboratoire et pourrait se répliquer dans un environnement sans stress, avec les nutriments nécessaires fournis par le milieu de culture. La cellule minimale pourrait être totalement contrôlée et son comportement ainsi que son évolution pourraient être prédits en fonction des conditions environnementales (Glass *et al.*, 2017). La notion de gènes essentiels est importante puisque ceux-ci sont absolument requis pour la survie d'un organisme et sont considérés comme la base de la vie (Juhas *et al.*, 2011). Les premières études ont été faites pour déterminer ces gènes essentiels sur des organismes modèles tels que *E. coli* ou *Bacillus subtilis*. Deux approches ont été envisagées, expérimentale, faisant intervenir des délétions ou des inactivations de gènes, des approches ARN interférences ou de la mutagenèse globale par transposition (Kobayashi *et al.*, 2003; Baba *et al.*, 2006; Boutros and Ahringer, 2008; Kato and Hashimoto, 2008; Christen *et al.*, 2011), ou comparative

par des prédictions informatiques (McCutcheon and Moran, 2010; Juhas *et al.*, 2011) pour déterminer le set minimal des gènes essentiels. Cet ensemble de gènes reste néanmoins difficile à déterminer puisque, par exemple, des protéines peuvent avoir des fonctions redondantes au sein de la cellule, ou bien des protéines peuvent être considérées comme essentielles selon les conditions environnementales.

Les mycoplasmes sont les plus petits organismes vivants capable d'auto-réplication, c'est pourquoi ils sont considérés comme des organismes minimaux, se rapprochant le plus du concept idéal de cellule minimale (Cordova *et al.*, 2016). Le développement des techniques de séquençage a permis d'obtenir les séquences complètes de génomes bactériens et d'entreprendre des analyses de génomiques comparatives entre les différents organismes afin de déterminer le « core genome » (gènes communs possédés par un groupe ou échantillon donné) et donc l'ensemble des gènes essentiels permettant l'auto-réplication. Des premières études comparatives ont été réalisées à partir des génomes de *M. genitalium* (482 gènes) (Fraser *et al.*, 1995) et de *H. influenzae* (1743 gènes) (Fleischmann *et al.*, 1995), et ont permis de déterminer 256 gènes orthologues communs aux deux organismes représentant le premier ensemble de gènes essentiels (Mushegian and Koonin, 1996). Les données bio-informatiques ont ensuite été confirmées par des approches expérimentales de mutagenèse par transposition à grande échelle, induisant une inactivation individuelle des gènes chez *M. genitalium* et ont permis de déterminer que plus de 100 gènes sur 482 codant des protéines sont non-essentiels (Hutchison *et al.*, 1999; Glass *et al.*, 2006). Une comparaison de trois génomes minimaux de mycoplasmes pathogènes humains partageant la même niche (le tractus urogénital), *M. genitalium*, *M. hominis* et *U. parvum*, a déterminé 252 gènes essentiels communs entre ces trois espèces (Pereyre *et al.*, 2009). Les gènes concernés incluent des gènes codant pour le métabolisme de l'ADN, la synthèse de protéines et de nucléotides, le transport et l'adhésion. Cependant cet ensemble de gènes n'est pas suffisant pour être considéré comme le set minimal, puisque ces trois organismes possèdent des métabolismes énergétiques différents, essentiels à la croissance, et ne sont pas inclus dans les 252 gènes communs (Pereyre *et al.*, 2009). Une analyse plus récente corrobore en partie ces résultats en comparant le « core genome » de *M. hominis*, *M. genitalium*, *M. penetrans* et *M. fermentans*, décrivant ainsi 248 gènes en commun (Roachford *et al.*, 2017).

La minimisation de génome, permettant de se rapprocher du concept de cellule minimale, est réalisée suivant les deux principaux axes de la BS, les approches « top-down » et « bottom-up ». Ces dernières années, ces approches ont notamment été développées chez *M. mycoides* et *M. genitalium*. L'approche « top-down » commence avec une cellule naturelle

dont les gènes sont supprimés de façon séquentielle, jusqu'à la réduction suffisante du génome ou jusqu'à l'impossibilité de supprimer d'autres gènes sans affecter la viabilité de la cellule (Glass *et al.*, 2017). Le génome de *M. mycoides* de 1078 kb (901 gènes) a ainsi été réduit de 255 gènes (28 %) et 357 kb (33 %), après 22 délétions consécutives pour donner la souche JCVI-Syn1.0 (Gibson *et al.*, 2010). Des souches de *E. coli* et de *B. subtilis* ont aussi été obtenues après délétions de 29 à 35 % de leur génome (Juhas *et al.*, 2014).

L'approche « bottom-up » quant à elle, nécessite le design, la synthèse, et l'installation de génomes minimaux ou réduits basés sur la connaissance de l'ensemble de gènes nécessaires au maintien de la vie (Glass *et al.*, 2017). Elle a été réellement entreprise lorsque Gibson *et al.* ont réussi à construire le génome entier de *M. genitalium* à partir de 10 000 oligonucléotides de 50 nt synthétisés chimiquement, après des étapes d'assemblage et de recombinaison chez *E. coli* puis chez *S. cerevisiae* (Gibson *et al.*, 2008a; Gibson *et al.*, 2008b). Plus récemment, c'est par l'approche « bottom-up » que la version JCVI-Syn3.0 de *M. mycoides* a été obtenue (Hutchison *et al.*, 2016). C'est à l'heure actuelle la bactérie possédant le génome le plus petit capable de se répliquer (531 kb, 473 gènes dont 35 codant des ARN). Parmi ces gènes, 60 pourraient être encore supprimés, mais en affectant drastiquement la croissance et la viabilité de la cellule. Sur les 473 gènes, 149 n'ont pas de fonction connue, rendant impossible la compréhension totale des éléments nécessaires à l'obtention d'une cellule minimale (Hutchison *et al.*, 2016).

La construction d'une cellule minimale à partir de composants de base comme l'ADN, les lipides et les acides aminés est, à l'heure actuelle, un défi colossal afin d'obtenir une cellule correspondant à la cellule de base, à l'origine de la vie, la protocellule (Forster and Church, 2006; Jewett and Forster, 2010). Très récemment, des chercheurs sont parvenus à créer un précurseur de cellules artificielles en intégrant une réaction chimique et un approvisionnement énergétique dans des gouttelettes d'eau microscopiques (Beneyton *et al.*, 2018).

2.4 Limites de la biologie de synthèse

La BS est un domaine émergent reposant sur une combinaison de plusieurs domaines scientifiques ainsi que d'importantes technologies (séquençage et synthèse de l'ADN, microfluidique, développement de châssis biologiques à partir de souches de *E. coli*, *S. cerevisiae*, *B. subtilis* ou divers mycoplasmes) (Calero and Nikel, 2018). La BS entraine de grandes promesses concernant ses applications, comme la production de bio-carburant, la synthèse de molécules thérapeutiques, les outils de bio-remédiation, les capteurs biologiques, ou la bio-ingénierie de matériaux. Il existe cependant des limites technologiques et

scientifiques, tels que le coût des synthèses d'ADN et des recherches, la limitation dans la synthèse de grands fragments, le manque d'outils de modélisation et de design et le manque de connaissances fondamentales sur la régulation des gènes et voies métaboliques par exemple. Il se pose aussi des problèmes éthiques à propos de la BS, concernant l'impact sur l'environnement et la bio-diversité, le bio-terrorisme et les armes biologiques, la propriété intellectuelle, ainsi que les questions philosophiques voire religieuses (création de formes de vie artificielles) (Sources : www.igembordeaux.fr (Douglas and Savulescu, 2010; Church *et al.*, 2014)).

3. Systèmes de défense des bactéries contre l'ADN exogène

Les éléments génétiques mobiles tels que les séquences d'insertion (IS), les transposons, les éléments intégratifs et conjugatifs (ICE), les plasmides réplicatifs ou les phages, sont très largement impliqués dans le dynamisme et la plasticité des génomes bactériens. Le transfert de gènes entre espèces proches ou non, *via* des mécanismes comme la transduction, la conjugaison, la fusion ou la transformation, est fondamental pour l'évolution et l'adaptation des procaryotes à différents stress ou à leur environnement. Les bactéries possèdent cependant de nombreux systèmes pour contrôler et limiter l'impact de l'ADN exogène. Les systèmes les mieux caractérisés sont les systèmes de restriction-modification (SRM) et le système de défense adaptatif CRISPR-Cas. Ces systèmes sont essentiels à l'évolution bactérienne par leur diversité et leur capacité à différencier de façon précise l'ADN étranger de l'ADN bactérien (Vasu and Nagaraja, 2013).

3.1 Systèmes de restriction-modification

3.1.1 Définition et nature des systèmes de restriction-modification

Les SRM ont été mis en évidence dans les années 1950 lorsque qu'une altération de la croissance d'un bactériophage infectant *E. coli* a été observée (Luria and Human, 1952; Luria, 1953). Ces systèmes semblent propres aux procaryotes (eubactéries et archées) et à leurs phages (Roberts and Macelis, 1997; Oliveira *et al.*, 2014). Ils se composent généralement de deux enzymes, une endonucléase ou enzyme de restriction (ER) et une méthyltransférase (ME). L'ER reconnait et clive l'ADN étranger à des sites spécifiques alors que la ME transfère des groupements méthyles sur ces sites spécifiques afin de permettre la discrimination entre l'ADN

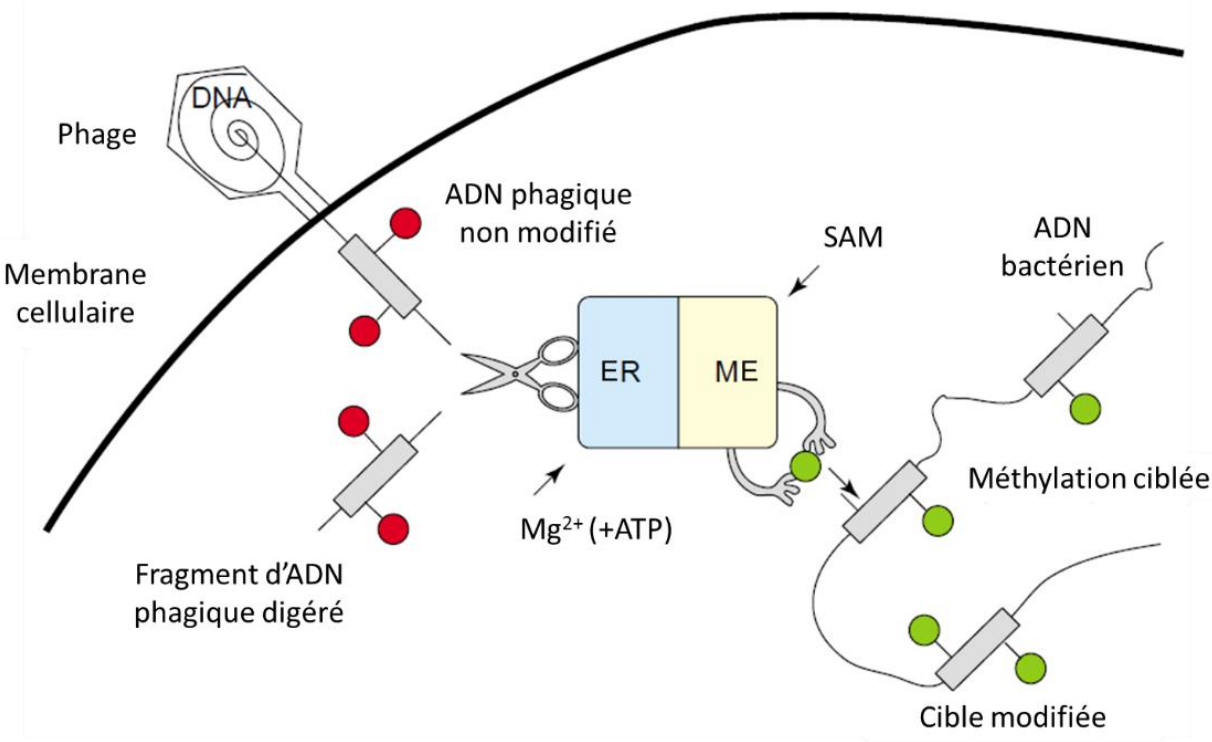


Figure 7. Le fonctionnement des systèmes de restriction-modification, d'après Tock et Dryden (2005). L'ADN bactérien est méthylé par la méthyltransférase (ME) de façon spécifique (rond vert) et reconnu comme tel par le complexe enzyme de restriction/méthyltransférase. L'ADN étranger tel que l'ADN de phage (rond rouge) n'est pas méthylé de façon appropriée et est donc hydrolysé par l'enzyme de restriction (ER). SAM : S-adénosyl-méthionine.

de la bactérie et l'ADN exogène non méthylé ou méthylé à des positions différentes (**Figure 7**), (Vasu and Nagaraja, 2013). Du fait de leur aptitude à reconnaitre le « soi » du « non-soi », propriété retrouvée dans notre système immunitaire, les SRM sont considérés comme des systèmes immunitaires bactériens primitifs (Bickle, 2004).

Les SRM sont classés en quatre groupes principaux, basés sur les sous-unités qui les composent, leur séquence cible, la position du clivage, les co-facteurs requis ainsi que leur spécificité de substrat (Roberts *et al.*, 2003). La comparaison entre les systèmes est résumée dans le **Tableau 6**. Ces systèmes, bien qu'organisés différemment, jouent un rôle biologique équivalent (Wilson, 1991). Les SRM de type I consistent en un complexe protéique hétéro-oligomérique de trois protéines (de restriction, de modification et de spécificité) et forment une enzyme portant les activités de restriction et de méthylation. Ce complexe s'attache à l'ADN double brin et va cliver entre 100 et 10 000 pb de part ou d'autre de la séquence cible (Dryden *et al.*, 2001). Des exemples connus sont EcoKI et EcoR124I (Murray, 2000; Dryden *et al.*, 2001). Les SRM de type II, quant à eux, contiennent des ER et ME pouvant agir de façon autonome, le site de clivage étant proche du site de reconnaissance ou au niveau même de ce site. Les enzymes de type II sont les plus étudiées et généralement très utilisées en biologie moléculaire (Pingoud *et al.*, 2005). Les SRM de type III sont moins complexe que les SRM de type I mais présentent des similarités. Ils sont composés de deux sous-unités, Mod (protéine de modification), et Res (ER). Ces systèmes sont des hétérotrimères (Mod_2Res_1) ou hétérotétramères (Mod_2Res_2) qui peuvent modifier et digérer l'ADN. Le clivage se produit à environ 25 pb du site de reconnaissance (Wilson, 1991; Ershova *et al.*, 2015). Les deux sous-unités sont nécessaires à la restriction alors que la sous-unité Mod suffit pour méthyler l'ADN (Oliveira *et al.*, 2014). Pour finir, les SRM de type IV fonctionnent à l'inverse des SRM de type I, II et III puisqu'ils ne sont constitués que d'une seule ER reconnaissant et digérant l'ADN méthylé à des sites spécifiques (Roberts *et al.*, 2003).

Les SRM sont très répandus chez les procaryotes puisque près de 4800 systèmes ont été identifiés chez plus de 400 espèces différentes, dans presque tous les domaines taxonomiques (Oliveira *et al.*, 2014; Roberts *et al.*, 2015). Les SRM les plus abondants sont les SRM de type II (42,4 %), suivis par les type I (29,5 %), les types IV (19,9 %) et les types III (8,2 %) (Oliveira *et al.*, 2014). La plupart des séquences de restriction reconnues par les SRM sont des palindromes de 4 à 8 nucléotides, les plus fréquentes comprenant 4 à 6 nucléotides (Roberts and Macelis, 2000). Il n'y a à ce jour qu'un seul palindrome de 4 nt pour lequel aucun SRM n'est reconnu (AATT). Cette précision alliée à l'existence de systèmes aussi variés, a fait des SRM un des outils les plus populaires de la biologie moléculaire. La diversité et la prévalence

Tableau 6. Caractéristiques et organisation des différents types de systèmes de restriction-modification (SRM), d'après Tock et Dryden (2005).

Type de SRM	**Type I**	**Type II**	**Type III**	**Type IV**
Exemples de SRM	EcoKI	EcorRI	EcoP1I	EcoMcrBC
gènes codant les sous-unités	*hsdR, hsdM, hsdS*	*ecorIR, ecorIM*	*mod, res*	*mcrB, mcrC*
	Trois sous-unités différentes (R, M et S) forment $R_2M_2S_1$ et M_2S_1.	Deux sous-unités différentes (R et M) forment R_2 ou M_1.	Deux sous-unités différentes (mod et res) forment mod_2res_2.	Deux sous-unités différentes présentes, McrB et McrC.
Activités enzymatiques	Restriction Méthylation ATPasique	Restriction Méthylation	Restriction Méthylation ATPasique	Restriction GTPasique
Co-facteurs pour le clivage	ATP, SAM, Mg^{2+}	Mg^{2+}	ATP, Mg^{2+}, (SAM)	GTP, Mg^{2+}
Co-facteurs pour la méthylation	SAM	SAM	SAM	Pas de méthylation
Site de clivage	Variable de 100 à 10000 bases du site reconnu	Proche ou au site reconnu	Entre 24 et 27 pb du site de reconnaissance	Entre les bases méthylées à des sites spécifiques

des SRM indiquent leur succès dans le monde bactérien comme mécanisme de défense. Il a été observé que 90 % des génomes contenaient au moins un SRM et 80 % de multiples (http://rebase.neb.com). Les prédictions bio-informatiques montrent une augmentation du nombre de SRM avec une augmentation de la taille des génomes (Vasu and Nagaraja, 2013).

Quelques contre-exemples existent, comme pour *Borrelia*, *Buchnera*, *Coxiella*, *Chlamydia* ou *Synechococcus* par exemple, qui ont des génomes entre 1 et 2,5 Mb, mais qui ne codent aucun SRM. De façon intéressante, certains de ces organismes sont des pathogènes intracellulaires obligatoires ou endosymbiontes et occupent donc la niche des cellules infectées (Vasu and Nagaraja, 2013). Sur les 8500 génomes analysés dans la REstriction dataBASE (REBASE), seulement 385 ne posséderaient aucun SRM (Roberts *et al.*, 2015). La fréquence de ces systèmes subit une grande variation en fonction des groupes bactériens puisque les *Epsilonbacteria* présentent de loin le plus grand nombre et la plus forte densité de SRM comparé aux autres genres. Par exemple, *Helicobacter pylori* possède en moyenne 11,4 SRM par génome (Lin *et al.*, 2001; Oliveira *et al.*, 2014).

Bien que les SRM soient efficaces dans la lutte contre l'entrée d'ADN étranger, viral notamment, ils demeurent imparfaits et certaines stratégies ont été développées par les phages pour contourner ces systèmes de défense, en particulier pour échapper aux ER. En effet, les phages peuvent produire certaines ME pouvant protéger leur propre génome (Tock and Dryden, 2005). D'autres modifications de l'ADN viral, comme des hydroxy-méthylations, des glycosylations ou des acétamidations sont possibles (Vasu and Nagaraja, 2013). Les phages T3 et T7 possèdent des protéines qui vont bloquer la restriction en inhibant les SRM de type I par fixation sur l'ADN (Bandyopadhyay *et al.*, 1985; Walkinshaw *et al.*, 2002). La sélection continue contre les sites de restriction amènent à une réduction de leur nombre dans les génomes de phages, ainsi une réduction du nombre de séquences palindromiques reconnues par les ER est souvent observée chez les phages. De plus, la longueur habituelle des sites de reconnaissances des ER varient de 4 à 8 pb, et compte-tenu de leur petite taille, les génomes de phages ont une fréquence plus basse de séquences palindromiques (Sharp, 1986). Enfin, un mécanisme anti-restriction a été décrit chez le phage T7, en exploitant les mécanismes de clivage des SRM de type III. L'enzyme EcoP1I, a besoin de deux copies du site de reconnaissance à la suite, orientées de manière opposée pour produire un clivage efficace. Le phage T7 s'est adapté en modifiant un des sites de coupure pour qu'ils soient dans la même orientation, empêchant ainsi la digestion par EcoP1I (Schroeder *et al.*, 1986). Certains phages sont aussi naturellement résistants aux SRM du fait de leur génome simple-brin, alors que les

ER requièrent des sites d'ADN double-brin. D'autres stratégies secondaires contre les SRM sont rapportées dans la littérature (Tock and Dryden, 2005; Ershova *et al.*, 2015).

Le rôle principal des SRM est de lutter contre l'ADN exogène mais certaines fonctions additionnelles peuvent être notées. En effet, les SRM sont connus pour la propagation dite égoïste de leur complexe génétique ER/ME, afin de promouvoir leur survie et leur fréquence (Naito *et al.*, 1995; Kobayashi, 2001). Au niveau génétique, les SRM joueraient un rôle dans la stabilisation des îlots génomiques puisqu'il a été observé que les complexes SRM étaient difficiles à remplacer par recombinaison homologue et qu'ils étaient étroitement liés aux éléments mobiles du génome (Handa *et al.*, 2001). Les SRM auraient également un rôle dans la recombinaison et les réarrangements de génome puisqu'ils entrainent la coupure de l'ADN en petits fragments, qui à l'intérieur de l'hôte peuvent être dégradés par des exonucléases ou bien agir en tant que substrats de la machinerie de recombinaison. Plusieurs études ont montré que l'ADN étranger coupé par des ER pouvait générer des produits stimulant la recombinaison homologue (Murray, 2002). Les SRM pourraient donc être impliqués dans la génération de la diversité génétique et l'hétérogénéité des populations bactériennes (Ershova *et al.*, 2015). D'autres rôles des SRM sont décrits, tels qu'une implication dans la nutrition, le renforcement de la méthylation de génome, ou une fonction entrainant une variabilité de phase de certains gènes (Vasu and Nagaraja, 2013).

Un des faits intéressants concernant les SRM, est qu'ils présentent des similitudes avec les systèmes toxine-antitoxine (TA) retrouvés chez les bactéries. L'ER correspondrait à la toxine tandis que la ME serait l'antitoxine. Ces systèmes sont tous deux abondants chez les procaryotes, ils sont souvent retrouvés proches ou dans des éléments génétiques mobiles et joueraient un rôle dans la virulence et la défense de la bactérie (Mruk and Kobayashi, 2014).

D'un point de vue évolutif, les bactéries peuvent acquérir de nouveaux SRM et perdre les ancestraux. Différentes souches de la même espèce peuvent posséder des SRM différents certainement dû au fait que les SRM peuvent être transférés par transfert horizontal de gènes (Oliveira *et al.*, 2014). En analysant les « core genomes » de 43 espèces bactériennes, seulement 4 % codent pour des SRM, suggérant un rôle non essentiel dans le développement des bactéries (Oliveira *et al.*, 2014).

3.1.2 Chez les mycoplasmes

Chez les *Tenericutes*, phylum auquel appartiennent les mycoplasmes, il a été montré la deuxième plus haute densité de SRM. Cela peut paraître surprenant puisqu'il s'agit des bactéries possédant les plus petits génomes connus, mais de récents écrits ont mis en évidence un transfert

horizontal de gènes importants chez ce clade, ce qui peut favoriser l'acquisition de ces SRM (Sirand-Pugnet *et al.*, 2007a; Oliveira *et al.*, 2014; Citti *et al.*, 2018). Peu d'informations sont référencées concernant les SRM des mycoplasmes mais quelques études ont cependant permis d'en caractériser certains. Par exemple, plusieurs SRM ont été étudiés chez *M. capricolum* et *M. mycoides* subsp. *mycoides* (King and Dybvig, 1994b), la régulation d'un SRM de type I et la présence d'un système de type III ont été décrites chez *M. pulmonis* (Dybvig and Yu, 1994; King and Dybvig, 1994b; Dybvig *et al.*, 2007), la présence d'un SRM chez *M. arthritidis* a été démontrée après une analyse de fréquences de transformation avec ou sans méthylation du plasmide donneur (Voelker and Dybvig, 1996) et la structure 3D de la sous-unité S (de spécificité) d'un SRM de type I a été établie chez *M. genitalium* (Calisto *et al.*, 2005). Un SRM de type III et sa fonctionnalité ont plus récemment été caractérisés, chez *M. mycoides* subsp. *capri*, l'expression de la ME composant ce système pouvant être soumise à une variation de phase (Algire *et al.*, 2012). Enfin, le site d'attachement d'un régulateur transcriptionnel de SRM a été étudié chez les mollicutes et notamment *M. gallisepticum* (Fisunov *et al.*, 2017).

L'évolution et l'apport du séquençage, ainsi que la disponibilité des génomes de mollicutes a permis de mieux caractériser ces SRM chez ces bactéries. Ils semblent en effet être présents chez toutes les espèces de mycoplasmes séquencées jusqu'ici (Brocchi *et al.*, 2007; Roberts *et al.*, 2015). Le nombre et le type de gènes codant les SRM entre les différentes espèces de mycoplasmes sont variables. Une comparaison des SRM chez quelques espèces de mycoplasmes a été publiée (Brocchi *et al.*, 2007). Chez *M. hyopneumoniae*, trois gènes codant des ME putatives sont retrouvés sous forme de cluster, proche d'éléments transposables (Brocchi *et al.*, 2007). Chez les mycoplasmes, les séquences codant les SRM sont souvent retrouvés proches d'éléments génétiques mobiles, confirmant leur potentiel rôle dans la diversité et l'adaptation. Enfin les mycoplasmes ont des génomes riches en AT, favorisant ainsi la présence de multiples séquences répétées dans les gènes codant les SRM et indiquant que leur expression peut être sous le contrôle de mécanismes de variation de phase (Rocha and Blanchard, 2002; Brocchi *et al.*, 2007).

3.2 Systèmes CRISPR/Cas

3.2.1 Caractérisation du système CRISPR/Cas

Les systèmes CRISPR/Cas sont des systèmes de défenses bactériens adaptatifs, protégeant contre l'ADN étranger de phages lors d'infections, en reconnaissant et en clivant cet

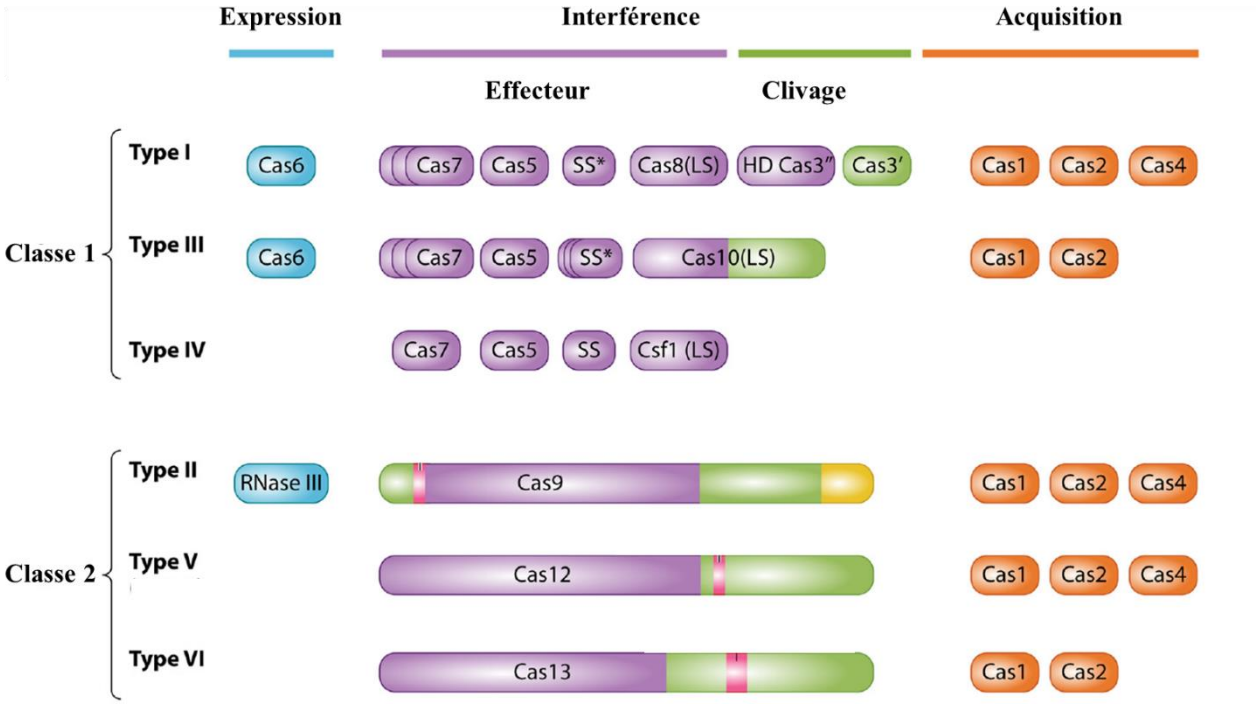


Figure 8. Organisation des différents types de locus CRISPR, en fonction des données de séquençage, adapté d'Ishino *et al.* (2018). Les protéines Cas sont groupées en deux classes principales, en fonction du nombre d'effecteurs composant le complexe CRISPR.

ADN (Horvath and Barrangou, 2010). Ces systèmes peuvent aussi cibler l'ARN (Hale *et al.*, 2009). Ces systèmes CRISPR ont été retrouvés chez 90 % des archées et 40 % des bactéries (Mojica *et al.*, 2000; Jansen *et al.*, 2002; Grissa *et al.*, 2007; Horvath and Barrangou, 2010).

L'abréviation CRISPR désigne une famille de séquences répétées dans l'ADN, se caractérisant par des séries de répétitions directes et courtes de 20 à 37 nucléotides et régulièrement espacées par des séquences appelées « spacer », souvent uniques, d'une vingtaine de nucléotides. Les Cas (CRISPR-associated) sont des protéines associées à ce locus CRISPR.

Ces répétitions ont été découvertes par hasard en 1987 chez *E. coli* (Ishino *et al.*, 1987). Lors du séquençage du gène *iap*, codant une enzyme protéolytique, il a été observé une séquence répétée dans la région en aval du gène. La fonction de ces répétitions été élucidée seulement en 2007, lorsqu'il a été montré que *Streptococcus thermophilus* pouvait acquérir une résistance contre les bactériophages en intégrant un morceau de génome du virus infectieux dans le locus CRISPR, permettant ainsi à la bactérie d'être protégée lors d'une ré-infection (Barrangou *et al.*, 2007). Il a alors été considéré que les bactéries possédaient un système semblable à l'immunité adaptative. La première étape consiste en l'acquisition de l'ADN étranger au niveau du locus CRISPR, puis la genèse d'un CRISPR-RNA (crRNA). La dernière étape correspond à l'assemblage du complexe et à son action entrainant une interférence ciblée (Horvath *et al.*, 2008). À l'heure actuelle, six différents types de locus CRISPR (I à VI) ont été mis en évidence, répartis en deux groupes (classes 1 et 2) (Makarova *et al.*, 2015; Savitskaya *et al.*, 2016; Ishino *et al.*, 2018) (**Figure 8, Tableau 7)**.

Le système CRISPR de type II est le plus étudié et le plus utilisé. Dans ce cas, l'ADN étranger envahissant la cellule est coupé en petits fragments de 20 pb correspondant au « spacer », incorporés dans le locus CRISPR entre les courtes séquences répétées. Les loci sont transcrits et génèrent des petits ARN (crRNA), qui vont servir de guide aux endonucléases, qui ciblent l'ADN étranger en se basant sur la complémentarité de séquences (Jinek *et al.*, 2012).

Les différents systèmes présentent des points communs, au niveau de la première étape, l'acquisition de l'ADN étranger est essentielle afin de produire de nouveaux spacers qui sont intégrés à une des extrémités du locus CRISPR. Ce locus est transcrit en précurseur du crRNA (pre-crRNA) qui est ensuite maturé en crRNA et fixé au complexe CRISPR-interférence (complexe spécifique de chaque classe de systèmes CRISPR) (Makarova *et al.*, 2015).

La plupart des protéines Cas ont des fonctions encore inconnues. Pour les systèmes appartenant à la classe 1, c'est tout un complexe de protéines qui s'assemblent pour s'attacher au crRNA, alors que les systèmes de classe 2 ne sont composés que d'une seule protéine, la

Tableau 7. Classification des différents systèmes CRISPR, adapté de Savitskaya *et al.* (2016)

Systèmes CRISPR	Type	Protéine type	Maturation pré-crRNA	Cible	Discrimination du soi et non-soi	Effecteurs
Classe 1	Type I	Cas3	Cas6	ADN	PAM	Cascade crRNA Cas3
	Type III	Cas10	Cas6 + facteurs inconnus	ADN ARN	Répétition CRISPR	Cmr, Csm crRNA Cas10
	Type IV	Csf1	?	?	?	?
Classe 2	Type II	Cas9	RNase III	ADN	PAM	Cas9 crRNA tracrRNA
	Type V	Cpf1	Cpf1	ADN	PAM	Cpf1 crRNA tracrRNA
	Type VI	C2c2	?	ARN + ADN ?	?	?

protéine Cas9, suscitant un intérêt pour l'édition de génome. Cette protéine, anciennement appelé Csn1, a été caractérisée comme un acteur important du mécanisme CRISPR de type II. Ce système a un mécanisme unique puisqu'il ne lui suffit que de la seule protéine Cas9 pour inactiver un gène. Comparé aux autres systèmes, cette protéine est aussi impliquée dans la destruction de l'ADN cible (Deltcheva *et al.*, 2011; Sapranauskas *et al.*, 2011).

Pour assurer le clivage à un site spécifique, la Cas9 doit former un complexe avec le crRNA et le trans-activating crRNA (tracrRNA). Ce tracrRNA est requis pour la maturation du crRNA et fonctionne en présence de la RNase III. Le duo tracrRNA et crRNA forme ce que l'on appelle l'ARN guide (ou sgRNA). Le complexe CRISPR de type II est composé de l'endonucléase Cas9 et de ce sgRNA, qui va amener l'enzyme à la séquence cible spécifique. Pour que ce complexe soit fonctionnel, la Cas9 requiert une séquence PAM (« protospacer adjacent motif ») conservée de 2 à 5 nt après le crRNA (Sternberg *et al.*, 2014). Le clivage se fait spécifiquement 3 nt en amont de la séquence PAM, sur les deux brins d'ADN, et est effectuée par les domaines endonucléasiques RuvC et HNH de la Cas9 (**Figure 9** (Sorek *et al.*, 2013; Jakociunas *et al.*, 2016)). Ce mécanisme a été très bien caractérisé chez *Streptococcus pyogenes* (Jinek *et al.*, 2012).

Dans le système de type I, le clivage est médié par l'enzyme Cas3, suite à une cascade d'actions protéiques (Barrangou, 2015). Le type III quant à lui, cible l'ADN de manière PAM-indépendante, avec un clivage effectué par l'enzyme Cas10 complexée à d'autres nucléases comme Cmr4. Ce système cible l'ADN ou l'ARN en fonction de la nucléase associée à Cas10 (Barrangou, 2015). Les systèmes IV, V et VI sont encore relativement incompris et peu caractérisés (**Figure 8, Tableau 7**), (Savitskaya *et al.*, 2016; Ishino *et al.*, 2018).

Ces systèmes ont ouvert la voie à l'édition de génome à grande échelle. En 2012, Les scientifiques Jennifer Doudna et Emmanuelle Charpentier ont développé un outil de modifications génétiques en combinant le tracrRNA et le crRNA *in vitro* en un simple ARN guide chimérique (sgRNA), ayant la même efficacité que les deux ARN agissant de façon séparée (Jinek *et al.*, 2012). L'intérêt de cette approche est de ne changer que la séquence du crRNA spécifique de la séquence cible. D'autres chercheurs ont contribué en parallèle à la compréhension et la mise au point de ces techniques, dont Feng Zhang (Cong *et al.*, 2013), et encore aujourd'hui, le brevet n'est pas clairement attribué. En septembre 2018, Feng Zhang (Broad Institute) a cependant remporté la propriété intellectuelle sur l'application des systèmes CRISPR/CAS sur les cellules eucaryotes (https://www.genengnews.com/gen-news-highlights/cafc-upholds-broad-institute-crispr-patents/81256219). Ces systèmes ayant un très fort potentiel, il existe une évolution rapide des méthodes et une diversité d'organismes sur

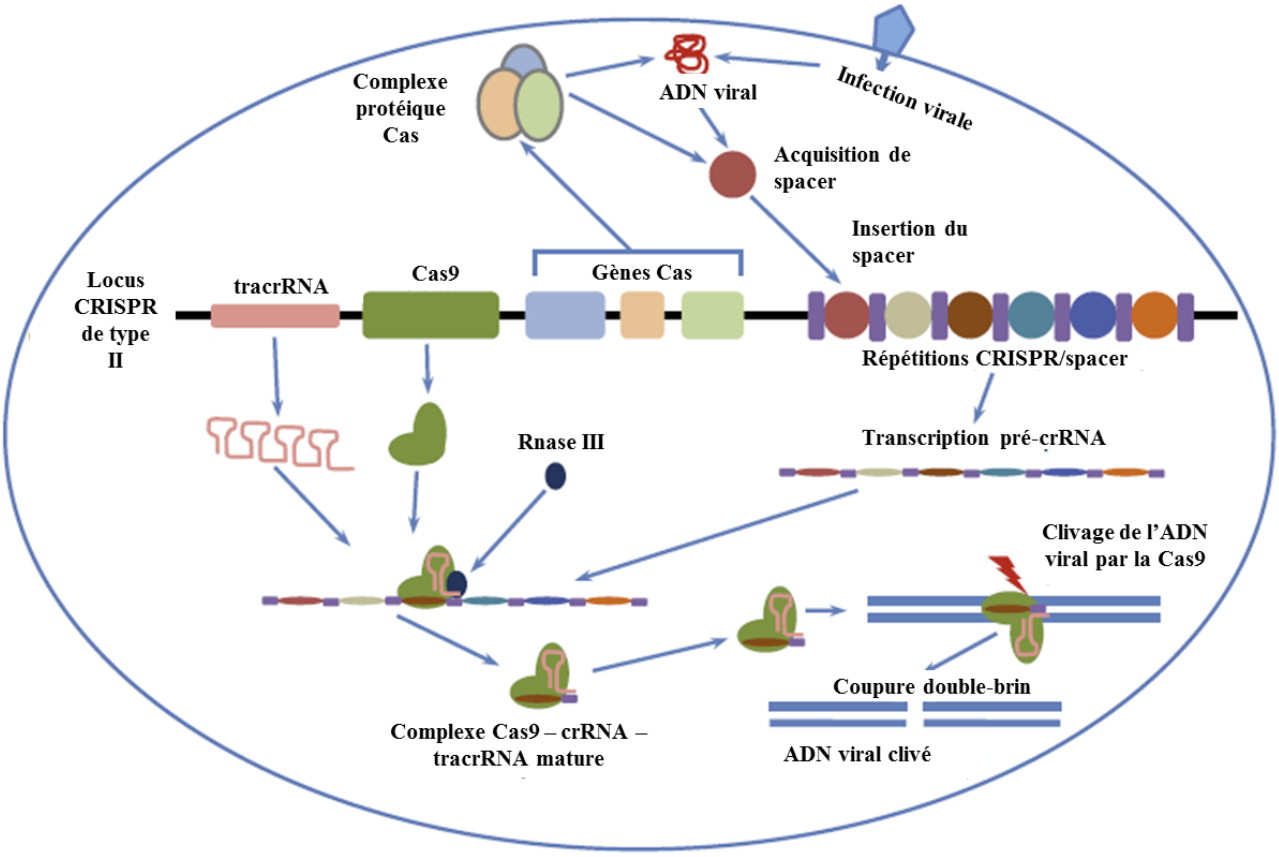


Figure 9. Mécanisme d'action du complexe CRISPR de type II, d'après Jakociunas *et al.* (2016). Après injection de l'ADN phagique dans la cellule, les protéines Cas découpent la molécule sous forme de séquences de 20 nucléotides (« spacer ») qui sont ensuite intégrées au locus CRISPR. La transcription de ce locus entraine la formation d'un pré-crRNA, qui est maturé par la RNase III et couplé à la protéine Cas9, qui cible spécifiquement l'ADN phagique double-brin à cliver et à dégrader en fonction du « spacer ».

lesquels cette technique est utilisée. Cette évolution se traduit par exemple par un nombre de publications de travaux en relation en forte augmentation, moins de 5 articles par an entre 2000 et 2006, entre 10 et 100 par an entre 2007 et 2012, et plus d'un millier par an depuis, jusqu'à 3 000 en 2017 (source : PubMed).

Ces systèmes sont donc présents naturellement chez beaucoup de bactéries, pour lutter contre l'infection par les phages. Certains phages ont cependant développé des systèmes dits « anti-CRISPR », afin de contourner ces mécanismes de défense. De récents travaux ont montré que certains phages produisaient des protéines anti-CRISPR, capables de se fixer à chaque partenaire du complexe CRISPR de façon distincte. Cela a été démontré pour les phages de *Pseudomonas aeruginosa*, qui inhibent le système CRISPR de type I de leurs hôtes permettant une infection efficace (Shabbir *et al.*, 2016). Ces protéines existeraient pour contrer un maximum de systèmes CRISPR (Hynes *et al.*, 2018; Zhu *et al.*, 2018). D'un point de vue biotechnologique, les systèmes anti-CRISPR permettraient de moduler l'activité et l'expression du complexe CRISPR pour mieux contrôler ses différentes fonctions (Pawluk *et al.*, 2018).

3.2.2 Édition de génome par approche CRISPR/Cas9

Outre sa fonction d'origine bactérienne dans l'immunité, la protéine Cas9 peut donc être utilisée comme un outil de génie génétique pour induire des cassures double-brin dans l'ADN. Ces ruptures peuvent conduire à l'inactivation du gène ou à l'introduction de gène(s) hétérologue(s) à travers deux types de réparation : le « Non Homologous End-joing » (NHEJ) ou le « Homology Direct Repair » (HDR ou HR). Le NHEJ peut entrainer des mutations ponctuelles lors de la réparation telles que des insertions, des mutations et des délétions, permettant l'apparition d'un codon stop ou juste le changement d'un acide aminé. Le HR, permet, grâce au substrat de recombinaison, d'insérer, supprimer ou substituer un plus long segment d'ADN (**Figure 10**), (Wiles *et al.*, 2015). En pratique, pour couper la cible déterminée, il faut dessiner un sgRNA correspondant aux 20 nt adjacents en amont d'une séquence PAM (NGG pour *S. pyogenes*). Des essais de sgRNA de 17 à 30 nt ont été testés avec succès (Ran *et al.*, 2013).

Des outils permettant de cibler et modifier le génome existaient déjà, comme les « Transcription activator-like effector nucleases » (TALEN) (Christian *et al.*, 2010) et les nucléases à doigts de zinc (ZFN) (Miller *et al.*, 2007). Ces techniques permettent de modifier le génome de façon spécifique et ciblée en modifiant la nucléase impliquée. Ces outils s'avèrent être plus complexes et plus longs à utiliser. En revanche, pour l'outil CRISPR, la modification et la synthèse d'un petit ARN suffisent à changer la cible déterminée. C'est grâce à son coût,

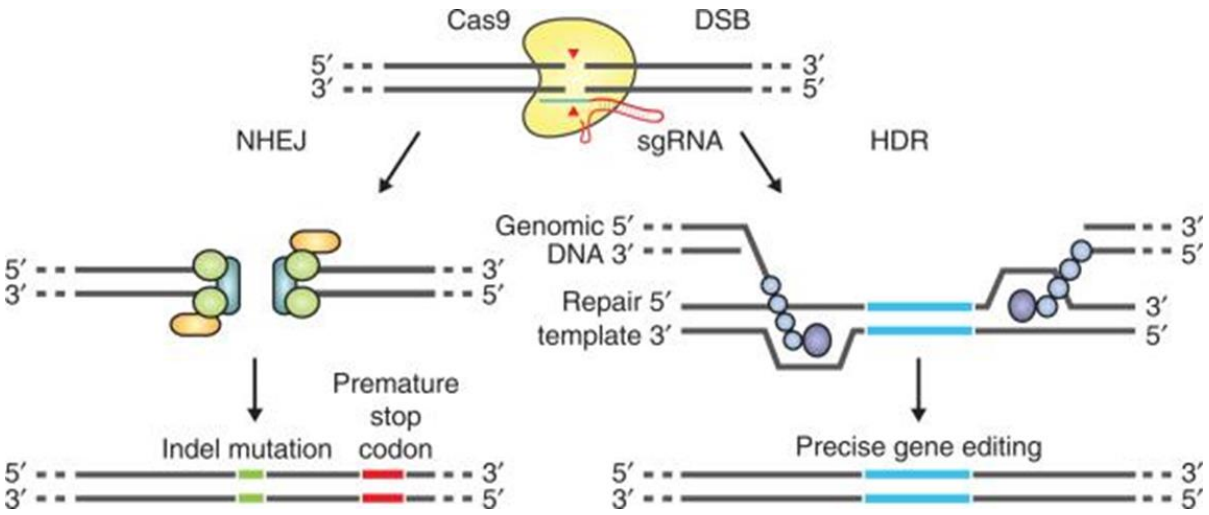


Figure 10. Mécanisme d'édition de génome par la technologie CRISPR, issu de Ran *et al.* (2016). Après coupure double-brin par le complexe CRISPR-sgRNA, les mécanismes de réparation de la cellule sont mis en route. La réparation NHEJ entraine l'apparition de mutations ponctuelles et potentiellement l'apparition d'un codon stop. Le mécanisme de HDR permet une édition précise du gène cible.

sa simplicité et sa rapidité que la technologie CRISPR connait un grand succès, au détriment des techniques déjà existantes (Mali *et al.*, 2013a). Cette approche semble également plus efficace (70 % d'efficacité chez le zebrafish et les plantes) que les ZFN et TALEN (1 à 50 % d'efficacité) pour cibler et modifier les gènes d'intérêt (Mussolino and Cathomen, 2011).

Il existe trois principaux types de Cas9, toutes obtenues en la modifiant. La plus connue est la version « wild-type », qui clive l'ADN double-brin de façon spécifique en fonction du sgRNA, résultant en l'activation de la machinerie de réparation. Une nouvelle version mutée de la Cas9 a été développée, la Cas9D10A, donnant une Cas9 avec une activité « nickase », ne coupant qu'un seul brin de l'ADN. Celle-ci permet en synthétisant deux sgRNA au lieu d'un, d'entrainer une cassure double-brin, avec deux activités « nickase », ce qui augmente considérablement la spécificité de la cible (Cong *et al.*, 2013). En effet, il existe un effet appelé « off-target » avec la Cas9 naturelle entrainant des coupures non spécifiques, dues à une certaine tolérance de mésappariement dans les bases qui sont reconnues par l'enzyme (Hsu *et al.*, 2014). Cet effet est diminué par l'augmentation de la spécificité avec une double activité « nickase ».

Le complexe CRISPR/Cas peut aussi être utilisé pour ne pas couper et juste activer ou réprimer un gène cible. Ceci est possible grâce à la dead-Cas9 (ou dCas9), qui est une Cas9 sans activité endonucléasique, du fait de mutations dans ses domaines HNH (H840A) et RuvC (D10A). Ces mutations empêchent le clivage de l'ADN mais pas la fixation du complexe à l'acide nucléique (Gasiunas *et al.*, 2012; Jinek *et al.*, 2012). La répression peut se faire par simple fixation à la séquence cible, empêchant la transcription. L'activation de gène se fait en utilisant le complexe dCas9-sgRNA, contenant un domaine activateur permettant le recrutement de l'ARN polymérase pour promouvoir la transcription de l'ADN (Bikard *et al.*, 2013). En fusionnant la dCas9 avec différents effecteurs, il est donc possible d'activer ou réprimer simplement des gènes. Cet outil peut aussi permettre de visualiser certaines zones en fixant un fluorochrome par exemple (Chen *et al.*, 2013; Gilbert *et al.*, 2013; Hu *et al.*, 2014).

La Cas9 la plus utilisée est celle de *S. pyogenes* (SpCas9), mais de nouveaux essais pour adapter et améliorer le mécanisme à différentes cellules en utilisant d'autres Cas9 sont à l'étude. Récemment mise en évidence, la NmCas9, Cas9 de *Neisseiria meningitidis*, a une efficacité similaire à SpCas9 mais elle n'utilise que le crRNA sans tracrRNA, et possède un PAM plus long (NGATT) plus spécifique (Hou *et al.*, 2013). Elle a été utilisée pour des cellules somatiques humaines. D'autres protéines orthologues de la Cas9, plus courtes, ont été décrites et étudiées chez différentes bactéries, telles que les Cas9 de *Campylobacter jejuni* (Kim *et al.*,

2017) et de *Staphylococcus aureus* (Ran et al., 2015). Ces différentes Cas9 permettraient une augmentation de l'efficacité de transformation (Esvelt *et al.*, 2013; Brooks and Gaj, 2018).

D'un point de vue technique, en plus de la détermination du sgRNA à synthétiser pour cibler spécifiquement le ou les gènes cibles, il faut trouver comment introduire les différents partenaires (sgRNA, Cas9, avec ou sans un substrat de recombinaison) dans les cellules à modifier génétiquement. Plusieurs approches sont disponibles, virale par l'intermédiaire d'adénovirus principalement (Chew *et al.*, 2016), et non virale par injection de vecteurs plasmidiques codant les différents partenaires, cette technique étant largement privilégiée (Bikard *et al.*, 2013; Mao *et al.*, 2016).

Le développement de ces outils CRISPR ont permis l'ingénierie de multiples organismes. Ils ont permis l'édition génétique de cellules humaines (Mali *et al.*, 2013b; Ran *et al.*, 2013; Wiles *et al.*, 2015; Zhou *et al.*, 2016), bactériennes (Pyne *et al.*, 2015), de zebrafish (Hwang *et al.*, 2013), de *C. elegans* (Friedland *et al.*, 2013), de plantes (Mali *et al.*, 2013a), de *Xenopus tropicalis* (Guo *et al.*, 2014), de la levure (DiCarlo *et al.*, 2013), de la drosophile (Gratz *et al.*, 2015), de lapin (Liu *et al.*, 2018), de cochon (Hai *et al.*, 2014), de rat (Ma *et al.*, 2014) de souris (Platt *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2014), d'archées (Gophna *et al.*, 2017) et même de virus (Yuen *et al.*, 2015). La technologie chez les bactéries reste cependant limitée. Au contraire de la levure où la recombinaison homologue fonctionne parfaitement, peu de bactéries possèdent une machinerie de réparation efficace pour reproduire un ADN double brin après coupure de la double hélice. Cela fonctionne tout de même par exemple chez *S. pneumoniae*, *E. coli* et *Streptomyces* (Jiang *et al.*, 2013; Cobb *et al.*, 2015). Chez les mycoplasmes, les systèmes ont été recensés et leur fonctionnalité est à l'étude (Pascal Sirand-Pugnet, données non publiées). Une seule étude récente démontre l'application directe du système CRISPR chez ces bactéries minimales (Mariscal *et al.*, 2018).

Parmi la liste non-exhaustive des résultats de l'utilisation de la technologie CRISPR, peuvent être citées les créations de vaches sans cornes (Carlson *et al.*, 2016) ou de vaches résistantes à la tuberculose (Gao *et al.*, 2017). Des moustiques mutés, résistants au paludisme ont également été développés, afin d'être libérés dans la nature pour limiter la transmission de cette maladie (Hammond *et al.*, 2016). Les CRISPR sont aussi utilisés dans le but d'améliorer la résistance de certaines variétés de plantes ou de cultures (Piatek *et al.*, 2015; Sovova *et al.*, 2017). Des cellules cancéreuses chez la souris ont pu être modifiées par l'intermédiaire d'un virus (Chow *et al.*, 2017). L'outil CRISPR permet également une avancée dans la compréhension de l'épigénétique puisqu'il permet l'édition de l'épigénome (Pulecio *et al.*, 2017; Adli, 2018). Plus récemment, le système CRISPR de type VI a été décrit comme ciblant

et modulant l'ARN de façon spécifique, grâce à l'effecteur Cas13a de *Leptotrichia wadei* (Abudayyeh *et al.*, 2017).

L'ingénierie de génome par CRISPR peut donc avoir de nombreuses applications, telles que : bloquer l'insertion d'ADN étranger, produire des vaccins, typer des souches, produire des antibiotiques ou molécules d'intérêt. Elle ouvre la possibilité de guérison de maladies génétiques telles que le cancer, la mucoviscidose, l'hémophilie, ou encore la maladie d'Alzheimer (Barrangou, 2015). La découverte et l'utilisation de cette technologie permet d'envisager la thérapie génique chez l'homme, ce qui est à la fois porteur d'espoir, et à la fois sujet à de nombreuses controverses.

3.2.3 Aspects éthiques

Avec l'émergence de la technologie CRISPR, l'édition de génome ciblée est un concept devenu réel, pouvant amener à se poser des questions sur les limites éthiques de ces approches. Les questions éthiques autour des CRISPR sont en partie dues à trois raisons. La première concerne le pouvoir et les limitations techniques de cette technologie, pouvant facilement modifier n'importe quel génome, où doit être la limite et jusqu'où l'expérimentation CRISPR peut-elle aller ? La deuxième concerne le futur des organismes modifiés, nous n'avons aucun recul sur les modifications génétiques dans le temps et leurs effets au cours des générations. Enfin, même si le génome est édité comme nous le souhaitons, la relation complexe entre l'information génétique et les phénotypes biologiques n'est pas complètement comprise et maitrisée. En effet, la plupart des traits biologiques sont déterminés par de complexes régulations de plusieurs facteurs et aucun recul ne peut aujourd'hui être perçu quant à la modification d'un seul gène. Nous pourrions ajouter à ces raisons la présence de mutations « off-target », non maitrisées à ce jour, qui peuvent donc avoir des conséquences inattendues (Brokowski and Adli, 2018).

La convention des droits de l'homme et la biomédecine a donné une définition et une limite assez claire en 1997 à propos de la modification génétique chez l'homme : « une intervention ayant pour objet de modifier le génome humain ne peut être entreprise que pour des raisons préventives, diagnostiques ou thérapeutiques et seulement si elle n'a pas pour but d'introduire une modification dans le génome de la descendance ». Cette règle, est aujourd'hui remise en cause suite au développement des CRISPR.

En 2015, des scientifiques chinois ont utilisé pour la première fois CRISPR/Cas9 pour modifier le génome d'embryons humains (Cyranoski, 2015; Liang *et al.*, 2015). Depuis et toujours en Chine, des patients atteints de cancer sont traités à l'aide de ce système (Rana 2018

https://www.wsj.com/articles/china-unhampered-by-rules-races-ahead-in-gene-editing-trials-1516562360). En 2016, la Grande-Bretagne autorise la manipulation génétique sur des embryons humains dans un institut de Londres et en 2017 à Portland (USA), des expérimentations sur embryons humains ont également été effectuées (Ma *et al.*, 2017) dans des conditions drastiques, n'autorisant pas le développement des embryons après quelques semaines. Bien que le but soit de faire de la thérapie génique humaine grâce aux CRISPR, des études récentes montrent qu'il existe une immunité adaptative préexistante chez certains humains, des anticorps anti-Cas9 étant retrouvés (Charlesworth *et al.*, 2018) et pouvant limiter les espoirs de réussite. Concernant l'effet « off-target », des scientifiques ont traité des souris en leur rendant la vue grâce à l'outil CRISPR (Wu *et al.*, 2016), mais 1 500 mutations non désirées ont été détectées dans leur génome (Schaefer *et al.*, 2017).

La législation est encore trop floue sur ce qui peut ou ne peut pas être fait, mais la régulation de cette technologie est à l'heure actuelle un des sujets prédominants pour les instances de bioéthique (Brokowski and Adli, 2018).

3.3 Autres systèmes de défense

Les bactéries ont développé plusieurs mécanismes pour se protéger contre les invasions de phages ou de plasmides. Parmi les systèmes de défenses ciblant directement l'ADN étranger, se trouvent les SRM et les systèmes CRISPR/Cas, longuement décrits. Ces deux systèmes peuvent agir ensemble et semblent compatibles pour améliorer la défense des cellules bactériennes en clivant leurs sites cibles de façon spécifique et permettent ainsi de lutter efficacement contre la contamination par les phages notamment (Dupuis *et al.*, 2013).

Il existe d'autres systèmes tels que l'infection abortive (abi). Ce mécanisme commence après l'infection et l'injection d'ADN viral dans la cellule hôte, qui est suivie par une interruption du développement du phage et la mort de la cellule bactérienne infectée. Même si la cellule est détruite, cette réaction empêche la propagation du phage aux populations bactériennes avoisinantes. Ce système est composé de multiples protéines, en nombre variable suivant les espèces bactériennes, et n'ont pour la plupart pas d'action sans infection par un phage (Chopin *et al.*, 2005; Vasu and Nagaraja, 2013).

Plus récemment, la mise en évidence de gènes impliqués dans des systèmes anti-phagiques inconnus, montre que malgré les connaissances sur les systèmes décrits (SRM et CRISPR), il existe encore d'autres mécanismes à élucider (Doron *et al.*, 2018).

Tableau 8. *Mollicutes* pour lesquels des outils génétiques sont disponibles, adapté de Renaudin *et al.* (2014).

Mollicutes	**Groupe phylogénétique**	**Méthodes de transformation**	**Replicon[1]**	**Mutagenèse par transposition[2]**	**Mutagenèse par recombinaison homologue[3]**	**Outils de Biologie de synthèse[4]**
M. pulmonis	Hominis	Electroporation, PEG	*OriC*	O	O	N
M. agalactiae	Hominis	Electroporation	*OriC*	O	O	N
M. bovis	Hominis	Electroporation	*OriC*	O	N	N
M. arthritidis	Hominis	PEG	N	O	N	N
M. synoviae	Hominis	Electroporation	*OriC*	N	N	N
M. hyorhinis	Hominis	Electroporation, PEG	*OriC*	O	N	N
M. hyopneumoniae	Hominis	Electroporation	*OriC*	N	N	N
M. pneumoniae	Pneumoniae	Electroporation	*OriC*	O	O	N
M. genitalium	Pneumoniae	Electroporation, PEG	N	O	O	N
M. gallisepticum	Pneumoniae	Electroporation, PEG Conjugaison	*OriC*	O	O	N
M. imitans	Pneumoniae	Electroporation	*OriC*	N	N	N
M. mycoides subsp. *mycoides*	Spiroplasma	PEG	*OriC*	O	N	N
M. mycoides subsp. *capri*	Spiroplasma	PEG	pKMK1, *OriC*	O	O	O
M. capricolum subsp. *capricolum*	Spiroplasma	PEG	pKMK1, *OriC*	O	N	O
S. kunkelii	Spiroplasma	Electroporation	pSci	N	N	N
S. phoeniceum	Spiroplasma	Electroporation	pSci	N	N	N
S. citri	Spiroplasma	Electroporation, PEG	*OriC*, pSci, SpV1-RF	O	O	N
M. florum	Spiroplasma	Electroporation, PEG Conjugaison	*OriC*	O	N	O

[1]*OriC*, plasmide *OriC* et dérivés ; pKMK1, plasmide pKMK1 de *M. mycoides* et dérivés ; pSci, plasmide pSci de *S. citri* et dérivés ; SpV1-RF, forme réplicative du virus de *S. citri* et dérivés.

[2] Insertion du Tn*4001* ou de dérivés dans le génome réalisée (O) ou non (N) en 2018.

[3] Mutagénèse par recombinaison homologue (O) ou non (N) en 2018.

[4] Approche de biologie de synthèse (O) ou non (N) en 2018.

4. Outils génétiques chez les mycoplasmes

Dans le but d'étudier les mycoplasmes et caractériser les relations entre les propriétés biologiques et les génomes, les outils génétiques sont requis. Pour ce faire, le développement d'outils de mutagenèse est nécessaire pour obtenir des mutants dans des gènes spécifiques, en induisant des délétions, des insertions, des mutations ponctuelles ou bien des remplacements de séquences entières d'ADN. Ce type de mutants permet d'identifier des facteurs de pathogénicité, de comprendre des voies métaboliques, ou de développer des souches atténuées qui pourraient être utilisées comme vaccins. Ces bactéries sont également intéressantes car elles représentent un modèle unique pour étudier l'évolution réductive des génomes (Sirand-Pugnet *et al.*, 2007a) et pour étudier le concept de cellule minimale (Glass *et al.*, 2006). Cependant, les outils génétiques disponibles chez les mycoplasmes sont rares en raison de plusieurs facteurs. Ce sont des bactéries exigeantes pour la culture et résistantes naturellement à de nombreux antibiotiques, rendant difficile l'utilisation de marqueurs d'auxotrophie ou de résistance à des antibiotiques actifs. De plus, peu ou pas de plasmides naturels sont identifiés chez les mycoplasmes, ce qui complique l'utilisation de potentiels vecteurs d'ADN naturels (Renaudin *et al.*, 2014). Quelques plasmides naturels ont tout de même été observés chez le groupe Mycoides (Bergemann *et al.*, 1989; King and Dybvig, 1992) et chez les spiroplasmes, notamment *Spiroplasma citri* GII3, qui possède sept plasmides (Saillard *et al.*, 2008). Plusieurs stratégies de mutagenèse ont été expérimentées chez les mycoplasmes, tels que la mutagenèse aléatoire par transposition, la mutagenèse ciblée par des plasmides suicides ou réplicatifs, ou encore de nouveaux outils faisant intervenir la BS. Les mollicutes chez lesquels des outils génétiques sont disponibles sont recensés dans le **Tableau 8** (Renaudin *et al.*, 2014).

4.1 La transformation

La transformation consiste en l'intégration d'un fragment d'ADN étranger dans une cellule. Deux méthodes existent chez plusieurs espèces de mycoplasmes, la transformation par électroporation ou la transformation au polyéthylène glycol (PEG). Actuellement il n'existe pas de méthode générale pour introduire l'ADN chez les mollicutes et ces deux méthodes sont utilisées de manière équivalente. Le choix de la méthode va dépendre de l'espèce, voire même de la souche et du type d'ADN à introduire (Renaudin, 2002). La technique d'électroporation consiste à soumettre les cellules à transformer à un champ électrique de haut voltage pendant quelques millisecondes. Les impulsions électriques provoquent une rupture réversible de la membrane cellulaire et permettent à l'ADN de pénétrer dans la cellule par diffusion et sous

l'action du champ électrique (Potter, 1988; Dower, 1990). La technique du PEG utilise un polymère déstabilisant également de manière réversible les membranes plasmiques, lors du contact avec les cellules. Cette molécule aurait également un rôle dans la fusion de l'ADN (Mercenier and Chassy, 1988).

Un choix important pour obtenir une méthode de transformation efficace est la sélection du marqueur de sélection à intégrer. Dû à l'absence de paroi cellulaire, les mollicutes sont naturellement résistants aux β-lactamines et tous les antibiotiques ciblant la paroi bactérienne. De plus, une mutation conservée de la sous-unité β de l'ARN polymérase les rend insensibles à la rifampicine. De ce fait, l'application de la génétique moléculaire chez ces bactéries souffre du manque de gènes de résistance aux antibiotiques appropriés qui pourraient être utilisés comme marqueur de sélection. Quelques marqueurs de résistance sont tout de même utilisés assez communément, tels que le gène de résistance à la tétracycline (*tet*(M)) du Tn*916* (Clewell and Gawron-Burke, 1986), le gène de résistance à la gentamicine (*aac*A-*aph*D) du Tn*4001* (Rouch *et al.*, 1987) et le gène de résistance à l'érythromycine (*erm*) chez *A. laidlawii* et *M. mycoides* (Dybvig, 1989; King and Dybvig, 1994a).

Le gène *tet*(M) confère un haut niveau de résistance aux tétracyclines chez toutes les espèces de mollicutes dans lesquelles il a été introduit telles que *A. laidlawii*, *M. agalactiae*, *M. arthritidis*, *M. capricolum, M. gallisepticum, M. genitalium, M. mycoides* subsp. *mycoides, M. mycoides* subsp. *capricolum*, *M. pulmonis, S. citri, S. kunkelii* et *S. phoeniceum*. De manière similaire, le gène de résistance à la gentamicine confère un haut niveau de résistance. Certains mycoplasmes sont naturellement résistants à la gentamicine, c'est pourquoi un dérivé du Tn*4001* a été construit, contenant le gène *cat* qui confère la résistance au chloramphénicol chez *S. aureus*, et a été utilisé pour transformer *M. pneumoniae* (Hahn *et al.*, 1999).

Plus récemment, la résistance à la puromycine a été décrite comme étant un nouveau marqueur pour la manipulation de génomes de mycoplasmes (Algire *et al.*, 2009). La puromycine est un inhibiteur de la traduction et les mycoplasmes sont incapables de pousser en sa présence, même à basse concentration. La résistance à la puromycine est acquise grâce au gène « puromycine N-acetyltransferase » (PAC) de *Streptomyces alboniger* et fonctionne dans toutes les espèces de mycoplasmes dans lesquelles il a été introduit, comme *M. gallisepticum*, *M. genitalium*, *M. pneumoniae*, *M. mycoides* ou *Mesoplasma florum*.

Bien que les niveaux de résistance acquise spontanée soient très dépendants de l'espèce de mycoplasmes, l'apparition de mutants résistants spontanés se produit plus souvent en présence d'érythromycine et de gentamicine, qu'en présence de chloramphénicol, tétracycline ou puromycine (Renaudin *et al.*, 2014).

Le promoteur de la spiraline, protéine abondante chez *S. citri*, a été utilisé pour exprimer de façon constitutive d'autres gènes chez *S. citri*. Ainsi, ce promoteur a pu augmenter l'expression des marqueurs de résistance chez d'autres espèces de mycoplasmes comme *M. agalactiae, M. capricolum, M. gallisepticum, M. genitalium, M. mycoides, M. pneumoniae* et *M. yeatsii* (Janis *et al.*, 2005; Algire *et al.*, 2009; Breton *et al.*, 2010a; Breton *et al.*, 2010b; Kent *et al.*, 2012). Le nombre croissant de marqueurs de sélection, comme le récent marqueur spectinomycine-streptomycine utilisé chez *M. florum* (Matteau *et al.*, 2017), ouvre la possibilité de générer des mutants double « knock-out » et de réaliser des études de complémentation chez une large gamme de mycoplasmes.

4.2 Mutagenèse aléatoire par transposition

Le but de la mutagenèse par transposition est d'introduire de façon aléatoire un transposon portant un marqueur de résistance dans le génome de l'organisme cible afin d'inactiver les gènes dans lesquels ces transposons se sont insérés. Ce type de mutagenèse permet d'obtenir des banques de mutants à partir desquelles il est possible de sélectionner les mutants pour un gène d'intérêt. En une seule expérience, une large banque de mutants peut être produite et chaque expérience peut élargir cette banque. Les deux transposons les plus utilisés chez les mycoplasmes sont le Tn*916* (18 kb), portant le gène de résistance à la tétracycline (Clewell and Gawron-Burke, 1986) et le Tn*4001* (4,7 kb) portant le gène *aac*A-*aph*D codant une enzyme responsable de la résistance à trois aminosides, la kanamycine, la gentamicine et la tobramycine (Rouch *et al.*, 1987).

Chez les mollicutes, la transposition a initialement été décrite chez *A. laidlawii* et *M. pulmonis*, puis chez *M. gallisepticum*, *M. hyorhinis*, et *M. mycoides* subsp. *mycoides*, espèces pour lesquelles l'insertion du transposon Tn*916* dans le chromosome confère une résistance aux tétracyclines (Dybvig and Cassell, 1987; Dybvig and Alderete, 1988; King and Dybvig, 1991; Cao *et al.*, 1994; Whetzel *et al.*, 2003). Les problèmes majeurs de ce transposon sont sa taille, qui limite l'efficacité de transformation et le fait qu'il puisse s'exciser spontanément et se réinsérer n'importe où dans le génome, entrainant une instabilité des mutants générés.

Le transposon Tn*4001*, a été utilisé chez certains mycoplasmes humains, *M. genitalium* et *M. pneumoniae*, pour générer des mutants avec une perte d'adhésion (Hedreyda *et al.*, 1993; Reddy *et al.*, 1996). L'identification de gènes impliqués dans la motilité et la pathogénicité a pu être réalisée chez *S. citri* grâce à ce transposon (Foissac *et al.*, 1997a; Foissac *et al.*, 1997b). Des dérivés de ce transposon ont été produits, en remplaçant le gène de résistance à la

gentamicine par le gène de résistance au chloramphénicol (Tn4001C) et aux tétracyclines (Tn4001T) (Dybvig *et al.*, 2000). Ces transposons ont été utilisés efficacement chez des mycoplasmes animaux (*M. pulmonis*, *M. arthritidis, M. bovis, M. agalactiae* et *M. mycoides*) (Dybvig *et al.*, 2000; Teachman *et al.*, 2002; Chopra-Dewasthaly *et al.*, 2005b; French *et al.*, 2008; Janis *et al.*, 2008).

Une autre application intéressante a été réalisée chez *M. pneumoniae*, avec la mise au point d'un variant du pMT85. Il s'agit d'un plasmide incluant un mini-transposon, le Tn4001C dont le gène codant la transposase est localisé à l'extérieur du transposon. Le plasmide étant non réplicatif, le gène codant la transposase est rapidement perdu résultant en un transposon inséré de manière stable dans le génome (Zimmerman and Herrmann, 2005). Ce type de transposition a également été produit chez *M. mycoides* subsp. *mycoides* (Janis *et al.*, 2008).

Enfin, la mutagenèse aléatoire globale en utilisant le Tn*916* a été utilisée chez *M. genitalium* et *M. pneumoniae* afin d'identifier les gènes essentiels. Ce projet a été basé sur l'idée de construire une cellule minimale (voir section 2.3, concept de cellule minimale) (Hutchison *et al.*, 1999; Glass *et al.*, 2006; Lluch-Senar *et al.*, 2015). Plus récemment, le même genre d'étude a été faite chez *M. pulmonis* (French *et al.*, 2008) et *M. florum* (Baby *et al.*, 2018b).

Quelques inconvénients peuvent aussi être observés, notamment au niveau du coût et du temps pour générer ces librairies puisque les efficacités de transformation des mycoplasmes demeurent faibles, de l'ordre de 10^{-9} à 10^{-7} transformants/UFC/µg de plasmide. De plus, il peut s'avérer difficile de générer un mutant réellement d'intérêt puisque seuls les gènes non essentiels peuvent être modifiés avec cette approche. L'intégration du Tn*916* peut préférentiellement s'intégrer dans des « hotspots » plutôt que de façon réellement aléatoire (Whitley and Finch, 1989; Nelson *et al.*, 1997). C'est pourquoi certains projets ont visé à développer une mutagenèse dite ciblée pour réduire le temps requis pour créer et étudier un mutant donné.

4.3 La mutagenèse ciblée

La mutagenèse ciblée a pour but d'inactiver ou modifier précisément des gènes candidats chez une espèce donnée. Dans la plupart des cas, ce type de stratégie est relié à la capacité intrinsèque de l'organisme à effectuer le mécanisme de recombinaison homologue dans le but d'introduire un fragment d'ADN dans un gène candidat (par simple « crossing-over »), ou de le remplacer par l'ADN extracellulaire (double « crossing-over »). Le substrat de recombinaison contient la plupart du temps un marqueur de sélection et des séquences

d'ADN à chaque extrémité, complémentaires de la zone du génome à modifier. La taille de ces séquences dépend de l'efficacité de la recombinaison homologue chez l'organisme cible.

4.3.1 La mutagenèse ciblée en utilisant des plasmides suicides

Quelques études de mutagenèse ciblée en utilisant des plasmides suicides ont été rapportées chez les mollicutes. Un plasmide suicide est un plasmide non réplicatif qui va être perdu au fur et à mesure des divisions cellulaires. Un plasmide contient généralement une origine de réplication de *E. coli* (colE1) mais si celle-ci n'est pas spécifique de l'espèce dans laquelle le plasmide est introduit, cette origine devient non fonctionnelle et le plasmide est donc dit suicide.

La première réussite d'inactivation de gène par recombinaison homologue chez les mollicutes a été réalisée chez *A. laidlawii* (Dybvig and Woodard, 1992). Dans cette étude, l'inactivation du gène *rec*A a été obtenue par une recombinaison entre le chromosome et un plasmide suicide ciblant ce gène. Le gène *rec*A codant une protéine impliquée dans la réparation de l'ADN, les mutants obtenus étaient caractérisés par un déficit de ce mécanisme lorsqu'ils étaient soumis aux radiations UV et à un agent alkylant (Dybvig and Woodard, 1992). Plus récemment, chez *M. genitalium*, deux gènes candidats ont été supprimés en utilisant des plasmides suicides (Dhandayuthapani *et al.*, 1999; Dhandayuthapani *et al.*, 2001). Une autre étude dans laquelle le gène *rec*A est ciblé chez *M. genitalium* par un plasmide non réplicatif a été réalisée en 2012 (Burgos *et al.*, 2012). Cette approche a été réalisée chez d'autres espèces de mycoplasmes, *M. gallisepticum* (Cao *et al.*, 1994), *M. agalactiae* (Chopra-Dewasthaly *et al.*, 2008) et *S. citri* (Duret *et al.*, 1999)(**Tableau 8**), mais la fréquence de recombinaison est généralement faible, jusqu'à 10^{-6} transformants/UFC/µg de plasmide.

4.3.2 La mutagenèse ciblée en utilisant des plasmides *oriC*

Les plasmides o*riC* sont des plasmides artificiels réplicatifs, contenant l'origine de réplication *oriC* de l'espèce à transformer. Dans les plasmides développés pour les mollicutes, la région *oriC* sélectionnée inclut généralement le gène *dnaA*, ainsi que les régions intergéniques environnantes comprenant les boîtes DnaA. Le gène *dnaA* code un facteur d'initiation de la réplication de l'ADN chez les procaryotes. L'interaction entre ce facteur et les boites DnaA, qui sont des petites séquences de 9 pb chez les mycoplasmes (Lartigue *et al.*, 2003), entraine la séparation des brins d'ADN, l'initiation de la réplication et la formation des fourchettes de réplication (Neidhardt and Curtiss, 1996). Avec l'amélioration des techniques de

séquençage, les régions à cloner pour obtenir des plasmides *oriC* sont identifiées plus facilement, démocratisant le développement de ce type d'outils chez les mollicutes. En général, l'introduction du gène *dnaA* et de ses régions intergéniques adjacentes sont suffisants pour obtenir des plasmides réplicatifs qui se maintiennent correctement en tant qu'élément extra-chromosomique. De tels plasmides ont été construits avec succès chez des mycoplasmes animaux ou de plantes, tels que *S. citri* (Ye *et al.*, 1994; Lartigue *et al.*, 2002), *M. pulmonis* (Cordova *et al.*, 2002), *M. mycoides* subsp. *mycoides*, *M. mycoides* subsp. *capri* et *M. capricolum* (Lartigue *et al.*, 2003; Janis *et al.*, 2005), *M. agalactiae* (Chopra-Dewasthaly *et al.*, 2005a; Sharma *et al.*, 2015), *M. gallisepticum* et *M. imitans* (Lee *et al.*, 2008b), *M. hyopneumoniae* (Maglennon *et al.*, 2013; Ishag *et al.*, 2016), *M. synoviae* (Shahid *et al.*, 2014), *M. bovis* (Li *et al.*, 2015; Sharma *et al.*, 2015), *M. florum* (Matteau *et al.*, 2017), *S. eriocheris* (Terahara *et al.*, 2017), *M. hyorhinis* (Ishag *et al.*, 2017a) et M. pneumoniae (Blotz *et al.*, 2018).

Comme chez *B. subtilis* où les plasmides *oriC* semblent incompatibles, les plasmides *oriC* de *S. citri* peuvent ne pas être maintenus de façon stable et sont alors intégrés par recombinaison à la région *oriC* du chromosome. Ce type d'insertion semble être stable en présence ou en l'absence de sélection (Renaudin *et al.*, 2014). En comparaison aux plasmides suicides, l'utilisation de plasmides réplicatifs permet d'augmenter le temps durant lequel la recombinaison homologue peut se produire. Cependant, lors de ce type d'approche, la recombinaison se passe plus souvent à la région *oriC* plutôt qu'au gène cible. En fonction de ces résultats, l'utilisation de vecteurs avec une *oriC* réduite aux séquences minimales nécessaires à la réplication augmente la fréquence de recombinaison aux gènes cibles (Lartigue *et al.*, 2002). Le nombre de boîtes DnaA est un facteur important pour la bonne réplication des plasmides *oriC* et ce nombre varie en fonction des espèces. Pour tester la spécificité de l'hôte, certains plasmides *oriC* d'une espèce ont été introduits chez des espèces bactériennes plus ou moins proches, indiquant que la gamme d'hôte est souvent restreinte aux espèces les plus proches phylogénétiquement, même si des contre-exemples existent, comme la réplication du plasmide pSD4 de *S. citri* chez *M. capricolum* (Lartigue *et al.*, 2003; Renaudin *et al.*, 2014).

Malgré le développement de plasmides réplicatifs chez de nombreuses espèces de mollicutes, il n'en existe pas un qui fonctionne chez tous les mycoplasmes. C'est un facteur limitant de cette approche car le développement de plasmide *oriC* ne s'avère pas toujours simple, par la difficulté à cibler la bonne région *oriC* ou par la difficulté de certaines espèces à maintenir ces plasmides ou qui demeurent réfractaires à la transformation. De plus, la recombinaison de ces plasmides *oriC* avec le chromosome peut être difficile puisque la

recombinaison chez les mollicutes restent très faible, en partie due au fait que les gènes consacrés à la réparation de l'ADN sont peu ou pas présents chez ces bactéries (Rocha *et al.*, 2005). Certaines équipes ont essayé de contourner ce problème en insérant le gène *recA* dans les génomes de *M. mycoides* subsp. *capri* (Allam *et al.*, 2010) et *M. hyorhinis* (Ishag *et al.*, 2017b). Les résultats ont montré une augmentation de la recombinaison homologue mais cette amélioration reste restreinte à ces espèces de mycoplasmes.

4.4 Approche de biologie synthétique

Dans le but de modifier le génome des mycoplasmes à grande échelle, des outils faisant intervenir la BS ont été récemment mis en place. Cette approche repose sur trois étapes majeures, le clonage du génome entier dans la levure, la modification de ce génome avec les outils génétiques efficaces de la levure et la transplantation du génome modifié dans une cellule receveuse afin qu'il puisse s'exprimer. Les premières études montrant ces outils ont été réalisées au JCVI à la fin des années 2000 (Lartigue *et al.*, 2007; Gibson *et al.*, 2008a). Ces travaux ont permis d'ouvrir la voie à de nouveaux outils génétiques chez les mycoplasmes.

En effet, la levure *S. cerevisiae* a longtemps été utilisée comme hôte pour propager des fragments d'ADN d'organismes variés allant de virus à l'ADN humain à l'aide par exemple de "Yeast Artificial Chromosomes" (YAC) (Ketner *et al.*, 1994; Larionov *et al.*, 1996; Kouprina *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 2003). C'est la méthode de TAR-cloning qui permet d'utiliser la levure comme un outil en y intégrant de l'ADN ; elle est basée sur la capacité de cet organisme à effectuer la recombinaison homologue (Kouprina and Larionov, 2006). Comme évoqué dans la section 2, La biologie de synthèse, le premier génome de mycoplasme à avoir été cloné dans la levure a été celui de *M. genitalium*, pour lequel des cassettes de milliers d'oligonucléotides ont été assemblées dans *E. coli*, puis dans *S. cerevisiae* afin d'obtenir le génome entier de cette bactérie chez la levure après des étapes de recombinaison homologue (Kouprina and Larionov, 2003; Gibson *et al.*, 2008b). Afin de maintenir l'ADN dans la levure, plusieurs éléments sont requis et sont ajoutés aux fragments à cloner. Il s'agit d'éléments levure : un marqueur d'auxotrophie histidine (HIS), un centromère (CEN) et une origine de réplication de levure (ARS), qui sont nécessaires à la sélection et la réplication dans la levure tel un plasmide centromérique.

À l'heure actuelle, de nombreux génomes bactériens ont été clonés dans la levure, comme *M. genitalium* (Gibson *et al.*, 2008a; Gibson *et al.*, 2008b; Benders *et al.*, 2010), *M. mycoides* (Lartigue *et al.*, 2009; Benders *et al.*, 2010; Gibson *et al.*, 2010), *M. pneumoniae* (Benders *et al.*, 2010), *A. laidlawii* (Karas *et al.*, 2012), *Prochlorococcus marinus* (Tagwerker

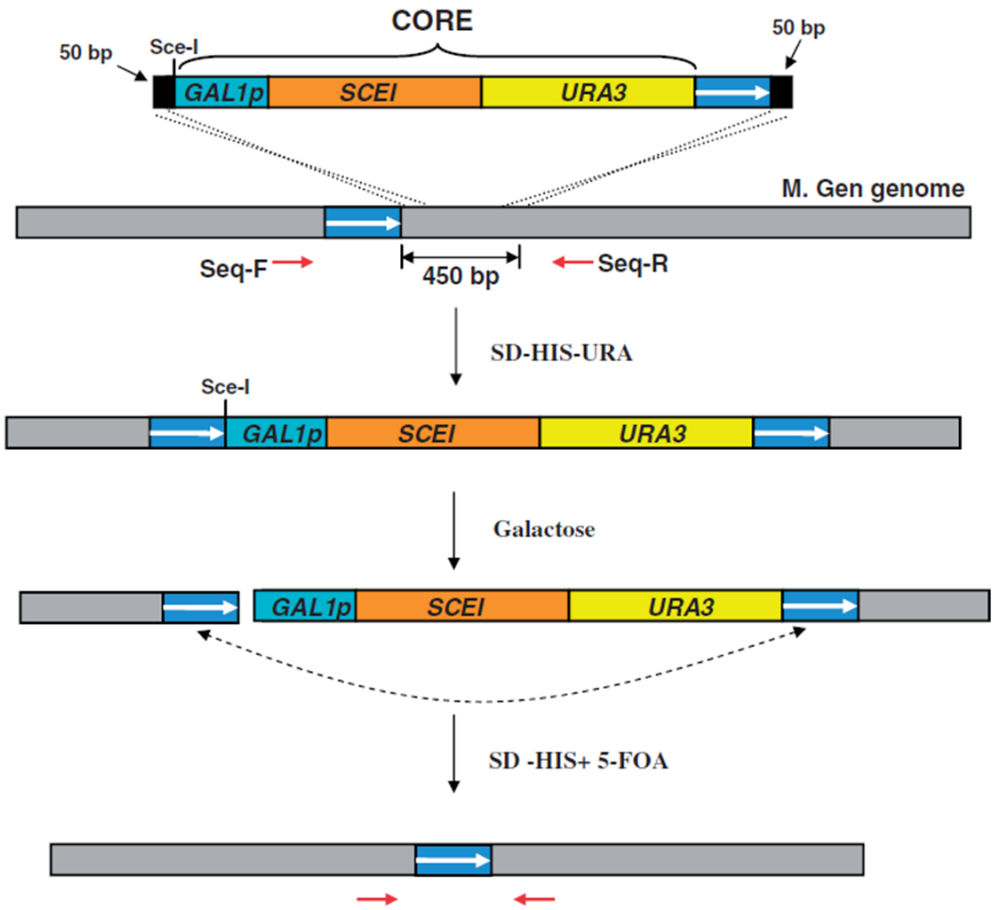


Figure 11. Délétion génétique sans trace par la méthode TREC, issu de Noskov *et al.* (2010). Par recombinaison homologue, une région de 450 pb dans le génome de *M. genitalium* est remplacé par une cassette de mutagenèse contenant un « core » d'inactivation (un site de reconnaissance de 18 pb I-SceI, le gène *sceI* sous le contrôle du promoteur GAL1 et le marqueur URA3) et un fragment d'ADN (flèche blanche) identique à la région en amont de la région cible. Le remplacement génère des séquences répétées en tandem. Le galactose induit l'expression de I-SceI qui va créer une coupure double-brin près du site cible. La cassure double-brin provoque une recombinaison homologue intra-moléculaire (pointillés) entre les séquences répétées, entrainant une excision du « core ». Lors de la méthode TREC-IN (Chandran *et al.* 2014), le gène à insérer est ajouté derrière la séquence répétée dans le « core » de mutagenèse.

et al., 2012), *H. influenzae* (Karas *et al.*, 2013) et *M. florum* (Baby *et al.*, 2018a). Ces génomes ont des tailles comprises entre 0,6 et 1,8 Mb et un GC % variant de 24 à 40 %. Une fois le génome cloné dans la levure, il est modifié par les outils génétiques disponibles chez cet organisme. Ces techniques sont basées sur les propriétés de recombinaison homologue de la levure et trois différentes méthodes sont à l'heure actuelle utilisées pour modifier les génomes de mycoplasmes, les méthodes TREC et TREC-IN (**Figure 11**), (Noskov *et al.*, 2010; Chandran *et al.*, 2014), et la méthode CRISPR (Tsarmpopoulos *et al.*, 2016).

La méthode TREC (« Tandem repeat coupled with endonuclease cleavage ») permet de modifier le génome bactérien sans trace et requiert deux évènements de recombinaison. Pour cela, la région cible est tout d'abord remplacée par une cassette de mutagenèse contenant un site de reconnaissance de l'enzyme I-SceI, le gène *sceI* sous le contrôle du promoteur GAL1, un marqueur de sélection uracile (URA3) et une séquence homologue de 50 pb en 5' du gène cible. Le remplacement génère des séquences répétées. L'expression d'I-SceI est ensuite induite par ajout de galactose, générant une coupure double-brin au site cible. Par recombinaison homologue entre les séquences répétées, la cassette de mutagenèse est excisée et donne une délétion du gène cible sans trace (**Figure 11**), (Noskov *et al.*, 2010). La méthode TREC-IN (« TREC-assisted gene knock-in ») est basée sur le même principe. Un gène est inséré après les 50 bases homologues du gène cible sans trace (**Figure 11**), (Chandran *et al.*, 2014).

La méthode CRISPR a été développée pour modifier les génomes clonés suite aux travaux de modifications du génome de levure par la technologie CRISPR/Cas9 (DiCarlo *et al.*, 2013) voir section 3.2, Les systèmes CRISPR/Cas). Les différents partenaires, un plasmide codant la Cas9, un plasmide portant l'ARN guide et un substrat de recombinaison homologue, sont introduits pour cibler spécifiquement le génome de mycoplasme cloné. Cette approche a été développée chez *M. mycoides* subsp. *capri* GM12, en créant une délétion sans trace, en une seule étape, du gène *glpO*, codant l'oxidase glycerol-3-phosphate (Tsarmpopoulos *et al.*, 2016).

Enfin, pour obtenir un mycoplasme génétiquement modifié par approche BS, après clonage et modification du génome bactérien dans la levure, il est nécessaire d'effectuer une transplantation. La transplantation de génome est une étape limitante, consistant à extraire un génome bactérien entier et à l'introduire dans une cellule dite receveuse, résultant en une nouvelle cellule avec le génotype et le phénotype du génome donneur. Le génome donneur est marqué grâce à une cassette de résistance permettant de sélectionner les mutants possédant ce génome et permettant d'éliminer les cellules avec le génome de la cellule receveuse.

La première transplantation de génome a été effectuée au JCVI ; le génome entier de *M. mycoides* a été extrait, puis introduit dans une cellule receveuse de *M. capricolum* par

transformation au PEG (Lartigue *et al.*, 2007), résultant en une cellule n'ayant plus aucune trace du génome receveur. Le séquençage du génome transplanté a permis de conclure qu'il n'y a pas eu d'évènements de recombinaison entre les deux génomes, démontrant un changement propre d'un génome d'une cellule donneuse à une cellule receveuse. Cette technique a permis d'ouvrir la voie dans l'insertion de grands fragments d'ADN chez les mycoplasmes et notamment des génomes modifiés. Ainsi, le génome de *M. mycoides* cloné puis modifié dans la levure a été transplanté dans *M. capricolum* (Lartigue *et al.*, 2009), et a permis d'obtenir le premier mycoplasme génétiquement modifié par des outils de BS (Lartigue *et al.*, 2009). Cette étape de transplantation a permis de développer des mycoplasmes possédant un génome synthétique réduit, se rapprochant du concept de cellule minimale (Voir Section 2.3, Concept de cellule minimale (Gibson *et al.*, 2010; Hutchison *et al.*, 2016)).

Cette étape de transplantation de génome a longtemps été limitée à deux bactéries très proches qui sont *M. mycoides* subsp. *capri* et *M. capricolum* subsp. *capricolum* (Lartigue *et al.*, 2014; Kannan *et al.*, 2016; Schieck *et al.*, 2016; Tsarmpopoulos *et al.*, 2016). La distance phylogénétique entre les cellules donneuses et receveuses dans cette étape de transplantation est un facteur déterminant et limitant. Son étude a permis d'étendre la transplantation à d'autres mollicutes comme *M. leachii* ou *M. putrefaciens* (Labroussaa *et al.*, 2016). Récemment, la transplantation de génome a été mise en place chez *M. florum* (Baby *et al.*, 2018a).

En résumé, depuis la première introduction d'ADN exogène chez les mollicutes dans les années 1990, d'énormes progrès ont été réalisés pour obtenir des outils génétiques chez ces bactéries particulières (**Tableau 8**). Des systèmes de mutagenèses aléatoire et ciblée ont été développés chez différentes espèces, mais le meilleur outil pour manipuler ces génomes semblent être l'approche faisant intervenir la BS.

4.5 Modifications génétiques chez *M. hominis*

Chez *M. hominis*, les nombreuses tentatives de transformation se sont montrées infructueuses en utilisant des constructions plasmidiques diverses (vecteurs suicides, vecteurs réplicatifs, transposons) que ce soit par électroporation ou méthode au PEG (Bébéar C, résultats personnels). Seul un transfert conjugatif du transposon Tn*916* de *E. faecalis* a été décrit (Roberts and Kenny, 1987). Une équipe russe a également décrit la transformation de *M. hominis* par électroporation avec le plasmide pAM120 (Aleksandrova *et al.*, 2000). Cependant les résultats de cette étude n'ont pas été reproduits.

Récemment, la technique de mutagenèse chimique appelée TILLING (Targeted-Induced Local Lesions in Genomes) a été mise en place chez *M. hominis* au laboratoire (Pereyre

et al., 2018), travaux auxquels j'ai pu participer pendant cette thèse (**voir annexe**). Cette technique, développée chez *Arabidopsis thaliana* (McCallum *et al.*, 2000), combine une étape de mutagenèse chimique générant des mutations aléatoires ponctuelles avec une technique de criblage de l'ADN permettant d'identifier au sein d'une population de mutants, ceux affectés dans un gène d'intérêt. Cette méthode a permis d'obtenir des mutants dans les gènes codant l'adhésine majeure Vaa et l'oligopeptide OppA. Cette méthode demeure cependant coûteuse, longue et fastidieuse. La technique peut également engendrer plus d'une mutation autour du génome (Pereyre *et al.*, 2018). Des outils de génomique fonctionnelle chez *M. hominis* sont donc toujours recherchés.

CHAPITRE 1

CHAPITRE 1. CLONAGE, STABILITÉ ET MODIFICATION DU GÉNOME DE *MYCOPLASMA HOMINIS* DANS LA LEVURE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Cloning, stability and modification of *Mycoplasma hominis* genome in yeast

Fabien Rideau, Chloé Le Roy, Elodie C. T. Descamps, Hélène Renaudin, Carole Lartigue†, Cécile Bébéar†.

† Co-last authors.

Article accepté le 24 Janvier 2017 dans *A.C.S. Synthetic Biology* (Impact factor 2017 : 6.076).

Ces travaux ont fait l'objet d'une communication affichée au 22ème congrès de l'International Organization for Mycoplasmology (IOM, Portsmouth NH, USA, 9-13 July 2018).

CONTEXTE

L'objectif de mon projet de thèse est de développer des outils génétiques pour *M. hominis via* les approches de biologie de synthèse. Dans ce premier chapitre nous nous sommes concentrés sur le clonage du génome de *M. hominis* dans la levure *S. cerevisiae*, l'étude de sa stabilité et sa modification grâce à la technologie CRISPR/Cas9.

M. hominis est une bactérie opportuniste responsable d'infections génitales, néonatales et extra-génitales chez des patients immunodéprimés. C'est une bactérie difficile à manipuler sur le plan génétique et non transformable à ce jour. Des travaux récents, reposant sur des approches de BS ont ouvert des perspectives nouvelles en termes d'édition de génomes chez les mollicutes. L'originalité de ces approches, mises au point sur d'autres génomes de mycoplasmes, repose sur l'utilisation de la levure *S. cerevisiae* comme un hôte intermédiaire pour modifier les génomes de mollicutes.

Dans ce contexte, le génome entier de *M. hominis* PG21 (665 kb) a été cloné dans la levure *S. cerevisiae* par la technique de « TAR-cloning ». Les clones B3-2 et B3-4 obtenus ont été mis en culture en milieu sélectif pendant 30 passages afin d'étudier la stabilité des génomes de *M. hominis* PG21 dans leurs cellules hôtes. L'intégrité des génomes a été déterminée par PCR multiplex et électrophorèse en champs pulsé (PFGE). Les résultats montrent que le génome de *M. hominis* est maintenu dans les levures jusqu'au 10^{ième} passage pour le clone B3-2 et jusqu'au 20^{ième} passage pour le clone B3-4. Il est ensuite progressivement dégradé au cours des passages puisque des fragments de génome de taille de plus en plus faibles sont détectés sur gel d'électrophorèse. Les analyses de génomique comparées réalisées sur des sous-clones possédant des génomes incomplets suggèrent que l'environnement génomique pourrait favoriser la perte de certaines régions du génome, notamment par le manque de séquences ARS (« yeast Autonomously Replicative Sequences ») et/ou la présence de longues séquences répétées dans le génome.

L'étape suivante a été la modification de ce génome par les outils génétiques disponibles chez la levure. Pour cela, nous avons choisi de supprimer un gène impliqué dans le pouvoir pathogène : le gène *vaa* codant une adhésine putative majeure du mycoplasme (Henrich *et al.*, 1993; Zhang and Wise, 1996; Kitzerow *et al.*, 1999). La délétion du gène a été faite par la technique CRISPR/Cas9 (DiCarlo *et al.*, 2013; Tsarmpopoulos *et al.*, 2016) chez les clones B3-2 et B3-4 au passage 2. Des analyses bio-informatiques ont permis l'étude du gène *vaa* et de son environnement génomique ainsi que la conception de guide ARN permettant de cibler spécifiquement le gène *vaa* par l'enzyme Cas9. La cassure double-brin générée par le complexe

gRNA/Cas9 a été réparée *via* des évènements de recombinaison homologue entre un substrat de réparation emmené lors de la transformation (oligonucléotides ou fragments PCR) et les séquences présentent de part et d'autre du site de coupure, entraînant ainsi la délétion complète du gène cible. Grâce à cet outil, 13 transformants B3-4 Δ*vaa* ont pu être obtenus et confirmés par PCR simplex et multiplex, par séquençage du locus et par PFGE. Par la suite, le séquençage de ces génomes complets sera effectué avant transplantation pour vérifier l'absence d'activité non spécifique de l'enzyme Cas9 (phénomène « off-target »).

ACS SyntheticBiology

Research Article

pubs.acs.org/synthbio

Cloning, Stability, and Modification of *Mycoplasma hominis* Genome in Yeast

Fabien Rideau,[†,‡] Chloé Le Roy,[†,‡] Elodie C. T. Descamps,[†,‡] Hélène Renaudin,[†,‡] Carole Lartigue,[*,§,∥,#] and Cécile Bébéar[*,†,‡,#]

[†]Univ. Bordeaux, USC-EA3671 Mycoplasmal and Chlamydial Infections in Humans, F-33000 Bordeaux, France

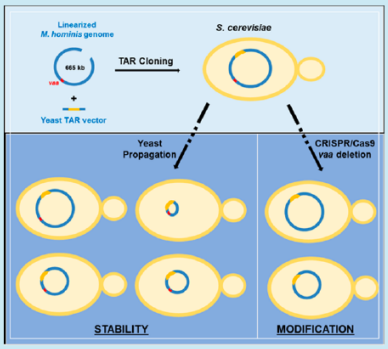
[‡]INRA, USC-EA3671 Mycoplasmal and Chlamydial Infections in Humans, F-33000 Bordeaux, France

[§]INRA, UMR 1332 de Biologie du Fruit et Pathologie, F-33140 Villenave d'Ornon, France

[∥]Univ. Bordeaux, UMR 1332 de Biologie du Fruit et Pathologie, F-33140 Villenave d'Ornon, France

Supporting Information

ABSTRACT: *Mycoplasma hominis* is a minimal human pathogen that is responsible for genital and neonatal infections. Despite many attempts, there is no efficient genetic tool to manipulate this bacterium, limiting most investigations of its pathogenicity and its uncommon energy metabolism that relies on arginine. The recent cloning and subsequent engineering of other mycoplasma genomes in yeast opens new possibilities for studies of the genomes of genetically intractable organisms. Here, we report the successful one-step cloning of the *M. hominis* PG21 genome in yeast using the transformation-associated recombination (TAR) cloning method. At low passages, the *M. hominis* genome cloned into yeast displayed a conserved size. However, after ∼60 generations in selective media, this stability was affected, and large degradation events were detected, raising questions regarding the stability of large heterologous DNA molecules cloned in yeast and the need to minimize host propagation. Taking these results into account, we selected early passage yeast clones and successfully modified the *M. hominis* PG21 genome using the CRISPR/Cas9 editing tool, available in *Saccharomyces cerevisiae*. Complete *M. hominis* PG21 genomes lacking the adhesion-related *vaa* gene were efficiently obtained.



KEYWORDS: *Mycoplasma hominis, transformation-associated recombination (TAR) cloning, yeast centromeric plasmid, genome stability, CRISPR/Cas9, Vaa*

Mycoplasma hominis is a human mycoplasma that resides in the lower urogenital tract as a commensal organism. This species has been involved in bacterial vaginosis, pelvic inflammatory disease as well as infections during pregnancy, preterm labor and neonatal infections.[1] *M. hominis* has also been linked to a variety of extragenital infections in immunocompromised patients. Analysis of the *M. hominis* PG21 genome sequence[2] revealed that it is the second smallest genome among self-replicating and free-living organisms. The size of the low G-C content (27%) *M. hominis* PG21 genome is 665 kb, with 537 coding sequences (CDSs). Almost half of these genes encode proteins that are conserved in other human urogenital mollicutes (247 CDSs), while the other half encode *M. hominis* species-specific genes. This latter group includes a large set of genes involved in cytoadherence and virulence (220 CDSs). Adherence is considered an important early step in bacterial pathogenicity because it permits attachment to host cells and colonization. In *M. hominis*, several adhesins have been described,[3] and one of the most abundant surface adhesion lipoprotein (Vaa or P50) has been shown to undergo high-frequency phase and size variations that were further correlated with the ability of *M. hominis* to adhere to cultured human cells.[4−6] Strikingly, *M. hominis*-specific genes also include genes that are dedicated to energy production. Indeed, in contrast to two other mollicutes species that share the same urogenital niche, *Mycoplasma genitalium* and *Ureaplasma parvum* that depend, respectively, on glucose and urea as carbon source, *M. hominis* produces energy exclusively through the hydrolysis of arginine.[2] At least nine genes have been clearly identified to be involved in this particular pathway.

To better understand *M. hominis* metabolism and to decipher its pathogenesis mechanisms that could lead to innovative treatment, functional genomics should be developed. Unfortunately, to date, all efforts to transfer small DNA molecules into *M. hominis* using standard methods, such as electroporation or polyethylene glycol (PEG)-mediated transformation, have remained unsuccessful or lacked reproducibility.[7] Thus, *M. hominis* is presently considered a genetically intractable organism.

Interestingly, the yeast *Saccharomyces cerevisiae* has long been used as a host for propagating partial and complete genomes from various organisms, from viruses to human DNA.[8−12] While long stretches of foreign DNA have usually been cloned

Received: December 15, 2016
Published: January 24, 2017

ACS Publications © 2017 American Chemical Society

DOI: 10.1021/acssynbio.6b00379
ACS Synth. Biol. 2017, 6, 891−901

into yeast by means of yeast artificial chromosomes (YAC), the recent cloning of complete bacterial genomes (natural or synthetic) has been accomplished by ligation with yeast centromeric plasmids, enabling their propagation as circles (*e.g.*, *M. genitalium*,[13−15] *Mycoplasma mycoides*,[15,16] *Mycoplasma pneumoniae*,[15] *Acholeplasma laidlawii*,[17] *Prochlorococcus marinus*[18] and *Haemophilus influenzae*[19]). To our knowledge, 13 circular bacterial genomes with sizes ranging from 0.6 to 1.8 Mb, along with GC contents varying from 24 to 40%, have been cloned into yeast. The cloning of the first full-length bacterial genome into yeast has been valued shortly after as the opening step toward the engineering of these genomes and the subsequent production of mutants by genome back-transplantation into a suitable recipient bacterial cell. This process was originally accomplished using *M. mycoides* (*Mmc*) species as a model: the *Mmc* whole 1-Mb genome was successfully cloned into yeast, engineered using already available yeast genetic tools and transplanted back into a phylogenetically closely related species (*Mycoplasma capricolum*) to produce targeted *Mmc* mutants.[20,21] Since then, not only this cycle was repeated for several in other mycoplasma species,[16] but yeast genetic tools used to edit the bacterial genome have also been largely improved.[22] Indeed, new genome editing methods such as TREC, TREC-IN and CRISPR/Cas9 emerged and proved to be truly effective for the manipulation of bacterial genomes cloned into yeast.[23−26] Such achievements led us to attempt similar approaches for the minimal pathogen *M. hominis*.

Here, we report the cloning of the natural genome of *M. hominis* PG21 as a yeast centromeric plasmid in *S. cerevisiae* by transformation-associated recombination (TAR) cloning.[27−29] After studying *M. hominis* genome stability by propagating yeast clones *in vitro* over 30 passages, we modified early yeast passage clones using CRISPR/Cas9 by targeting the putative adhesin *vaa* gene.

RESULTS

Cloning of *M. hominis* PG21 into Yeast. To be properly propagated by yeast, bacterial genomes must contain a yeast centromere (CEN6), a yeast origin of replication (ARSH4) and a selective marker (auxotrophic HIS marker). Because *M. hominis* PG21 cells are not amenable to transformation, the genome was cloned into yeast using TAR cloning. This procedure allows the insertion of the required yeast elements upon yeast spheroplasts cotransformation with the bacterial genome and a specific TAR vector.[29] The efficiency of this process that is based on yeast homologous recombination capacities has been shown to be greatly improved when the bacterial genome and the TAR vector are both linear and exhibit ∼60 bp identical sequences at their extremities.[15,17] The *M. hominis* PG21 circular genome has three unique recognition sites for three distinct restriction enzymes (*Asc*I, *Rsr*II and *Sgr*AI), but all three sites are potentially in essential genes (Table 1). We finally chose *Asc*I as the preferential site for the insertion of the TAR vector because the repair of the essential gene cut by this enzyme (Arg-tRNA) only required the addition of seven bases at the 5′-end of the TAR vector (Figure 1).

While the *M. hominis* PG21-specific TAR vector was produced in a single-step PCR reaction (Figure 1A), the preparation of *Asc*I-hydrolyzed *M. hominis* PG21 genomes required more time. Intact *M. hominis* PG21 genomes were isolated in agarose plugs as previously described,[20] and three series of agarose plugs (series A, B, C) containing various quantities of intact *M. hominis* PG21 genomes were generated

Table 1. Enzymes with a Single Recognition Site in the *M. hominis* PG21 Genome

enzyme	recognition sequence and cutting site	position in *M. hominis* genome	putative gene function
*Sgr*AI	CA′CCGGTG	179 343	Oligopeptide transport system permease protein[30]
*Rsr*II	CG′CACCG	355 649	Isoleucyl-tRNA synthetase
*Asc*I	GG′CGCGCC	507 280	Arg-tRNA

accordingly (Table 2). The plug quality was checked by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) to ensure the intactness of entrapped *M. hominis* PG21 genomes (data not shown). After validation, the agarose plugs were pretreated with *Asc*I to linearize *M. hominis* PG21 genomes, and linear gDNA was further released from gel by a β-agarase treatment. Finally, various quantities of *Asc*I-linearized *M. hominis* PG21 genomes were cotransformed into yeast spheroplasts together with a fixed quantity of *M. hominis* specific TAR vector (150 ng/μL) (Table 2).

A total of 33 colonies were obtained only under conditions B3 and C1 to C3. Curiously, no correlation could be made between the quantity of *M. hominis* PG21 genomes used during the experiment and the number of yeast transformants obtained on selective plates. Moreover, three control conditions were assessed: (i) only yeast spheroplasts, (ii) yeast spheroplasts with TAR vector, and (iii) yeast spheroplasts with 315 ng of linearized *M. hominis* gDNA. Unexpectedly, eight colonies appeared in the control condition consisting of only yeast spheroplasts and the specific TAR vector. We hypothesized that the presence of these colonies could be explained either by a circularization of the TAR vector or by its integration into the yeast genome. Additional PCR analyses and sequencing data showed that a circularization of the TAR vector occurred for the eight colonies (data not shown).

Analysis of Yeast Transformants by Multiplex PCR and PFGE. The presence of the whole *M. hominis* PG21 genome in the 33 yeast transformants (28 from condition B and 5 from condition C) was first assessed by multiplex PCR. The multiplex primer set was designed to amplify 10 fragments of various length (ranging from 123 to 999 bp) distributed throughout the genome of *M. hominis* PG21 from 10 independent regions (Figure 2B). Nine among the 33 yeast transformants exhibited the expected 10-band pattern indicating the presence of a complete *M. hominis* PG21 genome (Figure 2A).

Among the nine transformants, five (named B3−1, B3−2, B3−4, B3−8, and B3−10) were analyzed by PFGE to confirm the *M. hominis* PG21 genome integrity. These five clones displayed the expected profile with a unique band at 665 kb that was identical to the control *Asc*I-linearized *M. hominis* PG21 genome (Figure 2C).

Sequencing of the Arg-tRNA Region. To complete the analysis of the transformants, we verified the sequences at the 5′- and 3′-ends of the TAR vector after its recombination with the *M. hominis* PG21 genome. Indeed, given that the site of recombination in the 5′-end of the vector was located at the end of the essential Arg-tRNA gene, it was crucial to ensure that the nucleic acid sequence was correct. We verified three of the positive clones (B3−1, B3−2, and B3−4) and showed that the sequence of the Arg-tRNA gene was correct in clones B3−2 and B3−4 but altered by insertion of two nucleotides in clone

DOI: 10.1021/acssynbio.6b00379
ACS Synth. Biol. 2017, 6, 891−901

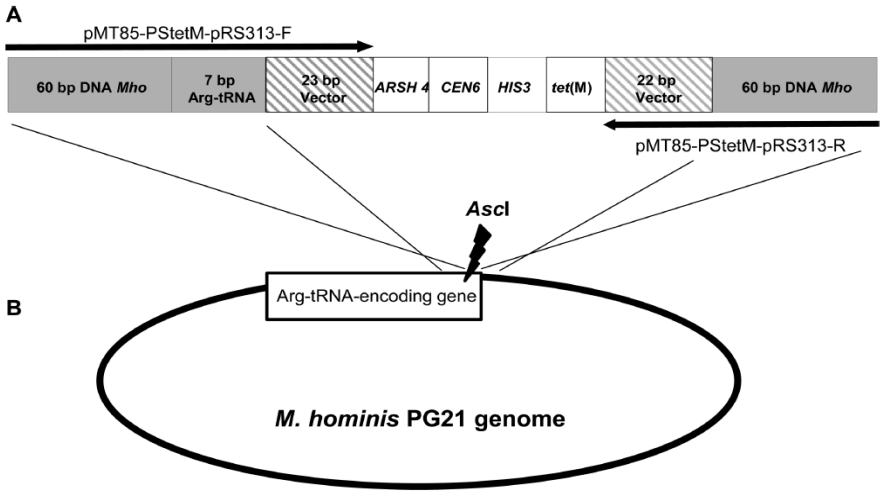


Figure 1. Integration of the TAR vector into the *Asc*I-linearized *M. hominis* PG21 genome using yeast *in vivo* homologous recombination capacities. (A) Map of PCR-amplified *M. hominis*-specific TAR vector. After amplification, the TAR vector contained (i) a yeast auxotrophic marker (*HIS3*), a yeast centromere (*CEN6*), a yeast autonomously replicating sequence (*ARSH4*) for selection and propagation in yeast as a yeast centromeric plasmid and (ii) a tetracycline resistance marker (*tet*(M)) for selection in mycoplasma. Arrows indicate the position of the primers on the TAR vector. (B) Map of the *M. hominis* PG21 genome. The lightning indicates the *Asc*I cleavage site.

Table 2. Number of Transformants Obtained after Cotransformation of *S. cerevisiae* Spheroplasts with Linearized *M. hominis* PG21 gDNA and *M. hominis*-Specific TAR Vector

plug series [gDNA]	volume of agarose plugs	quantity of *M. hominis* gDNA (ng)	number of transformants obtained
A	10 μL (A1)[b]	315	0
[31.5 ng/μL]	20 μL (A2)	630	0
	30 μL (A3)	945	0
	40 μL (A4)	1260	0
B	10 μL (B1)	80	0
[8 ng/μL]	20 μL (B2)	160	0
	30 μL (B3)	240	28
	40 μL (B4)	320	0
C	10 μL (C1)	10	2
[1 ng/μL]	20 μL (C2)	20	2
	40 μL (C3)	40	1
total	NA[a]	NA	33

[a]NA, not applicable. [b]Letters and numbers in parentheses indicate the different volume conditions for each series.

B3−1. The sequence of the 3′-junction was correct for the three clones. Thus, at the end of the cloning step, we obtained, two yeast transformants (B3−2 and B3−4) that carried a full-length *M. hominis* PG21 genome displaying a correct Arg-tRNA sequence.

Stability of the *M. hominis* PG21 Genome during Yeast Propagation. To examine *M. hominis* PG21 genome stability in yeast, clones B3−2 and B3−4 were continuously cultured in selective medium over 30 passages (*cf.* Methods). At passages 1, 10, 20, and 30 (P1, P10, P20, and P30), cloned genomes were analyzed by multiplex PCR and PFGE. Multiplex PCR results showed the presence of the expected 10-band profile for clone B3−2 for all passages studied (Figure 3A). The same results were obtained for clone B3−4, except that the 123 bp fragment was missing at P30. These data suggested that the *M. hominis* PG21 whole genome was potentially stably propagated by yeast. Unexpectedly, the results obtained by PFGE (performed in triplicates, Figure 3B) did not confirm the multiplex PCR results. Indeed, during propagation, clones B3−2 and B3−4 exhibited profiles consisting of full-length and/or partial genomes. Moreover, the two clones behaved differently. At P1, a unique 665-kb band was observed for both clones. However, multiple band patterns appeared at P10 for B3−2 and at P20 for B3−4. For clone B3−2, two major bands (665 and ~450 kb) were observed at P10, only one band at P20 (450 kb) and two bands (450 and <225 kb) at P30. For clone B3−4, a triple band pattern appeared at P20 (665, 295 and <225 kb) while only bands at 295 and <225 kb were observed at P30. At P5, the completeness of the *M. hominis* genome was jointly confirmed by the 10-band pattern found using multiplex PCR and the 665-kb band detected using PFGE (Supporting Information, Figure S1). Interestingly, those results indicated that the *M. hominis* PG21 genome was not stably maintained during yeast growth and that the evolution of the cloned genome was transformant-dependent.

Subcloning and Analyses of Partial Genomes. To determine whether we could still recover full-length genomes after multiple passages and also to obtain a better understanding of the heterogeneity of the population, we spread parental clones B3−2/P10, B3−2/P20 and B3−4/P20 on selective plates. For each clone, 10 colonies (subclones) were selected and analyzed by PFGE (Figure 4A). While a small fraction of subclones (five of 30 subclones) still maintained whole-sized genomes, the majority harbored truncated genomes (450 kb for subclones B3−2 and 295 or <225 kb for subclones B3−4) with sizes equivalent to those observed in the parental clones (Figure 3B). To evaluate which parts of the cloned *M. hominis* PG21 genome were deleted, we performed multiplex PCR for six representative subclones (B3−2/P10 subclones N.2 and N.6, B3−2/P20 subclones N.1 and N.6, and B3−4/P20 subclones N.3 and N.4) that displayed a unique band on PFGE. We observed incomplete profiles for the six selected subclones (Figure 4B). Deletions of the fragments responsible for the emergence of the partial *M. hominis* PG21 genome during yeast culture propagation are shown in Figure

DOI: 10.1021/acssynbio.6b00379
ACS Synth. Biol. 2017, 6, 891−901

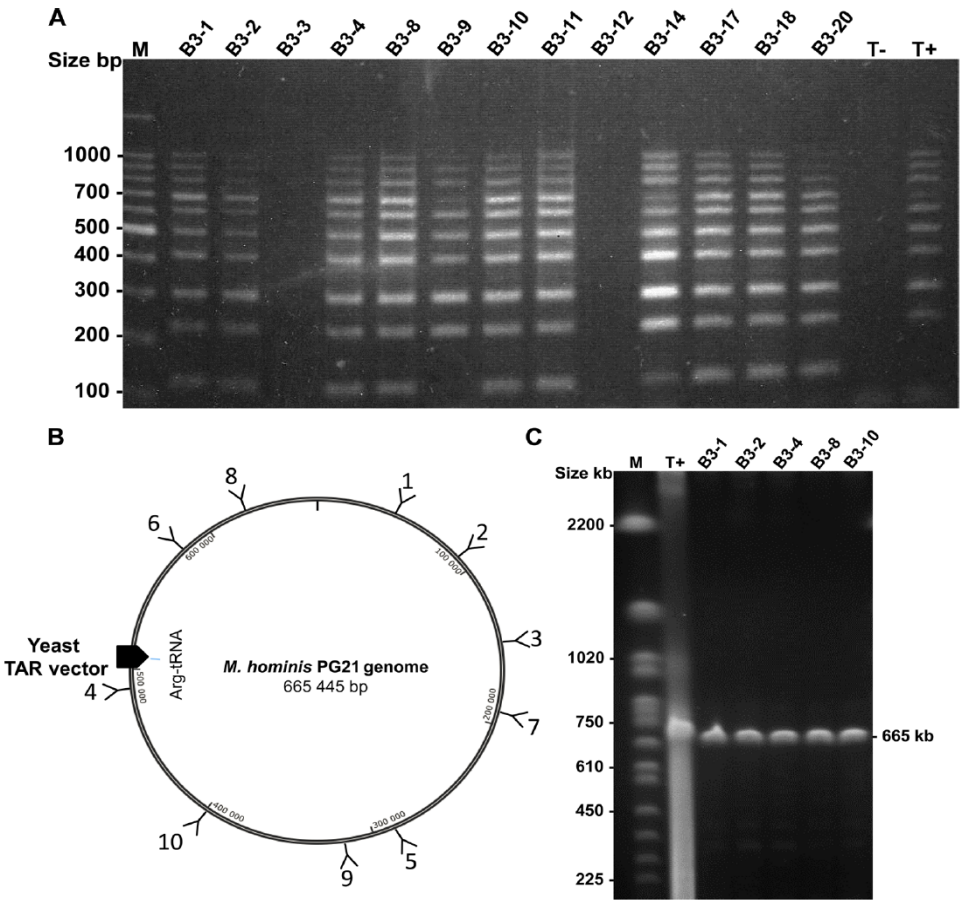


Figure 2. Screening of yeast transformants. *M. hominis* PG21 genome integrity was assessed by multiplex PCR (A,B) and PFGE (C). The annealing sites for the set of 10 pairs of PCR primers (2B) are spaced throughout the chromosome. The sizes of the PCR products from each primer pair differ in increments of 100 bp, such that the intact *M. hominis* PG21 genome produces a ladder of 10 bands. The multiplex pattern is illustrated herein with 13 yeast clones. Five yeast clones with a complete multiplex PCR pattern were further analyzed by PFGE and produced bands matching the expected size of the *Asc*I-linearized *M. hominis* PG21 genome. In panel A: M, DNA size ladders of 100−1000 bp (Promega). In panel C: 225−2200-kb *S. cerevisiae* chromosomal DNA ladder (Bio-Rad); T−, negative control without DNA; T+, DNA template from *M. hominis* PG21 cells.

4C. Interestingly, some regions of the *M. hominis* genome appeared to be systematically deleted, while others were conserved. Fragment 4, located in the vicinity of the TAR vector, was maintained in all of the studied clones, as observed for fragment 2. Fragments 6 and 10 were also well maintained because they were retained in five of six studied clones. In contrast, two large regions of the genome, the first one encompassing fragments 5, 7, 9 and the other one including fragments 8 and 1, were lost quite frequently. It is noteworthy that during the process of genome degradation, the first region to be affected seemed to be the region including fragments 5, 7, and 9. Additional analyzes were performed with tandem repeat finder online (http://tandem.bu.edu/trf/trf.html) and the reputer online tool (https://bibiserv2.cebitec.uni-bielefeld.de/reputer) to assess the presence of large repetitive sequences (more than 100 bp regions) in the *M. hominis* genome. A total of 34 repetitive sequences larger than 100 bp were found in this genome. Among them, 24 are tandem repeat sequences and 10 are repetitive sequences located on distant regions of the genome (Tables 3 and 4). Interestingly, multiplex PCR fragments 6 and 8 are found in some regions which contain repetitive sequences (from position 489 000 to 650 000), and fragments 5, 7, and 9 are located in regions rich in large tandem repeat sequences. This genomic context may favor genome instability.

The *M. hominis* PG21 genome is not essential for yeast survival, except for the HIS3 selective marker. Host cells are thus likely to eliminate part of *M. hominis* PG21, possibly through homologous recombination events between these repeated sequences in the *M. hominis* genome.

***M. hominis* PG21 Genome Modification Using CRISPR/Cas9 Technology.** To modify the *M. hominis* PG21 genome in yeast, we used the recently discovered CRISPR/Cas9 system. We targeted the *vaa* gene, which encodes the putative major adhesin of *M. hominis*.[6] To achieve this goal, two different *vaa* guide RNAs (gRNA1 and gRNA2) were designed and cloned into a yeast replicative vector (*cf.* Methods) to produce plasmids pgRNA1-*Aar*I and pgRNA2-*Aar*I, respectively. A specific recombination template was defined to allow the complete deletion of *vaa* by homologous recombination (*cf.* Methods, Table 5). The cotransformation of selected yeast clones B3−2 and B3−4 with (i) plasmids pgRNA1-*Aar*I or pgRNA2-*Aar*I, (ii) the recombination template and (iii) the plasmid carrying the Cas9 programmable nuclease-encoding gene yielded more than 500 transformants on triple-selective medium (*cf.* Methods). Twenty pools of 20 colonies (five pools

DOI: 10.1021/acssynbio.6b00379
ACS Synth. Biol. 2017, 6, 891−901

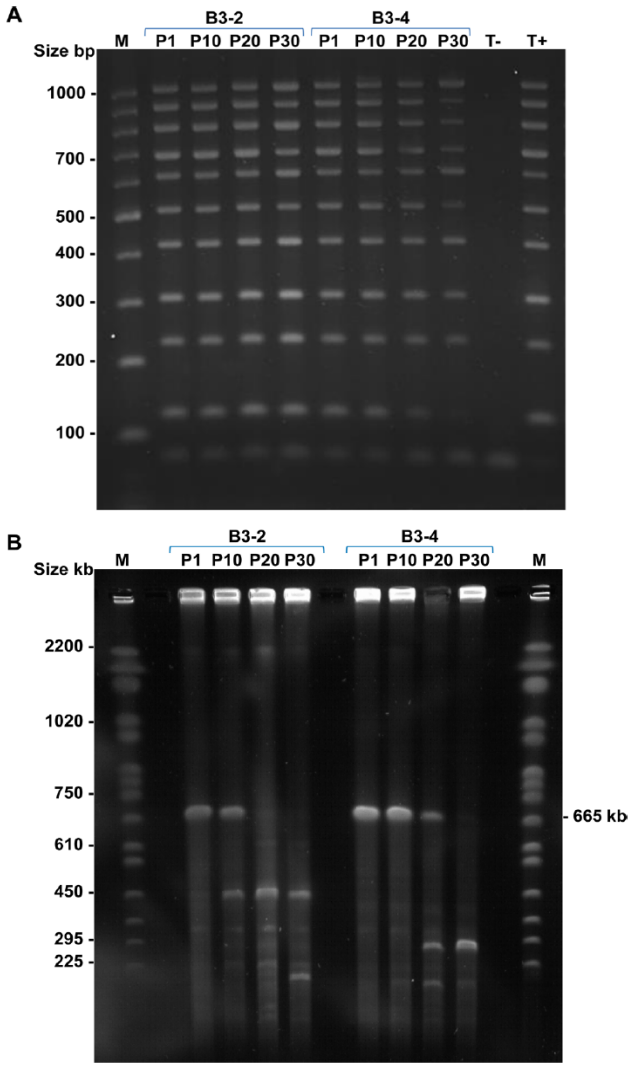


Figure 3. *M. hominis* PG21 genome stability in yeast for clones B3−2 and B3−4. The completeness of the *M. hominis* PG21 genomes was checked by multiplex PCR (A) and PFGE (B) during yeast propagation (30 passages). A 10-band profile by multiplex PCR, completed by a 665-kb band on PFGE, indicated a full-length PG21 genome at P1 for both clones and at P10 for B3−4. Incomplete PG21 genomes with sizes smaller than 665 kb were visible from P10 for B3−2 and from P20 for B3−4. P, passage. In panel A: M, DNA size ladders of 100−1000 bp (Promega); T−, negative control without DNA; T+, DNA template from *M. hominis* PG21 cells. In panel B: M, 225−2200-kb *S. cerevisiae* chromosomal DNA ladder (Bio-Rad).

per condition) were screened for *vaa* deletion by PCR using primers located in the sequences flanking the *vaa* gene (Figure 5A). Pools (PL) from the cotransformation of B3−2 (PL1 to PL5) and B3−4 (PL11 to PL15) with the pgRNA1-*Aar*I failed. The presence of a single 1984-bp band, indeed, indicated that the target gene (*vaa*) was still intact (data not shown). Concerning the cotransformation of B3−2 and B3−4 with plasmid pgRNA2-*Aar*I, several profiles were observed (Figure 5B). While pools PL6 to PL10 from the cotransformation of B3−2 showed one unexpected 1200-bp band, pools PL16 to PL20 from the cotransformation of B3−4 displayed a three-band pattern (1984 bp corresponding to the WT sequence, 567 bp corresponding to the *vaa*-deleted mutant, and the unexpected band at approximately 1200 bp), (Figure 5B). Four pools of 20 colonies (PL16, PL17, PL18, and PL20) were selected, and individual clones were further analyzed by PCR (Figures 5C and S2). For this assessment, all individual clones exhibited a single band on agarose gel. For 22 of 80 clones, a 567-bp band was observed, indicating that the deletion had occurred. The PCR products were sequenced, and seamless deletion of the target *vaa* gene was confirmed for all 22 clones. The 1200-bp PCR product from clones 16−4 and 18−19 (Figures 5B and S2) was also sequenced and shown to fit with a truncated version of *vaa*. These results suggested that the yeast double-strand break repair machinery that were activated after Cas9 cleavage may either use the cotransformed PCR recombination template for repair (intermolecular repair) or *vaa* internal repeat sequences located close to the Cas9 cleavage site (intramolecular repair) (Figure 5D and Figure S3). REPFIND online tool (https://zlab.bu.edu/repfind/form.html) confirmed the presence of repeats within the *vaa* gene. After sequencing this region, we concluded that recombination events did occur between a sequence of 34 nucleotides found right after the Protospacer Adjacent Motif (PAM) sequence of the gRNA2 and an almost identical sequence (91% of identity) found in the middle of the gene (Figure S3). Because of the "off-target" effect of Cas9 nuclease, it was also necessary to verify the completeness of the genome after *vaa* deletion. Multiplex PCR was first performed for the 22 *vaa*-deleted mutants and the *vaa*-truncated mutant N.16−4 (Figure 5E). Thirteen of the 23 mutants displayed the expected 10-band profile (including the truncated *vaa* mutant) and were then screened on PFGE together with the mutant N.18−7, which exhibited an incomplete profile by multiplex PCR. The presence of a unique 665-kb band confirmed the integrity of the *M. hominis* PG21 genome in the 13 *vaa* mutants (Figure 5F). For mutant N.18−7, we observed, as expected, a partial genome at approximately 500 kb. In total, we obtained 12 yeast transformants carrying a whole *M. hominis* PG21 genome lacking the *vaa* gene.

■ DISCUSSION

We cloned the genome of human pathogen *M. hominis* PG21 in *S. cerevisiae* as a yeast centromeric plasmid. Because this bacterium uses a nonstandard genetic code in which codon UGA encodes tryptophan instead of the usual opal stop codon, most of its genes, when transcribed in yeast, encode nonlethal truncated proteins. This property may explain the absence of an apparent toxic effect of this supplementary genomic material on yeast cells immediately after transformation and during the numerous passages in selective medium, except that the yeast growth rates were slightly delayed. The other explanation would be that *M. hominis* PG21 genes are not transcribed in yeast because prokaryote and eukaryote signals for decoding genetic information are different.

Genotypic analyses were necessary to demonstrate that after several passages in selective medium, the *M. hominis* PG21 genome was not properly maintained in yeast, in contrast to the results obtained for other bacterial genomes cloned in yeast.[18] This discrepancy may result from the consistent evaluation of genome stability at early stage after yeast transformation and not after many serial passages as in the present analysis. Indeed, in our experiments, yeast clones carrying the *M. hominis* PG21 genome (doubling time of ∼3 h) were propagated over 30 passages corresponding to ∼180 to 200 generations. Under

DOI: 10.1021/acssynbio.6b00379
ACS Synth. Biol. 2017, 6, 891−901

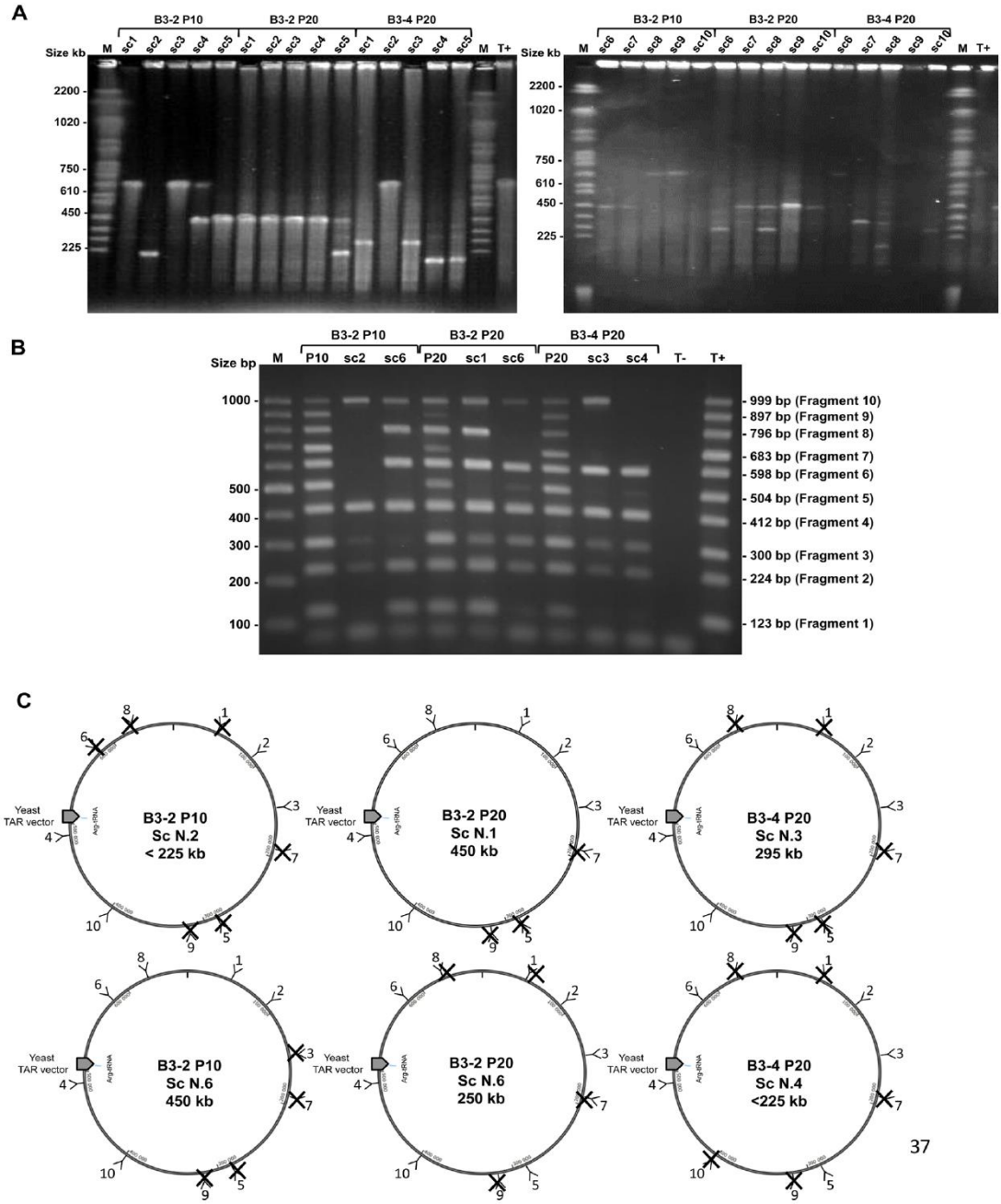


Figure 4. Analyses of partial *M. hominis* PG21 genomes B3−2/P10, B3−2/P20, and B3−4/P20, in yeast. Subclones at P10 and P20 for clone B3−2 and P20 for clone B3−4 were screened by PFGE (A) and multiplex PCR (B). Ten subclones for each passages were analyzed by PFGE, and several profiles with a unique band between 200 and 665 kb were observed (A). Six subclones (B3−2 P10 subclones N.2 and N.6, B3−2 P20 subclones N.1 and N. 6, and B3−4 P20 subclones N.3 and N.4) with only one band on PFGE (<225 kb, 295 kb and 450 kb) were selected and tested by multiplex PCR. The expected sizes for the multiplex PCR fragments are indicated at the right of the agarose gel (B). Missing bands were schematically represented by a cross on the *M. hominis* PG21 genome map for the six subclones (C). P, passage; sc, subclone; T−, negative control without DNA; T+, DNA template from *M. hominis* PG21 cells. In panel A: M, 225−2200-kb *S. cerevisiae* chromosomal DNA ladder (Bio-Rad). In panel B: M, DNA size ladders of 100−1000 bp (Promega).

these conditions, mycoplasma genomes appeared to be stably maintained up to P10 (~60 generations), after which partial genomes with variable sizes arose. More precisely, a mixed population, consisting of yeast cells carrying full-length mycoplasma genomes and others harboring partial genomes, emerged between P5 and P10 for clone B3−2 and between P10 and P20 for clone B3−4. Strikingly, the heterogeneity of the population continued to evolve up to P30, as evidenced by the increasing number of deletion events in all studied clones (Figure 3B). Cells maintaining full-length genomes completely disappeared and were replaced by cells carrying increasingly reduced genomes. Multiplex PCR performed on yeast

DOI: 10.1021/acssynbio.6b00379
ACS Synth. Biol. 2017, 6, 891−901

Table 3. Summary of the 24 Tandem Repeats Assessed with Tandem Repeat Finder Online of More than 100 Bases

position	number of repeats	consensus sequence size (nt)	percent matches between repeats
197 952–199 011	2.3	471	98
270 594–272 329	12.6	135	80
272 594–273 439	2.1	239	86
273 621–274 106	2	240	95
274 417–275 260	6.3	133	87

Table 4. Summary of the 10 Repetitive Sequences Assessed with the Reputer Online Tool[a] Located on Distant Regions

number of bases in the repeat	position of the first repeat beginning	position of the second repeat beginning
101	384 869	649 553
103	386 798	648 382
113	385 126	650 501
125	330 124	492 142
126	384 853	650 158
160	385 240	650 340
312	329 813	491 832
1267	328 545	490 564
1427	327 117	489 136
1537	330 257	492 277

[a]https://bibiserv2.cebitec.uni-bielefeld.de/reputer.

subclones carrying truncated *M. hominis* genomes revealed that large fragments were eliminated (Figure 4B). These results suggested that yeast cells propagating the most reduced forms of *M. hominis* PG21 genomes were favored and selected during the passages. To be stably propagated in yeast, it is essential that whole genomes have the appropriate number of yeast origin of replication (ARS sequence). Motifs searches showed that the 11-bp yeast ARS consensus sequence was present 155 times (157 if we include the TAR-vector) in this genome while the extended 17-bp yeast ARS consensus sequence (A/T)(A/T)(A/T)(A/T)TTTA(T/C)(A/G)TTT(A/T)GTT described in Tagwerker *et al.*[18] was present one time on the whole genome (Figure S4). Then, the lack of ARS probably does not explain the instability of the *M. hominis* PG21 genome during passages. In contrast the large repeated regions present in its genome (Tables 3 and 4) can certainly favor genomic instability. A large number of bacterial genomes are currently cloned in yeast, notably genomes of intractable bacteria.[31] Our study shows, for the first time, that although yeast remains a performant "workshop" for genome editing, it is essential to work with yeast transformants at low passages and to verify the integrity of the cloned genome regularly during the course of the experimental process to obtain the desired final product.

Here, we confirmed that the genome of bacteria, such *M. hominis* PG21, can be cloned and maintained in yeast using TAR cloning methods. The cloned genome can be then readily manipulated in yeast using available genetic tools (TREC, TREC-IN, and CRISPR-Cas9) to create any combination of modifications in this bacterial genome. In the present study, we modified the *M. hominis* PG21 genome using the CRISPR/Cas9 system and properly deleted the *vaa* adhesin gene. *M. hominis* PG21 *vaa*-deleted genomes will be sequenced to attempt genome transplantation experiments. Either *M. arthritidis*, a species that is phylogenetically close to *M. hominis* and easy to transform,[32] will be used as the recipient cells, or *M. hominis* will be used if we succeed in developing a transformation method for this microorganism. To date, the lack of genetic tools for *M. hominis* PG21 has greatly hampered our understanding of its biology. This work identifies new routes for the development of *M. hominis* PG21 functional genomics.

METHODS

Yeast and *M. hominis* Culture Conditions. The *M. hominis* PG21 type strain was grown at 37 °C in Hayflick modified medium supplemented with arginine.[33] *S. cerevisiae* strain W303a was grown at 30 °C in YDPA medium (Clontech).[34] After transformation with the *M. hominis* PG21 genome, yeast strains harboring the mycoplasma genome were grown in minimal SD Base medium with the supplement—HIS DO (SD-HIS medium, Clontech).

Isolation of *M. hominis* PG21 gDNA. Intact gDNA from the *M. hominis* PG21 strain was isolated in 1% low-melting-agarose gel plugs using CHEF Mammalian Genomic DNA Plug Kit (Bio-Rad) with some procedural modifications.[21] Prior yeast transformation trapped *M. hominis* PG21 genomes were *Asc*I-hydrolyzed (50 U/plug) and gel-released with β-agarase I (3 U/plug) according to the manufacturer's protocols (New England Biolabs), and the DNA concentrations were determined using the Epoch Spectrophotometer System.

Construction of the TAR Vector. The TAR vector was amplified as a 4.6-kb PCR product using the homemade vector pMT85-PStetM-pRS313 as a template (GenBank accession number KX011460)[35] and the primer pairs pMT85-PStetM-pRS313-F and pMT85-PStetM-pRS313-R (Figure 1A and Table 5). The primer pairs consisted of 20 bases that were identical to the pMT85-PStetM-pRS313 vector (underlined sequences) followed by 60 base-floating tails that were complementary to the upstream (pMT85-PStetM-pRS313-F) and downstream (pMT85-PStetM-pRS313-R) sequences of the *Asc*I site in the *M. hominis* PG21 genome. Primer pMT85-PStetM-pRS313-F contained an additional seven-base sequence (bold) that was necessary to recover the integrity of the Arg-tRNA sequence after "TAR vector—*M. hominis* PG21" assembly. The PCR reaction was performed using the Advantage-HF2 PCR kit following the manufacturer's instructions (Clontech). After amplification, the linear TAR vector contained yeast elements, selective markers and, at each extremity, a ~60-bp *M. hominis* PG21 sequence that served as a hook for the homologous recombination reaction with the *M. hominis* PG21 genome (Figure 1A).

Yeast Transformation with *M. hominis* PG21 gDNA. The *S. cerevisiae* W303a spheroplasts was prepared as previously described.[34] Various TAR vector to *Asc*I-linearized *M. hominis* PG21 gDNA ratios were added to 100 μL of fresh yeast spheroplasts (Table 2). After transformation, the yeast cells were streaked on SD-HIS selective plates. After 2 days at 30 °C, the colonies were restreaked on the same medium and incubated at 30 °C for two more days. Subclones were selected for genotypic analyses and glycerol stocks.

Screening of Yeast Transformants. Yeast transformants were screened by multiplex PCR and by PFGE.[21,34] For multiplex PCR, 10 pairs of primers, distributed over the *M. hominis* PG21 genome, were used to detect undesired genome rearrangements (Table 5 and Figure 2B). The reaction

DOI: 10.1021/acssynbio.6b00379
ACS Synth. Biol. 2017, 6, 891–901

Table 5. Primers Used in the Study

primer name	sequence (5′→ 3′)	location in the *M. hominis* PG21 genome	product size (bp)
Primers for construction of the TAR vector			
pMT85-PStetM-pRS313-F	CTCAATTGGACAGAGTGTTTGGTTACGGCCCAAAAGGTTGCGGGTTCGACTCCTGCCGGG**CGCGCCA**CAGGGTTATTGTCTCATGAGCGG	–	4.6 kb
pMT85-PStetM-pRS313-R	ATTAATAGTTTAAAAAAACTAGGGTTTAACCTAGTTTTTAATTCAGTTTAACTGATATGGGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGC		
Primers for analyses of the TAR vector insertion site			
Vvl-F3	TATATTGAGCGAACGTGAAC	5′-junction	933
Vvl-R1	GTAGAAGACCACACACGAA3		
Vvl-F2	CCGTAGAAAAGATCAAAGGA	3′-junction	563
Vvl-R2	GCCATTGCGTTTCTTATA		
Primers for multiplex PCR of the Mho PG21 genome			
MHO F1	CCGCCTTAACTGAATGTGGT	43983	123
MHO R1	TCTTTCCGGCTTCTTCTTCA	44105	
MHO F2	TAGTGCCCCAAATGAAGCTC	85847	224
MHO R2	ATCCTCTCTTACCCGCCATT	86070	
MHO F3	TGTATGCGGGAGTTCCTTGT	146189	300
MHO R3	CCCGTAAAGATGCCAATGTT	146488	
MHO F4	TTCCGAGCTTGAGCCATAGT	484414	412
MHO R4	GTTTGGGGAATTGGACATTG	484825	
MHO F5	CCAAACATTCCCACATCCTC	279506	504
MHO R5	GGACTTGAACCCACGAATGT	280009	
MHO F6	CCGAACAAGCAAGAATAGGC	572416	598
MHO R6	CCAGACCAGGCATTTGATTT	573013	
MHO F7	ACGTGATGGTTTCTGCCTTC	187858	683
MHO R7	CCATTTTTCCTCCAACTCCA	188540	
MHO F8	CAGCTCAATACGTTGCAGA	625903	796
MHO R8	TGCCTCAACTGCTTGTATGC	626698	
MHO F9	GGGGCATCTTTTTCTTGTCA	321252	897
MHO R9	TTGCCCTGTATGTGGTTTCA	322148	
MHO F10	CAACACCGCTTTCAATAGCA	398989	999
MHO R10	ATCATATTGGGGGTGTTCCA	399987	
PCR primers for investigating the putative adhesin *vaa* gene			
Vaa-FE	AATGGGATAGTTAGTAAAGTCGG	409954	1984, 1268, or 567
Vaa-RE	AACCCTACCATTGTCGCTAAGA	411915	
Primers required for *vaa* deletion using the CRISPR-Cas9 system			
Vaa_AarI_F1	atgatcAGAATTAACAAAATTAAGCAgt	gRNA1	
Vaa_AarI_R1	taaaacTGCTTAATTTTGTTAATTCTga		
Vaa_AarI_F2	atgatcGTTACAGTTACATCAGCACGgt	gRNA2	
Vaa_AarI_R2	taaaacCGTGCTGATGTAACTGTAACga		
Vaa-strand+	TCTTTTTTATATTTACTAAATTTAAAAAAGGATAAAAAATTAGAATATAAATTAAAAATACAAAAAATAGTGCTACTAATGGGCACTA	Recombination template	
Vaa-strand−	AATAGTGCCCATTAGTAGCACTATTTTTTGTATTTTTAATTTATATTCTAATTTTTTATCCTTTTTTAAATTTAGTAAATATAAAAAAGA		

DOI: 10.1021/acssynbio.6b00379
ACS Synth. Biol. 2017, 6, 891−901

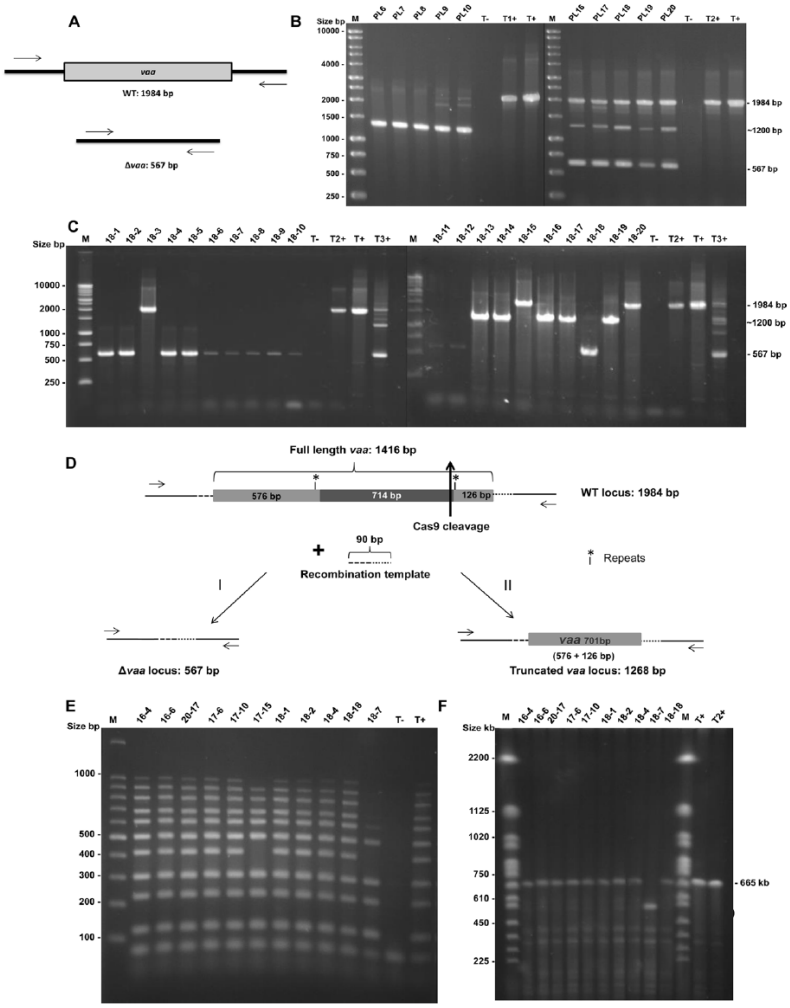


Figure 5. Screening of yeast transformants containing the *vaa*-deleted *M. hominis* PG21 genome. Schematic of the *vaa* region in the *M. hominis* PG21 (WT) and *vaa*-deleted locus (Δ*vaa*). Specific primers (arrows) designed on each side of the *vaa* gene were used to screen the yeast transformants by PCR amplification. Yeast clones carrying the *M. hominis* genome with an intact *vaa* locus yielded a 1984-bp amplicon, whereas yeast clones carrying a *vaa*-deleted *M. hominis* genome produced a 567-bp fragment (A). Yeast clones B3−2 and B3−4 were both transformed using the CRISPR/Cas9 system. A total of 10 pools (PL) of 20 colonies derived from the transformation of B3−2 (PL6 to PL10) and from B3−4 (PL16 to PL20) were first screened by PCR (B). The PL18 pool was selected, and colonies N.18−1 to 18−20 were then individually analyzed by PCR. Three single-band profiles (1984 bp, 967 bp or 1268 bp) appeared on the agarose gel instead of two (1984 bp or 967 bp) (C). Schematic showing the proposed formation of the unexpected 1268-bp band. Upon Cas9 site-specific-mediated cleavage, two events, both based on homologous recombination, appeared to occur: (I) using the 90-bp recombination template provided during the experiment and resulting, as expected, in the seamless deletion of the *vaa* gene, or (II) using internal repeat sequences present in the *vaa* gene and leading to a truncated *vaa* region. Repeat sequences found in the *vaa* gene (gradation of three gray boxes) are indicated by two stars. The thick vertical arrow shows the Cas9 cleavage site, and the two horizontal arrows correspond to the specific primers used for PCR amplification (D). Screening of the *M. hominis* PG21 genome integrity in selected yeast transformants by multiplex PCR (E) and PFGE (F). T−, negative control without DNA; T+, DNA template from *M. hominis* PG21 cells; T1+, DNA template from clone B3−2; T2+, DNA template from clone B3−4. In panel B: M, DNA size ladders of 250−10000 bp (Promega); PL, Pool. In panel C: M, DNA size ladders of 250−10000 bp (Promega); T3+, DNA template from pool PL18. In panel E: M, DNA size ladders of 100−1000 bp (Promega). In panel F: M, 225−2200-kb *S. cerevisiae* chromosomal DNA ladder (Bio-Rad).

mixture in a final volume of 50 μL consisted of 1X PCR buffer (Qiagen), 3 mM $MgCl_2$, 0.2 mM dNTPs, primers at 0.05 μM (for MHO F1R1, F7R7, F10R10) and 0.02 μM (for all others), 0.3 μL HotStar Taq DNA polymerase (Qiagen) and 1 μL of yeast total DNA template. PCR amplifications were performed as follows: 95 °C for 15 min, 35 cycles of 30 s at 94 °C, 90 s at 58 °C and 90 s at 72 °C, and then 10 min at 72 °C. The integrity of the *M. hominis* PG21 genomes in the yeast transformants was then determined by PFGE using contour-clamped electrical field (CHEF DR III; Bio-Rad).[21] Yeast agarose plugs were submitted to a first PFGE to allow the selective removal of linear yeast chromosomes from the agarose plugs. They were then treated with *Asc*I and loaded on a second PFGE. Pulse times were ramped from 50 to 90 s for 22 h at 6 V cm^{-1} for both electrophoresis procedures. The gels were stained with SYBR Gold or GelRed (Biotium).

Sequence Analysis at the Insertion Site. To ensure that the TAR vector and the *M. hominis* PG21 genome recombined properly in yeast, the sites of recombination were PCR-amplified and sequenced. The 5′-junction containing the Arg-

DOI: 10.1021/acssynbio.6b00379
ACS Synth. Biol. 2017, 6, 891−901

tRNA gene was PCR-amplified using primers Vvl-F3 and Vvl-R1. The 3′-junction was PCR-amplified using primers Vvl-F2 and Vvl-R2 (Table 5). The PCR reaction mixture in a final volume of 50 μL consisted of 1X PCR buffer (Qiagen), 3 mM $MgCl_2$, 0.2 mM dNTPs, 0.2 μM of each primers, 0.3 μL de HotStar Taq (Qiagen), and 1 μL of yeast total DNA template. Amplification was performed as follows: 95 °C for 15 min, 35 cycles of 30 s at 94 °C, 30 s at 52 °C and 45 s at 72 °C, and then 10 min at 72 °C. The PCR products were sequenced by Beckman Coulter Genomics.

Yeast Clone Stability. To evaluate *M. hominis* PG21 genome stability in yeast, we prepared liquid cultures from B3−2 and B3−4 glycerol stocks. At OD_{600nm} = 2, the cultures were diluted 100-fold in SD-HIS medium (= P1) and sequentially subcultured for 30 passages (∼30 days). In this study, one passage corresponded to the transfer of 100 μL of yeast subculture at OD_{600nm} = 2 to 5 mL of SD-HIS medium (1/50 dilution) followed by an incubation period of ∼18 h at 30 °C. At passages 1, 5, 10, 20 and 30, multiplex PCR and PFGE were performed as previously described to determine the sizes of the *M. hominis* PG21 genomes cloned in yeast. Each culture from the different passages were streaked on selective plates and incubated overnight at 30 °C. Ten colonies (subclones) were selected and cultured in liquid SD-His medium over ∼18 h at 30 °C and 180 rpm. These subclones were analyzed by multiplex PCR and PFGE to verify the integrity of the *M. hominis* PG21 genome cloned in yeast.

Genome Modification Using CRISPR/Cas9 Technology. Modification of the *M. hominis* PG21 genome in yeast was performed using CRISPR/Cas9 based on the protocol developed by Tsarmpopoulos *et al.*[26] and Di Carlo *et al.*[36] To target the *vaa* gene of *M. hominis* PG21, two plasmids were constructed (pgRNA1-*Aar*I and pgRNA2-*Aar*1) and used to produce the guide RNA1 (gRNA1), targeting the middle of the gene, and the guide RNA2 (gRNA2), targeting the end of the gene, respectively. Annealing of oligonucleotide Vaa_AarI_F1 with Vaa_AarI_R1 yielded gRNA1, and annealing of Vaa_AarI_F2 with Vaa_AarI_R2 yielded gRNA2 (Table 5). Each gRNA was then cloned at the *Aar*I site of the pgRNA-*Aar*I plasmid. The two gRNAs were verified using an online tool (http://crispr.dfci.harvard.edu/SSC/), and their respective scores were 0.4562 and 0.7448. Similarly, the *vaa* double-stranded recombination template was prepared by annealing Vaa-strand+ and Vaa-strand− (Table 5). This template was designed by appending the direct 45 bases flanking each side of the *vaa* gene (total 90 bases) and was synthesized by Eurogentec as for all oligonucleotides used in this study (Table 5). Yeast clones B3−2 and B3−4 were cotransformed with the p414-Tef1p-Cas9-CYC1t plasmid (Addgene bank reference: #43802), the pgRNA-*Aar*I specific for the *vaa* gene and the recombination template, following a standard protocol.[26] Total gDNA from the transformed yeast was extracted as described by Kouprina and Larionov.[34] PCR screening of *vaa*-deleted clones was performed using primers Vaa-FE and Vaa-RE (Table 5). The reaction mixture in a final volume of 50 μL consisted of 1X PCR buffer (Promega), 3 mM $MgCl_2$, 0.2 mM dNTPs, 0.1 μM of each primer, 0.25 μL GoTaq Hot Start G2 DNA polymerase (Promega), and 5 μL of yeast total DNA template. PCR amplifications were performed as follows: 95 °C for 15 min, 35 cycles of 1 min at 95 °C, 1 min at 60 °C and 2 min at 72 °C, and then 10 min at 72 °C. PCR products were sequenced by Eurofins genomics. The integrity of the mycoplasma genomes was evaluated by multiplex PCR and PFGE as described above.

■ ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge on the ACS Publications website at DOI: 10.1021/acssynbio.6b00379.

Figures S1−S4 (PDF)

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Authors

*E-mail: carole.lartigue-prat@inra.fr. Phone: + 33 5 57 12 23 59. Fax: + 33 5 57 12 23 69.

*E-mail: cecile.bebear@u-bordeaux.fr. Phone: +33 5 57 57 16 25. Fax: +33 5 56 93 29 40.

ORCID

Chloé Le Roy: 0000-0003-3235-9264

Author Contributions

#C.L. and C.B. are co-last authors.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ACKNOWLEDGMENTS

We thank Fabien Labroussaa, Alain Blanchard and Pascal Sirand-Pugnet for reading the manuscript. We also thank Iason Tsarmpopoulos for providing plasmids (pgRNA-*Aar*I plasmid and p414-TEF 1p-Cas9-CYC1t) and technical advice regarding the CRISPR/Cas9 system and Gabrielle Guesdon for technical assistance.

■ REFERENCES

(1) Waites, K. B., Schelonka, R. L., Xiao, L., Grigsby, P. L., and Novy, M. J. (2009) Congenital and opportunistic infections: Ureaplasma species and *Mycoplasma hominis*. *Seminars in fetal & neonatal medicine 14*, 190−199.

(2) Pereyre, S., Sirand-Pugnet, P., Beven, L., Charron, A., Renaudin, H., Barre, A., Avenaud, P., Jacob, D., Couloux, A., Barbe, V., de Daruvar, A., Blanchard, A., and Bébéar, C. (2009) Life on arginine for *Mycoplasma hominis*: clues from its minimal genome and comparison with other human urogenital mycoplasmas. *PLoS Genet. 5*, 5.

(3) Henrich, B., Feldmann, R. C., and Hadding, U. (1993) Cytoadhesins of *Mycoplasma hominis*. *Infect. Immun. 61*, 2945−2951.

(4) Kitzerow, A., Hadding, U., and Henrich, B. (1999) Cyto-adherence studies of the adhesin P50 of *Mycoplasma hominis*. *J. Med. Microbiol. 48*, 485−493.

(5) Zhang, Q., and Wise, K. S. (1997) Localized reversible frameshift mutation in an adhesin gene confers a phase-variable adherence phenotype in mycoplasma. *Mol. Microbiol. 25*, 859−869.

(6) Zhang, Q., and Wise, K. S. (1996) Molecular basis of size and antigenic variation of a *Mycoplasma hominis* adhesin encoded by divergent *vaa* genes. *Infect. Immun. 64*, 2737−2744.

(7) Aleksandrova, N. M., Bevova, M. R., and Govorun, V. M. (2000) Transformation of *Mycoplasma hominis* by plasmid pAM120 using electroporation. *Genetika 36*, 309−313.

(8) Wang, H., Deng, F., Pijlman, G. P., Chen, X., Sun, X., Vlak, J. M., and Hu, Z. (2003) Cloning of biologically active genomes from a *Helicoverpa armigera* single-nucleocapsid nucleopolyhedrovirus isolate by using a bacterial artificial chromosome. *Virus Res. 97*, 57−63.

(9) Itaya, M., Fujita, K., Kuroki, A., and Tsuge, K. (2008) Bottom-up genome assembly using the *Bacillus subtilis* genome vector. *Nat. Methods 5*, 41−43.

(10) Ketner, G., Spencer, F., Tugendreich, S., Connelly, C., and Hieter, P. (1994) Efficient manipulation of the human adenovirus

DOI: 10.1021/acssynbio.6b00379
ACS Synth. Biol. 2017, 6, 891−901

genome as an infectious yeast artificial chromosome clone. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 91*, 6186−6190.
(11) Larionov, V., Kouprina, N., Graves, J., and Resnick, M. A. (1996) Highly selective isolation of human DNAs from rodent-human hybrid cells as circular yeast artificial chromosomes by transformation-associated recombination cloning. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 93*, 13925−13930.
(12) Kouprina, N., Graves, J., Cancilla, M. R., Resnick, M. A., and Larionov, V. (1997) Specific isolation of human rDNA genes by TAR cloning. *Gene 197*, 269−276.
(13) Gibson, D. G., Benders, G. A., Andrews-Pfannkoch, C., Denisova, E. A., Baden-Tillson, H., Zaveri, J., Stockwell, T. B., Brownley, A., Thomas, D. W., Algire, M. A., Merryman, C., Young, L., Noskov, V. N., Glass, J. I., Venter, J. C., Hutchison, C. A., 3rd, and Smith, H. O. (2008) Complete chemical synthesis, assembly, and cloning of a *Mycoplasma genitalium* genome. *Science 319*, 1215−1220.
(14) Gibson, D. G., Benders, G. A., Axelrod, K. C., Zaveri, J., Algire, M. A., Moodie, M., Montague, M. G., Venter, J. C., Smith, H. O., and Hutchison, C. A., 3rd (2008) One-step assembly in yeast of 25 overlapping DNA fragments to form a complete synthetic *Mycoplasma genitalium* genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 105*, 20404−20409.
(15) Benders, G. A., Noskov, V. N., Denisova, E. A., Lartigue, C., Gibson, D. G., Assad-Garcia, N., Chuang, R. Y., Carrera, W., Moodie, M., Algire, M. A., Phan, Q., Alperovich, N., Vashee, S., Merryman, C., Venter, J. C., Smith, H. O., Glass, J. I., and Hutchison, C. A., 3rd (2010) Cloning whole bacterial genomes in yeast. *Nucleic Acids Res. 38*, 2558−2569.
(16) Gibson, D. G., Glass, J. I., Lartigue, C., Noskov, V. N., Chuang, R. Y., Algire, M. A., Benders, G. A., Montague, M. G., Ma, L., Moodie, M. M., Merryman, C., Vashee, S., Krishnakumar, R., Assad-Garcia, N., Andrews-Pfannkoch, C., Denisova, E. A., Young, L., Qi, Z. Q., Segall-Shapiro, T. H., Calvey, C. H., Parmar, P. P., Hutchison, C. A., 3rd, Smith, H. O., and Venter, J. C. (2010) Creation of a bacterial cell controlled by a chemically synthesized genome. *Science 329*, 52−56.
(17) Karas, B. J., Tagwerker, C., Yonemoto, I. T., Hutchison, C. A., 3rd, and Smith, H. O. (2012) Cloning the *Acholeplasma laidlawii* PG-8A genome in *Saccharomyces cerevisiae* as a yeast centromeric plasmid. *ACS Synth. Biol. 1*, 22−28.
(18) Tagwerker, C., Dupont, C. L., Karas, B. J., Ma, L., Chuang, R. Y., Benders, G. A., Ramon, A., Novotny, M., Montague, M. G., Venepally, P., Brami, D., Schwartz, A., Andrews-Pfannkoch, C., Gibson, D. G., Glass, J. I., Smith, H. O., Venter, J. C., and Hutchison, C. A., 3rd. (2012) Sequence analysis of a complete 1.66 Mb *Prochlorococcus marinus* MED4 genome cloned in yeast. *Nucleic Acids Res. 40*, 10375−10383.
(19) Karas, B. J., Jablanovic, J., Sun, L., Ma, L., Goldgof, G. M., Stam, J., Ramon, A., Manary, M. J., Winzeler, E. A., Venter, J. C., Weyman, P. D., Gibson, D. G., Glass, J. I., Hutchison, C. A., 3rd, Smith, H. O., and Suzuki, Y. (2013) Direct transfer of whole genomes from bacteria to yeast. *Nat. Methods 10*, 410−402.
(20) Lartigue, C., Glass, J. I., Alperovich, N., Pieper, R., Parmar, P. P., Hutchison, C. A., 3rd, Smith, H. O., and Venter, J. C. (2007) Genome transplantation in bacteria: changing one species to another. *Science 317*, 632−638.
(21) Lartigue, C., Vashee, S., Algire, M. A., Chuang, R. Y., Benders, G. A., Ma, L., Noskov, V. N., Denisova, E. A., Gibson, D. G., Assad-Garcia, N., Alperovich, N., Thomas, D. W., Merryman, C., Hutchison, C. A., 3rd, Smith, H. O., Venter, J. C., and Glass, J. I. (2009) Creating bacterial strains from genomes that have been cloned and engineered in yeast. *Science 325*, 1693−1696.
(22) Lartigue, C., Lebaudy, A., Blanchard, A., El Yacoubi, B., Rose, S., Grosjean, H., and Douthwaite, S. (2014) The flavoprotein Mcap0476 (RlmFO) catalyzes m5U1939 modification in *Mycoplasma capricolum* 23S rRNA. *Nucleic Acids Res. 42*, 8073−8082.
(23) Kannan, K., Tsvetanova, B., Chuang, R. Y., Noskov, V. N., Assad-Garcia, N., Ma, L., Hutchison Iii, C. A., Smith, H. O., Glass, J. I., Merryman, C., Venter, J. C., and Gibson, D. G. (2016) One step engineering of the small-subunit ribosomal RNA using CRISPR/Cas9. *Sci. Rep. 6*, 30714.
(24) Chandran, S., Noskov, V. N., Segall-Shapiro, T. H., Ma, L., Whiteis, C., Lartigue, C., Jores, J., Vashee, S., and Chuang, R. Y. (2014) TREC-IN: gene knock-in genetic tool for genomes cloned in yeast. *BMC Genomics 15*, 1180.
(25) Noskov, V. N., Segall-Shapiro, T. H., and Chuang, R. Y. (2010) Tandem repeat coupled with endonuclease cleavage (TREC): a seamless modification tool for genome engineering in yeast. *Nucleic Acids Res. 38*, 2570−2576.
(26) Tsarmpopoulos, I., Gourgues, G., Blanchard, A., Vashee, S., Jores, J., Lartigue, C., and Sirand-Pugnet, P. (2016) In-Yeast Engineering of a Bacterial Genome Using CRISPR/Cas9. *ACS Synth. Biol. 5*, 104−109.
(27) Kouprina, N., Noskov, V. N., Koriabine, M., Leem, S. H., and Larionov, V. (2004) Exploring transformation-associated recombination cloning for selective isolation of genomic regions. *Methods Mol. Biol. 255*, 69−89.
(28) Larionov, V., Kouprina, N., Graves, J., Chen, X. N., Korenberg, J. R., and Resnick, M. A. (1996) Specific cloning of human DNA as yeast artificial chromosomes by transformation-associated recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 93*, 491−496.
(29) Kouprina, N., and Larionov, V. (2006) TAR cloning: insights into gene function, long-range haplotypes and genome structure and evolution. *Nat. Rev. Genet. 7*, 805−812.
(30) Hopfe, M., Dahlmanns, T., and Henrich, B. (2011) *Mycoplasma hominis* the OppA-mediated cytoadhesion depends on its ATPase activity. *BMC Microbiol. 11*, 185.
(31) Karas, B. J., Suzuki, Y., and Weyman, P. D. (2015) Strategies for cloning and manipulating natural and synthetic chromosomes. *Chromosome Res. 23*, 57−68.
(32) Voelker, L. L., and Dybvig, K. (1996) Gene transfer in *Mycoplasma arthritidis*: transformation, conjugal transfer of Tn916, and evidence for a restriction system recognizing AGCT. *J. Bacteriol. 178*, 6078−6081.
(33) Waites, B. C., Robertson, J. A., Talkington, D. F., and Kenny, G. E. (2001) *Laboratory Diagnosis of Mycoplasmal Infections*, American Society for Microbiology Press., Washington D.C.
(34) Kouprina, N., and Larionov, V. (2008) Selective isolation of genomic loci from complex genomes by transformation-associated recombination cloning in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nat. Protoc. 3*, 371−377.
(35) Labroussaa, F., Lebaudy, A., Baby, V., Gourgues, G., Matteau, D., Vashee, S., Sirand-Pugnet, P., Rodrigue, S., and Lartigue, C. (2016) Impact of donor-recipient phylogenetic distance on bacterial genome transplantation. *Nucleic Acids Res. 44*, 8501.
(36) DiCarlo, J. E., Norville, J. E., Mali, P., Rios, X., Aach, J., and Church, G. M. (2013) Genome engineering in *Saccharomyces cerevisiae* using CRISPR-Cas systems. *Nucleic Acids Res. 41*, 4336−4343.

DOI: 10.1021/acssynbio.6b00379
ACS Synth. Biol. 2017, 6, 891−901

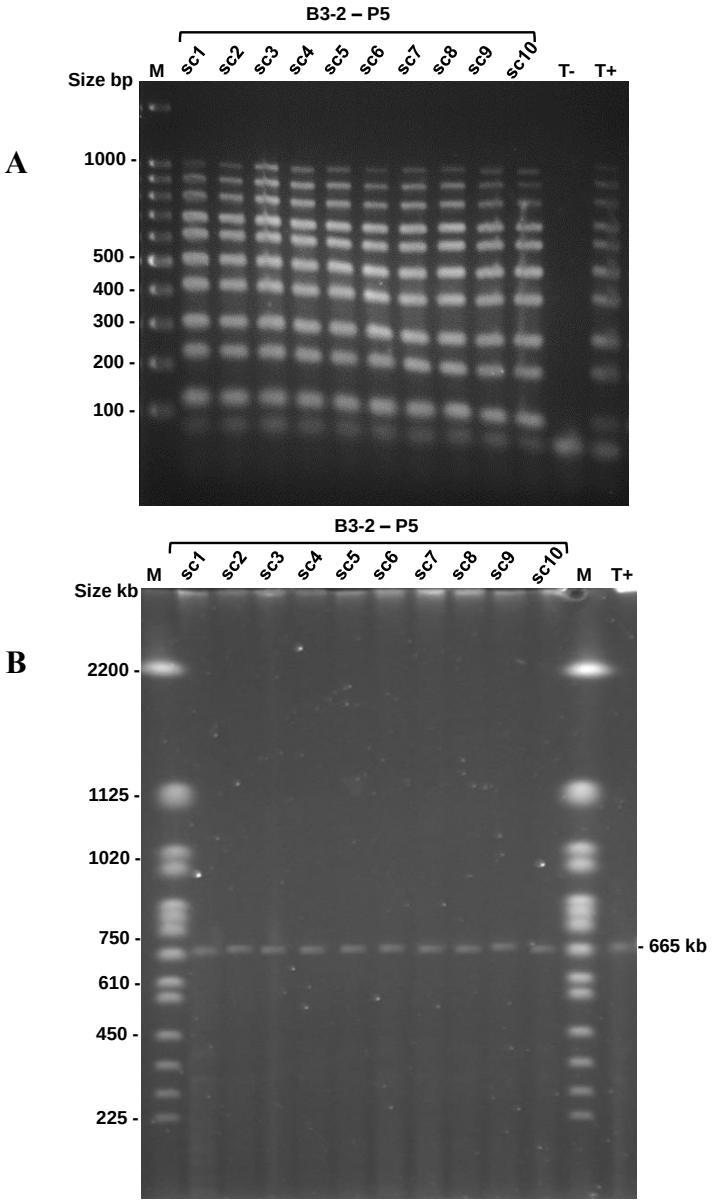


Figure S1. *M hominis* PG21 genome stability in yeast of clone B3-2 at passage 5 (P5). Ten subclones of clone B3-2 at P5 were analyzed by multiplex PCR (**A**) and PFGE (**B**) to verify the integrity of the *M. hominis* PG21 genome in yeast. A 10-band profile was observed by multiplex PCR for each of the 10 subclones (**A**). These results were confirmed by PFGE, with a unique band corresponding to the full-length genome of *M. hominis* PG21 (**B**). P, passage; sc, subclone; T+, DNA template from clone B3-2. In panel A: M, DNA size ladders of 100-1000 bp (Promega); T-, negative control without DNA. In panel B: M, 225-2200-kb *S. cerevisiae* chromosomal DNA ladder (Bio-Rad).

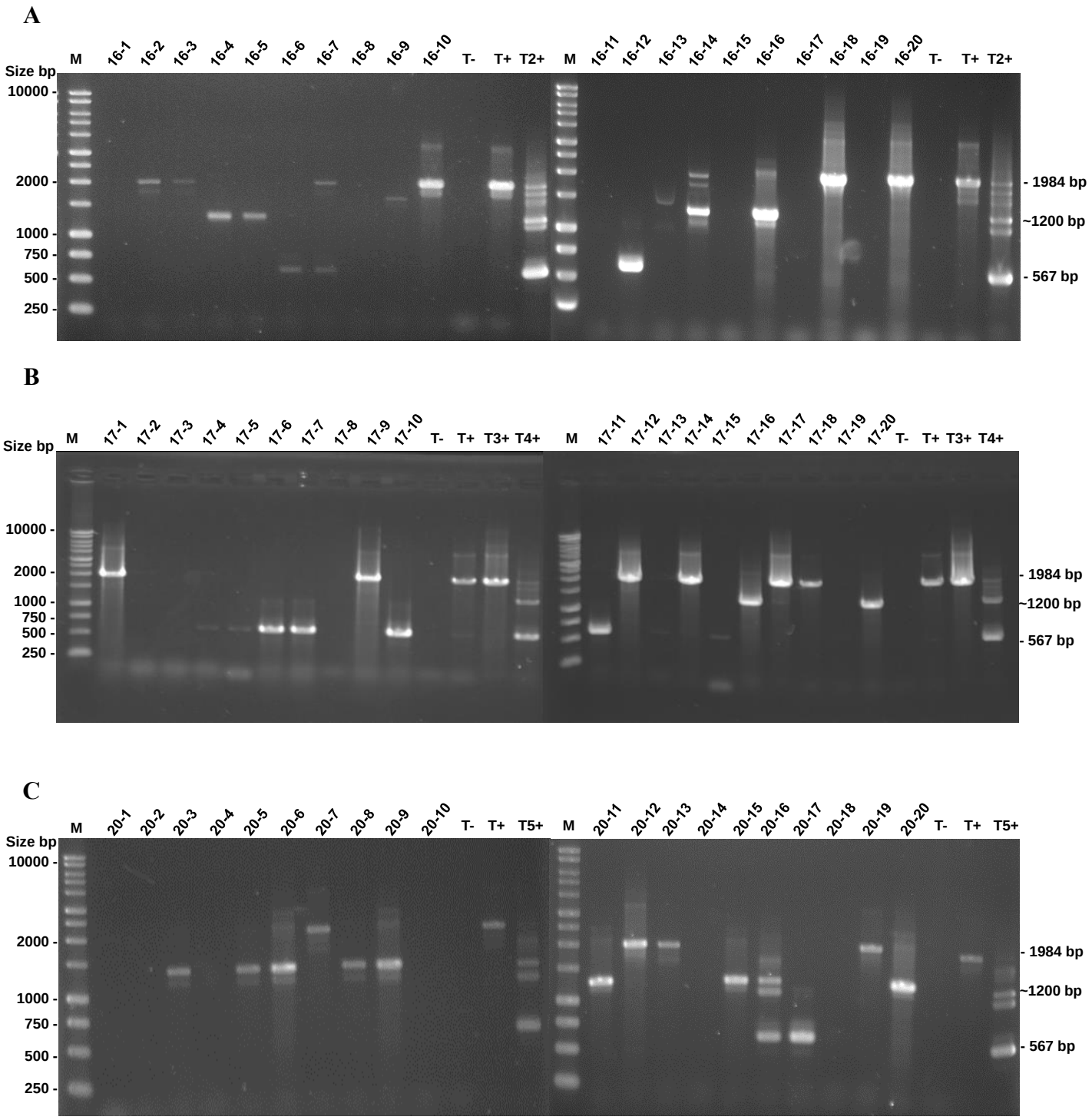


Figure S2. Screening of the *vaa* gene by PCR for individual colonies from pools PL16 (A), PL17 (B) and PL20 (C). PL, Pool; T-, negative control without DNA; T+, DNA template from clone B3-4; T2+, DNA template from PL16; T3+, DNA template from clone PG21 cells; T4+, DNA template from PL17; T5+, DNA template from PL20; M, DNA size ladders of 250-10000 bp (Promega).

A

ATGAAAAAATCAAAGAAAATATTTATAACATTATGTGGAATAGCAACTACCGCTATTTTGCCAGTTGC
TACTATTTCATGTAATGATGATAAACTAGCAGAGAAAAATGGAAAAGAAAAAGCAGATGCTGCTTTAA
AACAAGCAAATGCATTAGCAGAAGAATTGAAAAAAAATCCTGATTATTCAAAAATTTTAGAAACATTA
AACAAAGAAATTGCCGAAGCAACCAAATCATTTAAAGAAGCAGGTTCATACGGCGATTATCCAGCAAT
AATTTCTAAACTTTCAGCAGCAGTAGAAAACGCAAAAAGTGAACAACAAAAAGTTGATCAAGCAAATA
AAAAAATTGCTGATGAAAATTTAAAAATTAAAGAAGGCGCTAAAGAATTATTAAAATTAAGCGAAAAA
ATTCAAAGTTTTGCTGATACAATTGCATTAACAATTACTAAATTAGAAGGAAAAAAATTCGAAATTGA
TGAAACATTTAAAAAACAATTAATTTCAACAATTGAATTATTAAATAAAAAATCAGTCGAAGTTAAAA
CTTTTGCAACAGTAAATACCATTAAAAAAGATTTCCTTTTATCAGAACTAGAATCATTTAAAGAATTT
AACACCTCATGACTTGAAAAAATCGTATCAGAATGAGAAGAAGTTAAAAAAGCTTGATCAAAAGAATT
AGCTGAAATTAAAGCTGACGATGATAAAAAATTAGCAGAAGAAAATCAAAAAATTCAAAATGGTATCG
CAGAATTAACAAAATTAAGCAAGGAAAATTCAGATTTAGCACAAACTATTGAAGAAACTATTGCTAAA
TTAGAAAAGAAATTCCAAATTCCAAAAGATTTTAAAGAAAAATTAACCTCAACAATCAAATTATTAAA
TAAAAAAGCTAACGAAATCAATACATTTGTTTCTACTGTTTCTAAAAAGACAGAATTTGTTCTTGAAG
AATTAGAATCATTTAAAGAATTAAACACCCTTCAATTTAATGAAATTAAAACTGAATGAGCAAAAGTA
CAAGAAGCATGAAAAAATGAATTAACAGAAATTAATAGTATTATTAAGGGTGTTGAAGAATTAAAGAA
ATTAAGTCATGAAATTTCTGAATTTTCTAATTCAGTAAAGAAAACTATTTCTGAATTAGAAAAGAAAT
TTAAGATAGATGATACAACAAATAAGGAAGAAGCTAAAAAATTCAAAAATGAATTAGAAAATTTTGCA
GATCAATTATTGAACAAGAGTCATGAAATTGATAAATTTGTTACAGTTACATCAGCACGAGGAGATTT
TTCTTTATCTGAACTAGAATCATTTAAATCATTTAATACCACATGATTCAATGAAATGAAGTCTGAAT
GAGCAAGAGTTCAAGAAGCTTGAAAAGATCAATTAAAAGAAATCTCAACAAAATAA

B

1- AGATTTCCTTTTATCAGAACTAGAATCATTTAAA

2- AGATTTTCTTTATCTGAACTAGAATCATTTAAA

Figure S3: Sequence of the *vaa* gene (MHO_3470). Internal repeats are highlighted in grey and gRNA2 targeting sequence is underlined. The sequence in bold corresponds to the fragment truncated after cleavage by Cas9 and subsequent intra-molecular recombination events between *vaa* internal repeats (**A**). Alignment of the 34-nucleotides internal repeats (**B**).

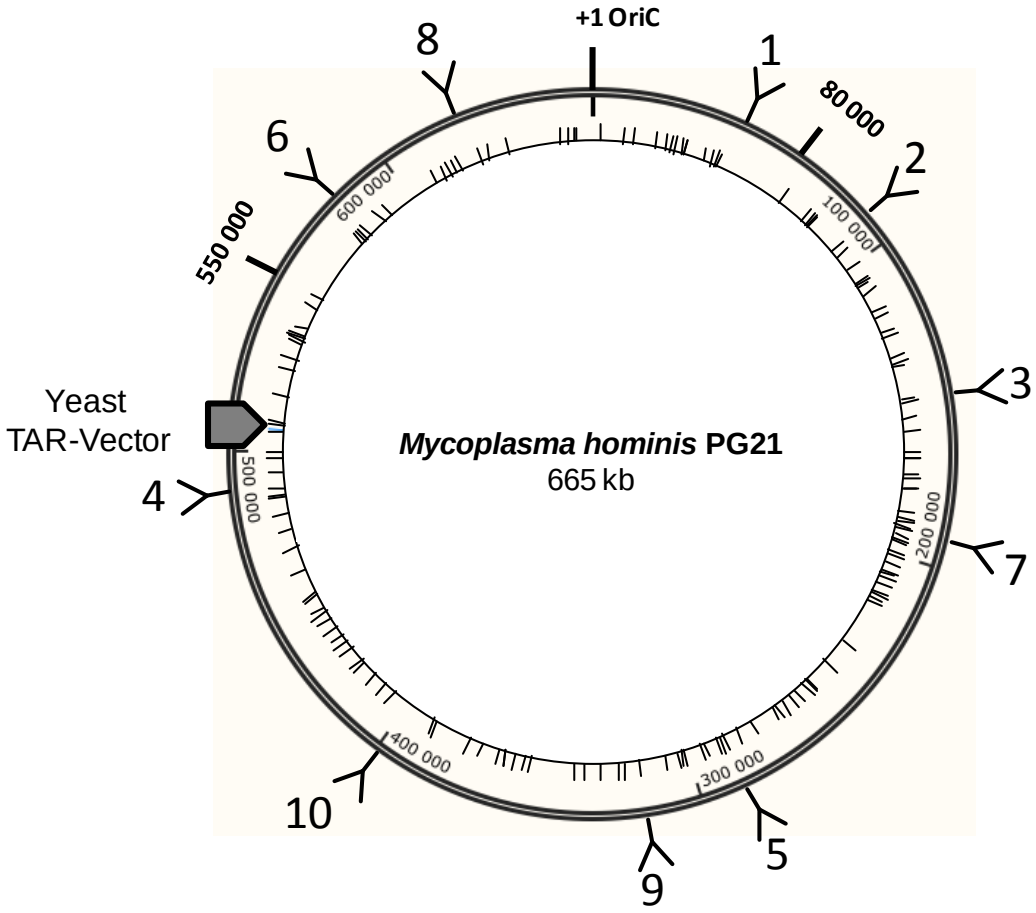


Figure S4: Repartition of the putative ARS sequence around the *M. hominis* PG21 genome.

Numbers (from 1 to 10) around the external circle correspond to the position of the 10 multiplex PCR primers pairs used to verify the integrity of *M. hominis* genome during yeast propagation. Thin lines around the internal circle represent the position of the 11-bp ARS consensus sequence found around *M. hominis* whole genome.

POINTS ESSENTIELS

- Le clonage du génome entier de *M. hominis* PG21 (665 kb) dans la levure *S. cerevisiae* a été réalisé avec succès par la méthode du TAR-cloning.

- Deux clones de levure possédant le génome entier, B3-2 et B3-4 ont été obtenus.

- La stabilité de ces génomes a été étudiée durant 30 passages.

- Après plusieurs passages, le génome de *M. hominis* n'est pas correctement maintenu dans la levure.

- Les deux clones B3-2 et B3-4 évoluent différemment.

- Cette instabilité pourrait être due à l'environnement génomique de *M. hominis*, dont le génome est riche en AT et en séquences répétées.

- Il est nécessaire de vérifier l'intégrité des génomes clonés à chaque étape expérimentale.

- Le génome cloné dans la levure a été modifié avec succès par la technologie CRISPR/Cas9.

- Treize transformants Δ*vaa* ont été correctement obtenus et vérifiés par PCR simplex, multiplex, séquençage du locus et PFGE.

- Des transformants possédant une version tronquée du gène *vaa* ont été observés, expliqués par une recombinaison intra-génique après la coupure double brin.

- L'absence de mutations « off-target » doit être confirmée par le séquençage du génome complet du transformant à transplanter.

CHAPITRE 2

CHAPITRE 2. LA MUTAGENÈSE ALÉATOIRE ENGENDRE DE LARGES RÉARRANGEMENTS CHROMOSOMIQUES DANS LE GÉNOME DE *MYCOPLASMA HOMINIS*

Random insertion of plasposon in *Mycoplasma hominis* minimal genome leads to large DNA rearrangements

Fabien Rideau, Chloé Le Roy, Evelyne Sagné, Hélène Renaudin, Sabine Pereyre, Birgit Henrich, Christine Citti, Carole Lartigue†, Cécile Bébéar†

† Co-last authors

Article à soumettre dans Scientific reports

CONTEXTE

Ce chapitre s'inscrit dans la continuité de mes objectifs de thèse qui concerne la mise en place d'outils génétiques efficaces et multifonctionnels pour modifier le génome de *M. hominis* à souhait. Pour atteindre cet objectif, nous avons choisi d'adapter des technologies et outils de BS qui se sont avérés efficaces chez d'autres mycoplasmes, à *M. hominis*. L'approche générale repose sur le clonage de génomes bactériens entiers chez la levure, la modification de ces génomes grâce aux outils génétiques disponibles chez cet hôte, et la transplantation du génome modifié dans une cellule receveuse afin qu'il puisse s'exprimer. Dans le chapitre 1 nous avons réussi à cloner et modifier le génome de *M. hominis* PG21 dans la levure. Il ne restait plus qu'à transplanter les génomes modifiés dans une cellule receveuse afin d'obtenir les mutants correspondants. Cette étape est complexe et requiert de savoir transformer *M. hominis* ou une espèce phylogénétiquement proche. Concernant *M. hominis*, aucun protocole de transformation n'était disponible pendant ma thèse. En effet, la seule étude rapportant la transformation de *M. hominis* dans la littérature n'a pas été reproduite à ce jour. C'est pourquoi le développement d'un protocole de transformation pour notre modèle a été envisagé lors de mes travaux de thèse.

Le travail a consisté dans un premier temps à étudier et décrire les SRM présents chez *M. hominis*. Les prédictions bio-informatiques ont révélé la présence de SRM nombreux et variés dans les génomes des souches étudiées. Ces données pourraient, en partie, expliquer pourquoi *M. hominis* est une espèce plus difficile à transformer comparée à des mycoplasmes possédant pour certains peu ou pas de SRM.

Malgré cette barrière potentielle, nous avons réussi à développer une méthode de transformation au PEG pour *M. hominis*. Le protocole, qui s'inspire des protocoles de transformations de *M. arthritidis* et *U. parvum*, a permis l'obtention des premiers mutants de *M. hominis* par transposition à l'aide du vecteur pMT85-Tet portant le gène *tet*(M) conférant une résistance aux tétracyclines. Pour établir le protocole, de nombreux paramètres ont été testés. Parmi les paramètres importants, nous pouvons citer la souche de *M. hominis* à transformer, la phase de croissance des cellules, le poids moléculaire et la concentration du PEG à utiliser, ainsi que le temps de contact entre le cellules, le PEG et le plasmide à introduire. Les différentes expériences ont permis d'établir un protocole de transformation reproductible utilisant le PEG_{8000} 40 % avec un temps de contact supérieur à 10 minutes.

Plusieurs mutants d'intérêts ont été générés. Le mutant 28-2 par exemple, contenait le transposon inséré dans le gène codant la protéine P75, adhésine majeure de *M. hominis*. Un test d'adhésion à des cellules HeLa a été mis en place afin de vérifier le rôle de cette protéine dans la capacité de *M. hominis* à adhérer aux cellules, sans montrer de réelle différence avec la souche sauvage M132 de *M. hominis*.

Enfin, le séquençage des génomes de deux transformants, 28-1 et 29-1, a montré que de multiples copies du transposon pouvaient s'intégrer au sein du même génome, en conférant un degré de résistance à la tétracycline différent en fonction du nombre de copies. L'intégration complète du plasmide a également été mise en évidence, tout comme la présence de phénomènes de duplication et d'inversion de grandes régions génomiques, donnant des souches de *M. hominis* présentant de larges réarrangements chromosomiques.

Tous ces travaux ont permis d'ouvrir la voie à l'obtention des premiers mutants de *M. hominis* modifiés par transformation. Ce protocole, une fois optimisé, pourrait permettre à terme d'élaborer le protocole de transplantation et accéder à des méthodes de mutagenèse ciblée chez *M. hominis*, une espèce considérée jusqu'alors comme génétiquement non modifiable.

Random insertion of plasposon in *Mycoplasma hominis* minimal genome leads to large DNA rearrangements

Authors

Fabien Rideau[1-2], Chloé Le Roy[1-2], Evelyne Sagné[3-4], Hélène Renaudin[1-2], Sabine Pereyre[1-2], Birgit Henrich[3], Christine Citti[4], Carole Lartigue[5-6]†*, Cécile Bébéar[1-2]†*

[1]Univ. Bordeaux, USC-EA3671 Mycoplasmal and Chlamydial Infections in Humans, Bordeaux, France.

[2]INRA, USC-EA3671 Mycoplasmal and Chlamydial Infections in Humans, Bordeaux, France.

[3]Institute of Medical Microbiology and Hospital Hygiene, Heinrich Heine University, Düsseldorf, Germany.

[4]IHAP, Université de Toulouse, INRA, ENVT, Toulouse, France.

[5]INRA, UMR 1332 de Biologie du Fruit et Pathologie, F-33140 Villenave d'Ornon, France

[6]Univ. Bordeaux, UMR 1332 de Biologie du Fruit et Pathologie, F-33140 Villenave d'Ornon, France

†Co-last authors

*Corresponding authors: cecile.bebear@u-bordeaux.fr; carole.lartigue-prat@inra.fr

Paper type

Research article

Keywords

Mycoplasma hominis - Transformation - Adhesion - Polyethylene glycol - random mutagenesis - genome rearrangement - Restriction-modification system

Abstract

Mycoplasma hominis is an opportunistic human pathogen involved in genital and neonatal infections. Until this study, the lack of reliable transformation method or efficient tool for genetic manipulation hindered the investigation of its pathogenicity and of its peculiar arginine-based metabolism. Genome analysis performed on 20 different *M. hominis* strains revealed a high proportion of putative restriction-modification systems in this species. Despite their presence, a reproducible PEG-mediated transformation protocol was successfully developed here for three different strains, two clinical isolates and the M132 reference strain. Transformants were generated by transposon mutagenesis with an efficiency of about 10^{-9} transformants/cell/µg plasmid and shown to carry single or multiple mini-transposons randomly inserted in their genome. One M132-mutant was found to carry a single-copy transposon inserted in the gene coding P75, a protein potentially involved in adhesion. Yet, no difference in adhesion was observed in cell-assay, between this mutant and the M132 parent strain. Whole genome sequencing of mutants carrying multiple copies of the transposon further revealed the occurrence of genomic rearrangements. Overall, this is the first time that genetically modified strains of *M. hominis* are obtained by random mutagenesis using a mini-transposon conferring the resistance to tetracycline.

Introduction

The human mycoplasma, *Mycoplasma hominis*, is an opportunistic pathogen, commonly found as a commensal of the women genital tract. It may cause genital and neo-natal infections and systemic infections in immunocompromised patients[1]. This pathogen is frequently associated with *Trichomonas vaginalis* and can influence gene expression in this parasite[2]. The genome of the reference strain *M. hominis* PG21 has been sequenced (665 kb, 27.1% GC)[3] and is known as the second smallest genome, capable of sustaining life after the one of *M. genitalium*[4]. The sequencing data evidenced a particular trait in this species of *Mollicutes*. The production of energy depends on the hydrolysis of arginine in contrast to glucose or urea for most bacteria colonizing the same urogenital niche.

The understanding of metabolism as well as mechanisms of infection in this minimal organism remains severely limited mainly because of the lack of genetic manipulation tools. A transformation method based on electroporation has been described in 2000[5] but up to now, the procedure could not be repeated. Another study showing the transfer of the Tn*916* transposon from *Streptococcus faecalis* to *M. hominis* has been reported[6] but again the results could not be reproduced. More recently, a technique, combining random chemical mutagenesis to high-throughput screening for nucleotide polymorphisms has been applied to *M. hominis* PG21[7]. This method of reverse genetics, called TILLING for Targeting-Induced Local Lesions IN Genomes, allowed producing the first *M. hominis* PG21 mutants. Although, this achievement paved the way for the development of functional genomics in *M. hominis*, the process remains rather fastidious for routine application and may generate multiple non desired mutations across the genome[7].

A synthetic biology approach is now commonly used for mycoplasmas species belonging to the Mycoides cluster[8]. In this procedure, the mycoplasma genome is first isolated from a bacterial cell and cloned into the yeast *Saccharomyces cerevisiae* inside which it can be modified at large scale using the genetic tools available for this host as the Tandem Repeat Endonuclease Cleavage (TREC) or the CRISPR/Cas9 systems[9,10]. Then, the highly modified genome is transplanted in a recipient cell of the same species or a species showing a phylogenetic proximity[11] to generate the cognate mutants. This technique is currently under development for *M. hominis*, but the last transplantation step remained to be achieved[12]. In this genome transplantation procedure, the restriction-modification (R-M) barrier had to be taken in

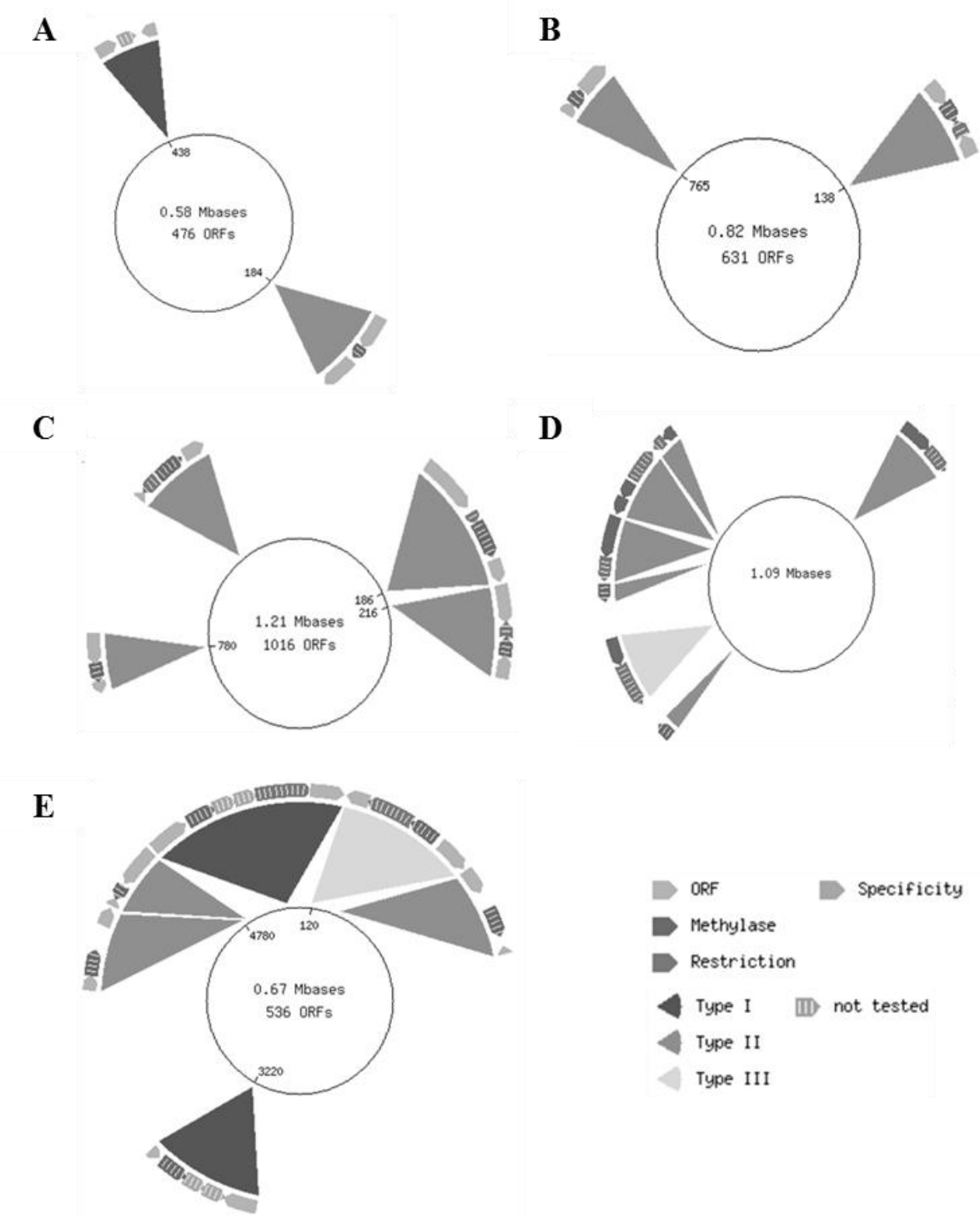


Figure S1. Prediction of restriction-modification systems in different species of mycoplasmas by Rebase database. Representation of restriction-modification (R-M) systems of (A) *M. genitalium* G37, (B) *M. arthritidis* 158 L3-1, (C) *M. mycoides* subsp. *mycoides* PG1, (D) *M. mycoides* subsp. *capricolum* GM12 and (E) *M. hominis* PG21, based on Rebase database. The smallest genome of *M. genitalium* G37 (A) only harbors one type I R-M system and one type II. Cattle pathogens like *M. mycoides* subsp. *mycoides* strain PG1 (C) and *M. mycoides* subsp. *capri* strain GM12 (D) present, respectively, four type II R-M systems and seven R-M systems (six type II and one type III). *M. arthritidis* 158L3-1 (B) has only two type II R-M systems. Two type I, three type II and one type III are predicted by Rebase in *M. hominis* PG21.

Table 1. *In silico* analyses of restriction-modification systems in *M. hominis* sequenced genomes.

M. hominis strains[a]	Type I			Type II							Type III	Type IV	Total
	EcoR124II	EcoKI	BcgIA	Sau96I	HaeIII	FokI	DpnII	Eco57I	BspRI	VspI		McrBC	
PG21	●○[b]			○			●○				●		6
ATCC 27545	●○			●							●		4
ATCC 33131	●			●○							●		4
AF1	●●			●○			●			●	●		7
AF3	●		○	●○			●				●		6
PL5	●	●	○	○○			●		○		●		8
M132[c]	●	●		○			●				●	●	6
35	●			●●○		○					●		6
331	●	●		●●		○	○○○				●		9
2674	●		○	●●			○				●●		7
3299	●○				○		○○○				●		7
3364	●	●		○			○○○○				●	●	9
3631	●		○	○			○				●		5
4016	●●			●○○		○					●		7
4235	●		●	○							●		4
4788	●			○			○	○			●		5
4796	●○		○	●○○		○					●		8
5012	●		○	●○		○	○○				●		8
5060	●		○	●		○	●○				●		7
5096	●○		○	●○			○				●		7

[a]Strains highlighted in grey correspond to strains with genome sequence available on NCBI database.

[b]● corresponds to one complete copy. ○ indicates putative incomplete system.

[c]Strains in bold are transformable strains.

consideration[13]. Genomes incorrectly methylated were immediately hydrolyzed by the restriction enzyme present in the recipient cells[14].

Over the past decades, efforts have been made to elaborate protocols for DNA transfer in *M. hominis* with no conclusive results. However, such procedures were successfully set-up for both *M. arthritidis*, the closest relative mycoplasma of *M. hominis*[15] and for *Ureaplasma parvum*, a human pathogen known to be difficult to transform and sharing the same ecological niche as *M. hominis*[16]. These results encouraged us to pursue the development of a transformation procedure for *M. hominis*. In this study, we report the first reproducible transformation procedure for *M. hominis* with plasmids carrying a transposon, using a transformation protocol based on polyethylene-glycol (PEG).

Results

Restriction-modification systems analyses

Many restriction-modification systems (R-M systems) have been described in the genome of mollicutes species (**Figure S1**), and several have been functionally characterized[8,15,17,18]. These systems provide immunity against foreign DNA and therefore may constitute an important barrier to both natural and artificial bacterial transformations[13,19]. In order to facilitate the development of a transformation procedure for *M. hominis*, we thus seeked for a strain containing the lowest number of defense mechanisms.

Twenty *M. hominis* sequenced genomes, 13 from clinical strains described in this study, six already published[3,20-22], and the M132 reference strain, were analysed and compared using Molligen and Rebase databases[23,24]. Many putative R-M systems were found (**Table 1**), each strain studied contained between four to nine R-M systems. Interestingly, three putative R-M systems were shared by all strains: the type I EcoR124II-like, the type II Sau96I-like and the type III systems. Other predicted systems were diverse in term of type and specificity (four different type I and seven different type II), and/or copy numbers (four copies of the type II DpnII system can be predicted in the strain N°3364) (**Table 1**). R-M systems were considered as incomplete if one or more subunit was missing.

This analysis suggested a great diversity of R-M systems in the *M. hominis* lineage. Since no strain contained none or a very low number of R-M systems, we decided to pursue the work with the strains available in the laboratory, two reference strains PG21 and M132, and

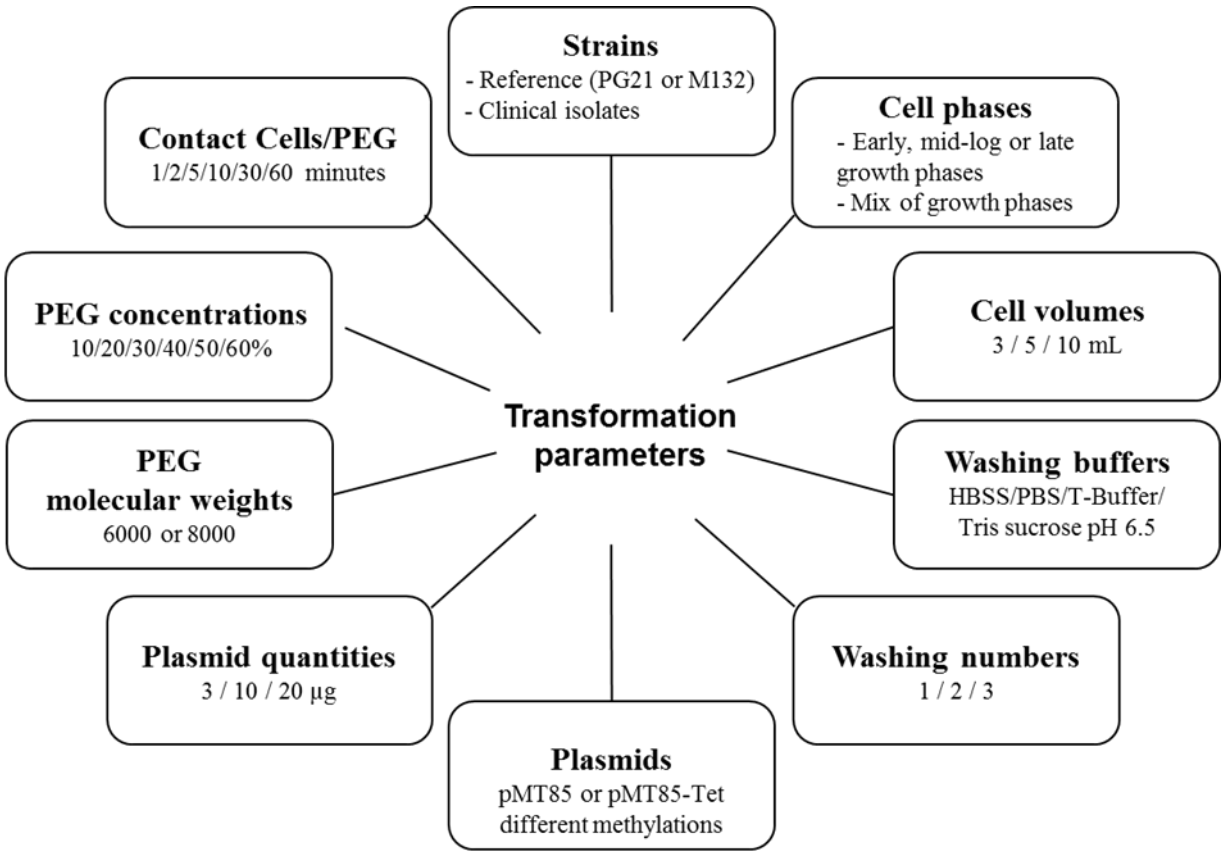


Figure 1. Variable parameters during *M. hominis* transformation assays. All the different conditions experimented during the elaboration of the transformation protocol are detailed in rectangles.

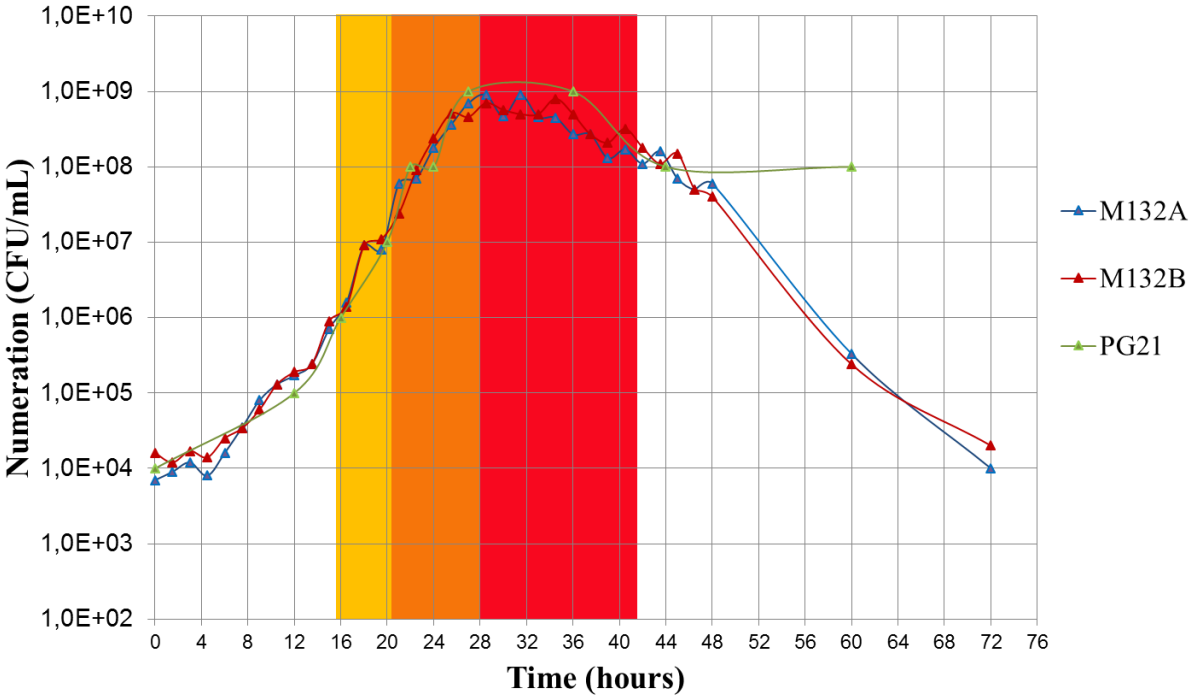


Figure S2. *M. hominis* M132 growth curve. Experiments were done in duplicate (red and blue curves), and *M. hominis* PG21 growth curve was added (Bébéar, personal data). Yellow, orange and red zones correspond respectively to early, mid-log and late phases that we defined. The doubling time for *M. hominis* M132 strain is around 65 minutes.

along with 13 clinical isolates referenced as 35, 331, 2674, 3299, 3364, 3631, 4016, 4235, 4788, 4796, 5012, 5060, and 5096.

Development of the *M. hominis* PEG-mediated transformation protocol

The PEG-mediated transformation protocol of *M. hominis* was elaborated based on the transformation protocols previously developed for *M. arthritidis*[15] and *U. parvum*[16].

Many different conditions of transformation using the plasmid pMT85-Tet were tested to generate the first genetically modified *M. hominis* mutants. First assays were made on the reference strain PG21 but no transformant were obtained. Then, we attempted a series of experiments on the *M. hominis* reference strain M132. Using a preliminary protocol, a few transformants were produced and after this first success, efforts were dedicated to improve the reproducibility and efficiency of the protocol. We worked notably on *M. hominis* cell growth, the wash buffer composition, the methylation of the plasmid to be transformed and the PEG concentration, molecular weight and time of contact with the cells. Close to 150 variations of the protocols were tested and the main parameters that were adjusted are summarized in **Figure 1**.

The impact of *M. hominis* M132 cell growth on the transformation protocol was evaluated accordingly to its growth over time so that we defined three phases of culture (early, mid-log and late) that were used separately or in combination for transformation assays (**Figure S2**). The best efficiencies were finally obtained when a mix of the three growing phases was utilized compared to a precise time of incubation. Different wash buffers, which were also used to prepare the PEG solution, were tested during the optimization of the protocol. While no transformants were observed with the Tris-sucrose pH 6.5 and HBSS buffers, some transformants were obtained with both the PBS and the T Buffer (Tris 10 mM pH 6.5). However, the results obtained with the PBS buffer were not reproducible.

Another important parameter to consider was the methylation of the plasmid pMT85-Tet because R-M systems as previously mentioned may have an important impact on transformation efficiency. The transformation of *M. hominis* using unmethylated plasmid yielded no colonies. In order to protect plasmid against restriction endonucleases and develop a protocol that could be broadly applied, we looked for enzymes that could methylate plasmid DNA as much as possible. We tested two different commercial methyltransferases, the SssI methyltransferase, which methylates CpG islets and the CviPI methylase, which methylates

Table 2. *M. hominis* transformation efficiencies* using PEG-mediated transformation.

Cell/PEG time of contact (minutes)	PEG concentration			Washing buffer
	40 %	50 %	60 %	
1	0	0	0	T-Buffer
10	$8.7.10^{-10}$	0	0	
30	$8.7.10^{-10}$	0	0	
60	$2.9.10^{-10}$	0	0	
1	0	0	0	PBS
10	0	$6.8.10^{-10}$	0	
30	0	$6.8.10^{-10}$	$2.3.10^{-9}$	
60	0	$2.7.10^{-10}$	0	

*Efficiency is expressed in number of transformants/CFU/µg of plasmid.

Table 3. Position of the *tet*(M) gene in *M. hominis* M132 transformants.

***M. hominis* transformant**	*tet*(M) position in the genome	Gene mnemonic	Gene product	Gene length (bp)	*tet*(M) position in the gene
M132-21	384,966	Mhom132_03040	Tyrosine recombinase XerC	1,035	471
22-1	384,682	Mhom132_03040	Tyrosine recombinase XerC	1,035	187
22-4	598,354	Mhom132_05080	tRNA-specific adenosine deaminase tadA	477	438
22-5	684,900	Mhom132_06040	dUTPase	528	21
28-2	297,373	Mhom132_02390	Putative P75 precursor	1,971	846
28-3	574,159	Mhom132_04900	Lmp-related protein	5,394	276
34-1	449,450	-	Non-coding region	-	-
35-4	699,164	Mhom132_06190	Restriction enzyme BcgIA subunit alpha	2,340	2,221
35-11	635,100	Mhom132_05560	Efflux magnesium and cobalt protein CorC	1,305	758
36-1	539,928	Mhom132_04540	Hypothetical Protein	783	104
37-1	71,023	-	Non-coding region	-	-
39-4	689,881	Mhom4016_05850	P120’ protein	2,748	842
39-5	290,526	Mhom4016_02610	Lmp-related protein	1,899	429
41-1	278,839	Mhom132_02270	ABC transporter	1,824	1,117
43-1	130,814	Mhom5012_01160	Cell divison protein FtsZ	1,146	943
46-2	448,380	-	Non-coding region	-	-

GpC islets. In our experiments only the CpG methylase gave transformants. The double methylation with both SssI and CviPI methyltransferases did not increase the efficiency.

Regarding the PEG, first assays of transformation were performed with PEG 8000 40% to 50% as it is commonly done for *M. arthritidis* and *U. parvum*. Other assays, including PEG of different molecular weights and concentrations were further tested. We found that the concentration of the PEG was critical. Low percentages (10 %, 20 %, 30 %) were unsuccessful, while high percentages (40 %, 50 %, 60 %) gave 24 transformants on selective media. The best efficiency was reached with PEG 60 % but contrary to PEG 40%, the results were not reproducible. Finally, different times of contact between cells and the PEG were investigated (1-2-5-10-30-60 minutes). The highest number of transformants was produced after incubating the cells 30 minutes with the methylated plasmid in presence of PEG 8000 40 %. Several other parameters were investigated, such as volume of culture (3 mL to 10 mL), number of washes (1 to 3) or quantity of plasmid (1 to 20 µg) (**Figure 1**), but their impact on transformation efficiency was not clear.

All these experiments resulted in the development of a reproducible PEG-mediated transformation protocol (see Material and Methods) that generate M132 transformants with an efficiency reaching $2.3.10^{-9}$ transformants/cell/µg of plasmid (**Table 2**).

This protocol was tested with 13 others clinical strains available in the laboratory and susceptible to tetracycline. One transformant was only obtained for strains 4016 and 5012.

Genotypic analyses of *M. hominis* transformants

After transformation, colonies appeared on selective plates after 3 to 14 days of incubation. Most of the colonies had a typical “fried-eggs” aspect, characteristic of the wild type *M. hominis* strain.

All transformants tested were positive by PCR for the *tet*(M) gene, suggesting that the transposon of the pMT85-Tet integrated the *M. hominis* genome, they were confirmed as *M. hominis* species after sequencing of the 16S rDNA PCR product.

Further analyses were carried out to precisely determine the site of insertion of the transposon. Single-primer PCRs followed by Sanger sequencing of the PCR products were performed on the gDNA of 24 transformants. Legible results were obtained for 16 out of 24 mutants. For these 16 mutants, results showed that only one copy of the transposon was present in the bacterial genome and that its insertion appeared random (**Table 3**). For the other eight,

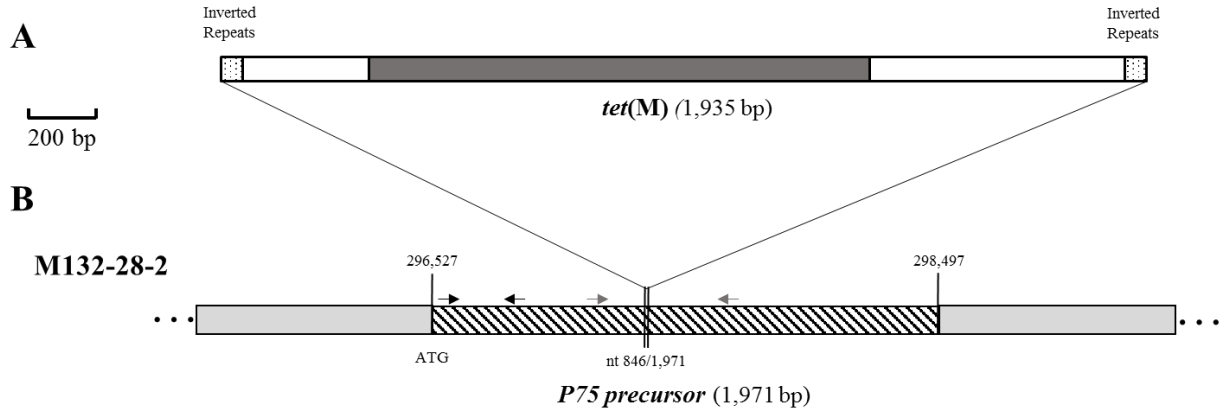


Figure 2. Insertion site of the *tet*(M) gene in the genome of *M. hominis* M132 transformant 28-2. (A) Scheme of the transposon inserted in *M. hominis* M132 genome. It contains inverted repeats (point rectangles), sequence of the pMT85 (white rectangles) and the *tet*(M) gene (dark grey rectangle). (B) Scheme of insertion site for transformant 28-2. Hatched rectangles represents the *M. hominis* M132 gene in which the *tet*(M) gene is inserted. Double thin lines represent the position of the insertion inside the *M. hominis* M132 gene. Clear grey rectangles correspond to sequences of the bacterial genome. Numbers above single thin lines indicate the position around the genome. Black arrows indicate the position of PCR primers P75-F1 and P75-R1, and grey arrows indicate the position of PCR primers P75-F2 and P75-R2.

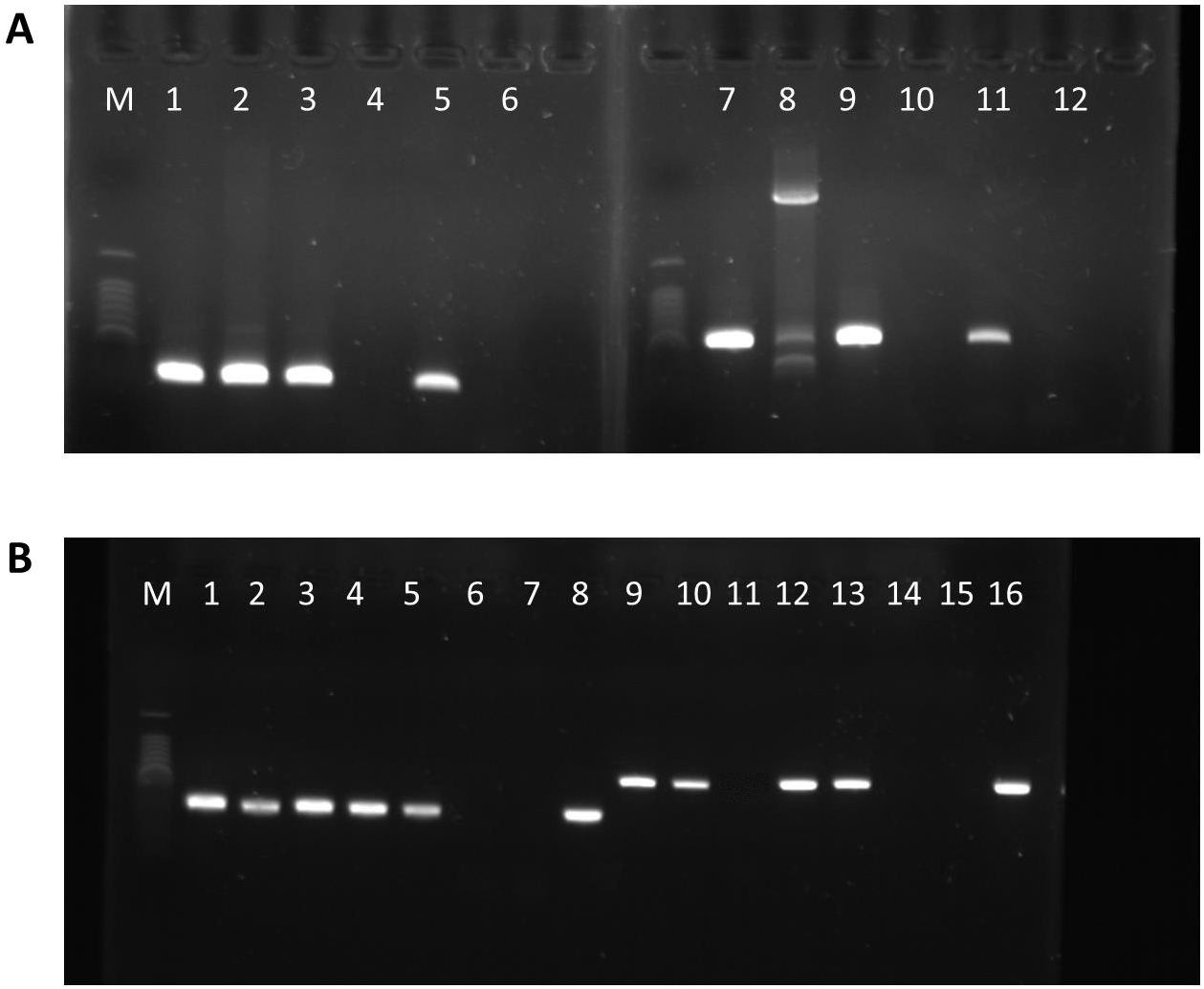


Figure S3. Quantification of the P75 gene expression by semi-quantitative RT-PCR.
(A) PCR amplification of the P75 gene. M: ladder 100 bp (Promega), 1: *M. hominis* M132, 2: mutant 28-2, 3: *M. hominis* PG21, 4: *M. arthritidis* 158L3-1, 5: mutant 39-5, 6: H_2O, 7: *M. hominis* M132, 8: mutant 28-2, 9: *M. hominis* PG21, 10: *M. arthritidis* 158L3-1, 11: mutant 39-5, 12: H_2O. 1-6: primers P75-F1 and P75-R1, 7-12: primers P75-F2 and P75-R2
(B) PCR amplification of cDNA after reverse transcription. 1: *M. hominis* M132 cDNA, 2: mutant 28-1, 3: mutant 28-2, 4: mutant 29-1, 5: mutant 39-5, 6: No RT control, 7: H2O, 8: *M. hominis* M132 DNA, 9: *M. hominis* M132 cDNA, 10: mutant 28-1, 11: mutant 28-2, 12: mutant 29-1, 13: mutant 39-5, 14: No RT control, 15: H2O, 16: *M. hominis* M132 DNA. 1-8: primers P75-F1 and P75-R1, 9-16: primers P75-F2 and P75-R2.

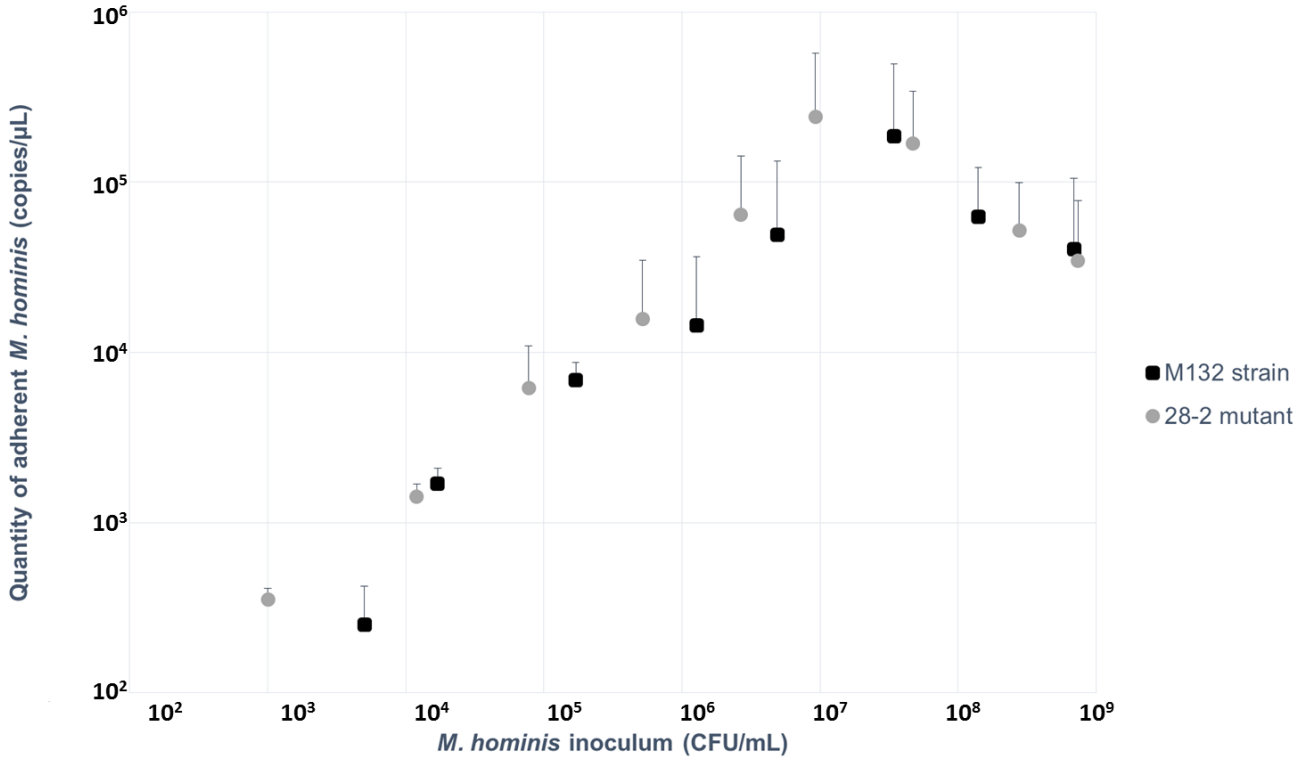


Figure 3. Test of adhesion to Hela cells. The graph shows the quantity of adherent *M. hominis* (copies/µL) as a function of *M. hominis* inoculum (CFU/mL). Black squares correspond to M132 wild-type strain and grey points correspond to the 28-2 mutant. This experiment was made in triplicate, and average values are represented. Standard deviation is represent above points by vertical lines.

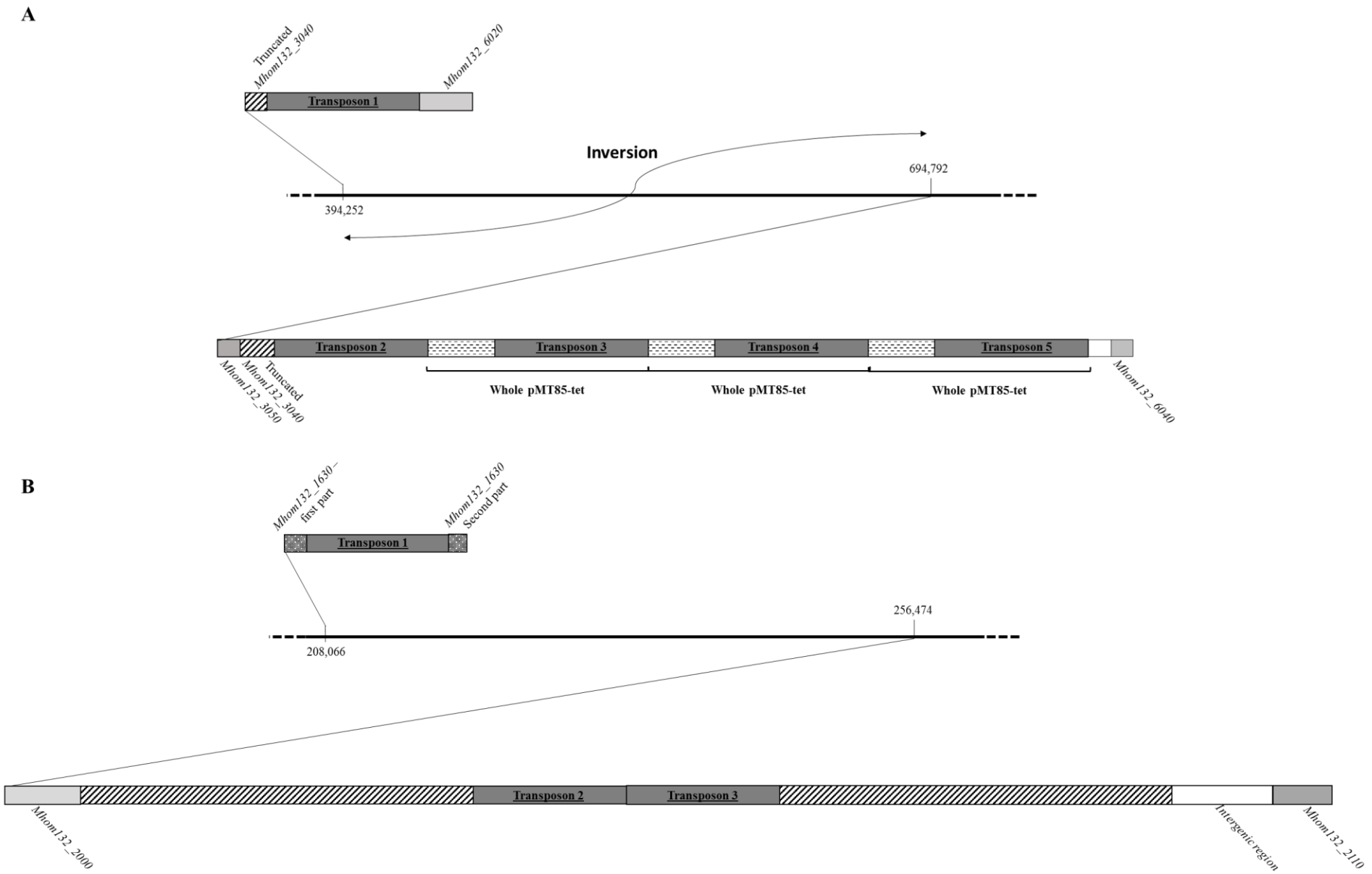


Figure 4. Transposon insertions in mutant 28-1 (A) and 29-1 (B). Black lines correspond to bacterial genome portions. Numbers indicate the insertion position of *tet*(M). Hatched rectangles in (B) represent the duplicated region of 9 kb.

two could not be determined because of technical problems and six had sequencing profiles showing several superimposed peaks, suggesting that several copies of the transposon were present in the genome (see below).

The *M. hominis* mutant 28-2 was of particular interest, the *tet*(M) gene being integrated right in the middle of a gene coding for a precursor of the P75 lipoprotein potentially involved in the pathogenicity of *M. hominis* (**Figure 2**). For the other mutants, the transposon was found in intergenic regions, hypothetical protein, or lipoprotein-encoding genes, or at the end of essential genes (**Table 3**).

Phenotypic analyses of *M. hominis* mutant 28-2

The expression of the gene coding for the P75 was investigated by semi-quantitative RT-PCR. A small transcript corresponding to the beginning of the gene (before the *tet*(M) insertion) could be detected, while no transcript was produced around the insertion site of the transposon, suggesting shorter or no transcript of the gene (**Figure S3**).

The capacity of adhesion of this mutant to HeLa cells was further tested in comparison with *M. hominis* M132 wild-type strain. No difference of adhesion was observed between the M132 wild-type strain and the mutant 28-2 suggesting the mutant fully retained its capacity to adhere to eukaryotic cells. For both samples, the quantity of adherent *M. hominis* linearly increased function to the inoculum (**Figure 3**). As expected, the correlation disappeared with high concentration of *M. hominis* cells.

Large DNA rearrangements detections by WGS

To confirm that the genome of some mutants carried multiple copies of the transposon, two mutants 28-1 and 29-1 were selected to have their genomes completely sequenced. WGS data revealed that in rare case variable copy numbers of the transposon across the *M. hominis* genome. Indeed, five copies of the transposon were found in the genome of transformant 28-1 while three copies were found in the genome of transformant 29-1. Among the five copies of the transposon found in transformant 28-1, four were part of tandem repeats and three out of these four were copies of the entire pMT85-Tet itself (**Figure 4**). The last copy of the transposon was located at a distance of 300 kb. Surprisingly, this 300-kb region that was surrounded by transposons in each side was inverted compared to its wild-type version. This inversion resulted

Table S1. Name and specificity of the R-M systems predicted in *M. hominis* strains.

System	Type I			Type II							Type III	Type IV
	EcoR124II	EcoKI	BcgIA	Sau96I	HaeIII	FokI	DpnII	Eco57I	BspRI	VspI		McrB
Specificity	5'-GAAN$_7$RTCG-3'	5'-AACN$_6$GTGC-3'	5'-CGAN$_6$TGC-3'	G/GNCC[a]	GG/CC	GGATG(N)9/	/GATC	CTGAAG (16/14)	GG/CC	AT/TAAT	?	N4- and C5-methylcytosine
Adenine or Cytosine methylation	Adenine	Adenine	Adenine	Cytosine	Cytosine	Adenine	Adenine	Adenine 5	Cytosine	Adenine 5	Adenine?	-

[a] Red letter indicates the methylation position.

in the disruption of the tyrosine recombinase *xer*C gene in two sections. For clone 29-1, a perfect duplication of about 9 kb was flanking the double insertion of the *tet*(M) at position 256,474 of the genome (**Figure 4**). The third copy was found inserted in conserved hypothetical protein-encoding gene at position 208,266 of the genome. Altogether, these results suggested that insertions of multiple copies of the transposons were located next to large DNA rearrangement events in *M. hominis* genome.

Analyses of the antibiotic resistance in clones carrying several copies of the *tet*(M)

Minimal inhibitory concentrations (MICs) to tetracycline were determined to check if the copy number of *tet*(M) gene influence the level of resistance. Compared to M132, whose MIC was 0.125 µg/mL, the 28-2 mutant, which carries only one copy of *tet*(M) gene, had a MIC of 8 µg/mL, close to the MIC of the 29-1 mutant (16 µg/mL), which had three copies of the transposon. Interestingly, the clone 28-1, with five insertions of the *tet*(M) determinant, had a MIC two to four times higher than the other mutants (32 µg/mL).

Discussion

In this study we developed a reproducible protocol of transformation for *M. hominis* that was based on PEG. We showed that the procedure can be used for random mutagenesis using a plasmid carrying a mini-transposon. But in a near future, we estimate that this procedure could lead to directed mutagenesis as it has been done for other mycoplasma species[25].

To achieve that goal, we first looked for an *M. hominis* strain that contained a low number of R-M systems. Indeed, those systems made of a restriction endonuclease and a DNA methyltransferase, which prevents DNA cleavage by the cognate endonuclease (except for the type IV), are well known for constituting a barrier to DNA transformation[13,26]. The genomes of 20 *M. hominis* strains were scrutinized for the presence of such systems. The *in silico* analysis predicted the presence of many R-M systems in *M. hominis* strains (**Table 1 and Table S1**). All genomes studied harbored minimum four systems and this number increased up to nine for some clinical isolates (331 and 3364). Even though, no information is available regarding their activity, the high prevalence of R-M systems in *M. hominis* genomes combined with their high

diversity (type I, II, III and potentially IV) may explain the difficulty encountered by the community to develop strategies to genetically modify *M. hominis*.

Regarding the transformation protocol itself, several parameters appeared to be crucial for the transformation protocol to be successful (**Figure 1**). First of all, we observed that the success of transformation depended on the selected strains. The PG21 strain was initially selected for our experiments as the most widely studied *M. hominis* representative[7,12]. Unfortunately, no satisfying results were obtained, redirecting our efforts to other strains. Among the 15 other strains tested, only three (M132, 4016 and 5012) were successfully transformed but for no apparent reason. Indeed, the genome of those three strains contained 6, 4 (7 including incomplete copies) and 6 (8 including incomplete copies) different systems respectively, that is to say, a similar number as most of the other strains (**Table 1 and Table S1**). Moreover, all three contained different types of R-M systems (type I, II, III), sometimes in duplicates or triplicates (clinical strains 4016 and 5012). Some R-M systems are perhaps not active but certainly not all. Because bacteria that were subjected to degenerative evolution such as mycoplasmas, have a tendency to lose the genetic material not essential for their survival. Could this observation suggest that other barriers than R-M systems, not yet identified, may exist and prevent artificial DNA transfer in *M. hominis*? In addition, it can be noted that a potential type IV R-M system, which are only composed of a restriction enzyme that cuts methylated DNA, was predicted in *M. hominis* M132 genome (McrBC-like system). In our assays, successful transformation occurred only when the plasmid DNA was treated with the CpG SssI methyltransferase, suggesting that the McrBC system is present but not functional under experimental conditions.

All assays performed either with unmethylated plasmid or plasmid methylated with the GpC M. CviPI methyltransferase did not yield any transformant.

Another central parameter to consider was the phase of the bacterial growth to be used. Indeed, transformants were obtained only when an equal volume of the early, mid and late log phases were combined compared to a phase in particular (**Figure S2**). Although this result was reported for *U. parvum*[16], in many other well-established transformation protocols the early or mid-log phase bacterial cultures are generally preferred[27-30]. Together with the phase of growth, we noticed that some wash buffers were more suited to the *M. hominis* species than others. The T-Buffer used in the *M. arthritidis* transformation[15] was successful while other common buffers for mycoplasmas (PBS 1X or Tris-HCl 10mM, pH 6.5-sucrose 0.5M) were not.

The last critical points to adjust for the *M. hominis* transformation procedure were the molecular weight and the concentration of the PEG. The time of contact between the bacterial

cells and the plasmid mixture was also of high importance. In the end, the procedure required using a PEG having an average molecular weight of 8,000 g/mol (PEG 8000) at high concentration (40%-50%-60% in T-Buffer) and the time of contact with bacterial cells/plasmid mixture lasted for 10 minutes or more. This latter adjustment was not really expected. Indeed, most of the previously published PEG-mediated transformation protocols recommended not letting the reaction occur for more than 2 minutes, because of the presumed toxicity of the PEG for the cells. In our experiments, we did not observed a higher mortality of *M. hominis* cells when their membrane were permeabilized by with PEG during 10 to 30 minutes compared to 2 minutes (data not shown).

It must be noted that two antibiotic resistance encoding genes were tested for selection during transformation experiments. In contrast to the tetracycline determinant, the gentamicin resistance gene only allowed the recovery of false-positive clones corresponding to spontaneous resistants (data not shown). Development of replicative plasmid containing the origin of replication of *M. hominis* was attempted, with no convincing results so far (data not shown).

By combining all these parameters, we finally came up with a reliable protocol of transformation for *M. hominis*. Relatively low efficiencies were obtained for each experiment (up to $2.3.10^{-9}$ transformants/cell/µg of plasmid), meaning that the protocol needs to be further optimized. However, it is reproducible and it generated *M. hominis* genetically modified cells by random mutagenesis. The refinement of the protocol may be done by counteracting the R-M systems, for example by protecting the donor DNA before its entry into the cells or by isolating strains with the transposon inserted in a gene encoding a restriction enzyme that could be later be used as recipient cell for transformation. In the current protocol, plasmids are methylated with the SssI commercial methyltransferase which brings protection (CpG) only against some restriction endonucleases, but not all. To improve this, one can imagine preparing *M. hominis* cellular extracts in order to be able to methylate the exogenous DNA with *M. hominis* endogenous methyltransferases just before transformation[8]. Reaching better efficiencies may also rely on the construction of a plasmid more adapted to *M. hominis*. Different promotor for driving the *tet*(M) expression) gene could be tested, a codon optimized version of the *tet*(M) gene could also be designed.

In the course of these experiments mutants of interest have been isolated, such as mutant 28-2 which harbored the *tet*(M) inside the P75 lipoprotein gene, potentially involved in the cytadherence of *M. hominis*[31,32]. After verifying that the gene was really knocked-out by PCR and RT-PCR, the adhesion capacity of the mutant strain was tested using HeLa cells (**Figure 3)**. Results showed no difference of adhesion between the M132 wild-type strain and the

derivative mutant 28-2. Few hypotheses should be considered: (i) the truncated protein is still expressed at the surface with a conformation allowing adhesion to Hela cells. Antibodies against P75 protein could be helpful to confirm this hypothesis by Western Blot, (ii) the adhesion test to HeLa cells is not sensitive enough. A real negative control with a non-adherent strain would allow us to confirm or disconfirm this hypothesis and, (iii) the absence of one protein is not sufficient to observe an altered adhesion, other surface proteins being certainly involved in *M. hominis* adhesion [33,34].

Next Generation Sequencing unveiled singularities in the genome of two transformants, mutants 28-1 and 29-1, which contained multiple copies of the transposon all around the genome. A large genomic inversion of 300 kb was seen in mutant 28-1, causing the inactivation of a gene coding for the XerC tyrosine recombinase. Interestingly, this recombinase is known for its role as a mediator in site-specific recombination events and inversion events in other bacteria[35-37]. Moreover, the transposon was found integrated in this gene in three mutants out of 24 suggesting that this region is a hotspot of integration in *M. hominis* M132. Multiple insertions of transposons as well as whole plasmid integration were already observed in mycoplasmas with transposons Tn*4001* and Tn*916*[16,38-43]. In the pMT85-Tet, the transposase encoding gene was moved out from the transposon to limit multiple insertions and full plasmid integration[38,44]. We showed for the first time the presence of multiple transposons integration, whole plasmid recombination and highlighted large DNA rearrangements in the genome certainly induced by the presence of the plasmid in *M. hominis* cells.

Another interesting outcome of this work, was that the *tet*(M) copy number might influence the level resistance of a strain to an antibiotic. In our experiments, clone 28-1 with the highest copy number of the *tet*(M) has a tetracycline MIC two to four times higher than those of the other mutants (32 µg/mL).

Altogether, these data demonstrate that we are now capable of obtaining some genetically modified *M. hominis* mutants by random mutagenesis. Even though the transformation efficiency is still low, these results are encouraging and lay the foundation for the gene function studies. They may also pave the way toward the development of genome transplantation, to permit targeted mutagenesis and direct inactivation of gene of interest in the *M. hominis* species.

Materials and Methods

Mycoplasmas strains culture and numeration

M. hominis reference strains PG21 (ATCC 23114) and M132 (ATCC 43521) and clinical isolates 2674, 3299, 331, 3364, 35, 3631, 4016, 4235, 4788, 4796, 5012, 5060, 5096 (SRA accession number: PRJNA493181) were grown at 37°C in Hayflick modified medium supplemented with arginine during 24 to 48 hours[45]. Transformants were cultured in the same media containing 2 µg/mL of tetracycline. Bacterial titers were evaluated both by Color Changing Units (CCU) and Colony-Forming Unit (CFU) as previously described[45]. MIC were determined according to Clinical & Laboratory Standards Institute guidelines[46].

Plasmid and *in vitro* methylation

The vector used for *M. hominis* transformation was the pMT85-Tet, derived from the Tn4001-based mini transposon plasmid pMT85[44]. The pMT85-Tet carried the tetracycline resistance gene *tet*(M) driven by the spiralin promotor (PS) instead of the gentamicin resistance gene[47,48]. Before transformation, the plasmid was methylated by the CpG methyltransferase from *Spiroplasma* sp. strain MQ1 (M. *Sss*I, New England Biolabs) according to manufacturer's recommendations.

M. hominis transformation protocol

After determining the optimal conditions, the protocol was performed as follows: a 10^8 CFU/mL pre-culture was diluted from 10^{-1} to 10^{-10} and incubated 24h at 37°C to obtain three different phases of culture (e.g. early, mid-log and late phase). The pool of these three different growth stages (which corresponded to the 10^{-3}, 10^{-4} and 10^{-5} dilutions in three mL of culture) was centrifuged at 10,000 g, 4°C during 20 minutes. The pellet was washed twice with cold T-Buffer (Tris 10 mM pH 6.5) and centrifuged at 10,000 g, 4°C during 10 minutes. After centrifugation, the cells were put in suspension with 400 µL of cold $CaCl_2$ 0.1 M and incubated at 4°C during 30 minutes. Cold $CaCl_2$-incubated cells (100 µL) were gently mixed with 10 µg of yeast tRNA (Life technologies) and 10 µg of plasmid methylated with SssI methyltransferase (New England Biolabs). This mixture was dropped at the surface of 1.5 mL of 40% PEG 8000

(Sigma-Aldrich) during 30 minutes. The contact was stopped by addition of 7.5 mL of Hayflick arginine liquid medium and incubated 3 hours at 37°C. The transformation reaction was centrifuged at 8,000 g, room temperature during 10 minutes. Pellet was suspended with 1 mL of Hayflick arginine liquid medium and 200 µL were plated on selective solid medium with 2 µg/mL of tetracycline (Sigma-Aldrich) and incubated at 37°C with 5% CO_2. Transformed *M. hominis* colonies appeared between 3 to 7 days after transformation.

Colonies obtained on selective plates were picked in 1 mL of Hayflick arginine plus tetracycline (2µg/mL) and incubated at 37°C during 24 to 96 hours. Cultures were stocked at -80°C. PCRs were performed with DNA extracts obtained with the NucleoSpin® Tissue kit (Macherey-Nagel). After checking of the presence of the *tet*(M) gene and confirmation of the identification of the *M. hominis* species by PCR (see below), the positive transformants were sub-cloned three times by successive passages in selective solid medium.

Screening of *M. hominis* transformants by PCR

The *tet*(M) PCR reaction mixture, 50 µL final volume, consisted of 1X PCR buffer (Promega), 3 mM $MgCl_2$, 0.2 mM dNTPs, 1 µM of each primers (IntMtet1 and IntMtet2), 1U of HotStart G2 DNA polymerase (Promega), and 5 µL of DNA template. Amplification was performed as described by Dordet-Frisoni *et al.*[47] Species determination was performed by amplification and sequencing (Eurofins genomics) of the 16S rDNA gene, according to Teyssou, et al. [49].

Determination of the *tet*(M) gene insertion site by Single-Primer PCR

M. hominis total genomic DNA extractions were performed on 10 mL cultures using the NucleoBond® AXG20 columns and the NucleoBond® Buffer Set III from Macherey Nagel according to manufacturer's instructions. Insertion sites of the transposon were then determined by single-primer PCR. The 25 µL final volume mix was composed of 1X PCR Buffer (Promega), 3 mM $MgCl_2$, 1 µM of SG9 primer (5'-TTTGGTTCAGAAACTGGTGCT- 3'), 0.2 mM dNTPs, 0.1 µL of HotStart G2 DNA polymerase (Promega), and 2.5 µL of transformants DNA. The PCR amplification cycle was performed as previously described[47]. The insertion positions were determined by Sanger sequencing (Eurofins genomics) of the PCR products with the nested primer MT85-1 (5'– ACAGTAATTGCGGGTGGATC-3').

Analyses of mutant 28-2

Expression of the P75 gene (*Mhom132_02390*) in the *M. hominis* mutant 28-2 was assessed by semi-quantitative RT-PCR. Total RNA extraction was performed using NucleoSpin®RNA plus kit (Macherey Nagel) according to manufacturer's instructions. Reverse transcription was made on total extracts with Avian Myeloblastosis Virus (AMV) Reverse Transcriptase following recommendations provided by New England Biolabs. Transcripts presence was finally verified by PCR amplification of cDNA. The 50 µL final volume mix was composed of 1X PCR Buffer (Promega), 3 mM $MgCl_2$, 1µM of each primer, 0.2 mM dNTPs, 0.2 µL of HotStart G2 DNA polymerase (Promega), and 5 µL of cDNA. Two couples of primers were used, P75-F1 5'-GGCTTTTGGACTTTTAGCGC-3' and P75-R1 5'-GGCTATTGTTTTCAGGGCTTG-3'allowingthe amplification of a 5' region of the gene; and P75-F2 5'-GCAGCGCATGACGAATTAAG-3' and P75-R2 5'-GCGCTTCATTTGGCTTGACT-3', allowing the amplification of the region around the transposon insertion site. Amplification was performed as follows: 95 °C for 15 min, 35 cycles of 1 min at 95°C, 1 min at 58°C and 1 min at 72°C, and then 5 min at 72°C. *M. hominis* mutant 28-2 adhesion to immobilized HeLa cells was determined as previously reported[7]. A control with no HeLa cells was made to exclude the fact that *M. hominis* adheres to the plate (data not shown).

Whole genome sequencing (WGS)

WGS with 1D Native barcoding genomic DNA (with EXP-NBD103 and SQK-LSK108) was performed using Oxford Nanopore Technologies (ONT) GridION device by the Genome Transcriptome Facility of Bordeaux, France. Each step was performed according to ONT recommendations. Each purified barcoded DNA was quantified using Qubit fluorometer and DNA sizes were checked using Tapestation. Sequencing was performed with R9.4.1 Flowcell on the GridION device during 42 hours using live basecalling through the GridION dedicated basecaller Guppy. Whole genomes of transformants 28-1 and 29-1 were analysed to determine if multiple insertion of the *tet*(M) gene was possible. Genomes were assembled with Canu 1.7 software[50] and circularized with apc software[51].

References

1 Waites, K. B., Schelonka, R. L., Xiao, L., Grigsby, P. L. & Novy, M. J. Congenital and opportunistic infections: Ureaplasma species and *Mycoplasma hominis*. *Seminars in fetal & neonatal medicine* **14**, 190-199, doi:10.1016/j.siny.2008.11.009 (2009).

2 Furnkranz, U., Henrich, B. & Walochnik, J. *Mycoplasma hominis* impacts gene expression in *Trichomonas vaginalis*. *Parasitology research*, doi:10.1007/s00436-018-5761-6 (2018).

3 Pereyre, S. *et al.* Life on arginine for *Mycoplasma hominis*: clues from its minimal genome and comparison with other human urogenital mycoplasmas. *PLoS genetics* **5**, e1000677, doi:10.1371/journal.pgen.1000677 (2009).

4 Fraser, C. M. *et al.* The minimal gene complement of *Mycoplasma genitalium*. *Science* **270**, 397-403 (1995).

5 Aleksandrova, N. M., Bevova, M. R. & Govorun, V. M. Transformation of *Mycoplasma hominis* by plasmid pAM120 using electroporation. *Genetika* **36**, 309-313 (2000).

6 Roberts, M. C. & Kenny, G. E. Conjugal transfer of transposon Tn*916* from *Streptococcus faecalis* to *Mycoplasma hominis*. *Journal of bacteriology* **169**, 3836-3839 (1987).

7 Pereyre, S. *et al.* Generation of *Mycoplasma hominis* gene-targeted mutants by targeting-induced local lesions in genomes (TILLING). *BMC genomics* **19**, 525, doi:10.1186/s12864-018-4917-1 (2018).

8 Lartigue, C. *et al.* Creating bacterial strains from genomes that have been cloned and engineered in yeast. *Science* **325**, 1693-1696, doi:10.1126/science.1173759 (2009).

9 Tsarmpopoulos, I. *et al.* In-yeast engineering of a bacterial genome using CRISPR/Cas9. *ACS synthetic biology* **5**, 104-109, doi:10.1021/acssynbio.5b00196 (2016).

10 Chandran, S. *et al.* TREC-IN: gene knock-in genetic tool for genomes cloned in yeast. *BMC genomics* **15**, 1180, doi:10.1186/1471-2164-15-1180 (2014).

11 Labroussaa, F. *et al.* Impact of donor-recipient phylogenetic distance on bacterial genome transplantation. *Nucleic acids research*, doi:10.1093/nar/gkw688 (2016).

12 Rideau, F. *et al.* Cloning, stability, and modification of *Mycoplasma hominis* genome in yeast. *ACS synthetic biology* **6**, 891-901, doi:10.1021/acssynbio.6b00379 (2017).

13 Vasu, K. & Nagaraja, V. Diverse functions of restriction-modification systems in addition to cellular defense. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* **77**, 53-72, doi:10.1128/MMBR.00044-12 (2013).

14 Lartigue, C. *et al.* Genome transplantation in bacteria: changing one species to another. *Science* **317**, 632-638, doi:10.1126/science.1144622 (2007).

15 Voelker, L. L. & Dybvig, K. Gene transfer in *Mycoplasma arthritidis*: transformation, conjugal transfer of Tn*916*, and evidence for a restriction system recognizing AGCT. *Journal of bacteriology* **178**, 6078-6081 (1996).

16 Aboklaish, A. F. *et al.* Random insertion and gene disruption via transposon mutagenesis of *Ureaplasma parvum* using a mini-transposon plasmid. *International journal of medical microbiology : IJMM* **304**, 1218-1225, doi:10.1016/j.ijmm.2014.09.003 (2014).

17 Algire, M. A., Montague, M. G., Vashee, S., Lartigue, C. & Merryman, C. A Type III restriction-modification system in *Mycoplasma mycoides subsp. capri*. *Open biology* **2**, 120115, doi:10.1098/rsob.120115 (2012).

18 Luo, W., Tu, A. H., Cao, Z., Yu, H. & Dybvig, K. Identification of an isoschizomer of the HhaI DNA methyltransferase in *Mycoplasma arthritidis*. *FEMS microbiology letters* **290**, 195-198, doi:10.1111/j.1574-6968.2008.01428.x (2009).

19 Dupuis, M. E., Villion, M., Magadan, A. H. & Moineau, S. CRISPR-Cas and restriction-modification systems are compatible and increase phage resistance. *Nature communications* **4**, 2087, doi:10.1038/ncomms3087 (2013).

20 Allen-Daniels, M. J. *et al.* Identification of a gene in *Mycoplasma hominis* associated with preterm birth and microbial burden in intraamniotic infection. *American journal of obstetrics and gynecology* **212**, 779 e771-779 e713, doi:10.1016/j.ajog.2015.01.032 (2015).

21 Calcutt, M. J. & Foecking, M. F. Analysis of the complete *Mycoplasma hominis* LBD-4 genome sequence reveals strain-variable prophage insertion and distinctive repeat-containing surface protein arrangements. *Genome announcements* **3**, doi:10.1128/genomeA.01582-14 (2015).

22 Calcutt, M. J. & Foecking, M. F. Complete genome sequence of *Mycoplasma hominis* strain Sprott (ATCC 33131), isolated from a patient with nongonococcal urethritis. *Genome announcements* **3**, doi:10.1128/genomeA.00771-15 (2015).

23 Roberts, R. J., Vincze, T., Posfai, J. & Macelis, D. REBASE--a database for DNA restriction and modification: enzymes, genes and genomes. *Nucleic acids research* **43**, D298-299, doi:10.1093/nar/gku1046 (2015).

24 Barre, A., de Daruvar, A. & Blanchard, A. MolliGen, a database dedicated to the comparative genomics of Mollicutes. *Nucleic acids research* **32**, D307-310, doi:10.1093/nar/gkh114 (2004).

25 Renaudin, J., Breton, M. & Citti, C. Molecular genetic tools for mollicutes. In: Browning G, Citti C, editors. Mollicutes: molecular biology and pathogenesis. Norwich UK: Horizon scientific press; 2014. p. 55–76. (2014).

26 Brocchi, M., Vasconcelos, A. T. R. d. & Zaha, A. Restriction-modification systems in *Mycoplasma* spp. *Genetics and Molecular Biology* **30**, 236-244 (2007).

27 Whetzel, P. L., Hnatow, L. L., Keeler, C. L., Jr. & Dohms, J. E. Transposon mutagenesis of *Mycoplasma gallisepticum*. *Plasmid* **49**, 34-43 (2003).

28 Sharma, S. *et al.* Development and host compatibility of plasmids for two important ruminant pathogens, *Mycoplasma bovis* and *Mycoplasma agalactiae*. *PloS one* **10**, e0119000, doi:10.1371/journal.pone.0119000 (2015).

29 Washburn, L. R., Bird, D. W. & Dybvig, K. Restoration of cytoadherence to an adherence-deficient mutant of *Mycoplasma arthritidis* by genetic complementation. *Infection and immunity* **71**, 671-675 (2003).

30 Lartigue, C., Blanchard, A., Renaudin, J., Thiaucourt, F. & Sirand-Pugnet, P. Host specificity of mollicutes *oriC* plasmids: functional analysis of replication origin. *Nucleic acids research* **31**, 6610-6618 (2003).

31 Henrich, B., Kretzmer, F., Deenen, R. & Kohrer, K. Validation of a novel Mho microarray for a comprehensive characterisation of the *Mycoplasma hominis* action in HeLa cell infection. *PloS one* **12**, e0181383, doi:10.1371/journal.pone.0181383 (2017).

32 Roachford, O. S. E., Nelson, K. E. & Mohapatra, B. R. Comparative genomics of four Mycoplasma species of the human urogenital tract: analysis of their core genomes and virulence genes. *International journal of medical microbiology : IJMM* **307**, 508-520, doi:10.1016/j.ijmm.2017.09.006 (2017).

33 Goret, J. *et al.* Surface lipoproteome of *Mycoplasma hominis* PG21 and differential expression after contact with human dendritic cells. *Future microbiology* **11**, 179-194, doi:10.2217/fmb.15.130 (2016).

34 Henrich, B., Feldmann, R. C. & Hadding, U. Cytoadhesins of *Mycoplasma hominis*. *Infection and immunity* **61**, 2945-2951 (1993).

35 Castillo, F., Benmohamed, A. & Szatmari, G. Xer site specific recombination: double and single recombinase systems. *Frontiers in microbiology* **8**, 453, doi:10.3389/fmicb.2017.00453 (2017).

36 Das, B., Martinez, E., Midonet, C. & Barre, F. X. Integrative mobile elements exploiting Xer recombination. *Trends in microbiology* **21**, 23-30, doi:10.1016/j.tim.2012.10.003 (2013).

37 Midonet, C. & Barre, F. X. Xer site-specific recombination: promoting vertical and horizontal transmission of genetic information. *Microbiology spectrum* **2**, doi:10.1128/microbiolspec.MDNA3-0056-2014 (2014).

38 Pour-El, I., Adams, C. & Minion, F. C. Construction of mini-Tn4001tet and its use in *Mycoplasma gallisepticum*. *Plasmid* **47**, 129-137, doi:10.1006/plas.2001.1558 (2002).

39 Foissac, X., Saillard, C. & Bove, J. M. Random insertion of transposon Tn*4001* in the genome of *Spiroplasma citri* strain GII3. *Plasmid* **37**, 80-86, doi:10.1006/plas.1996.1271 (1997).

40 Mahairas, G. G. & Minion, F. C. Random insertion of the gentamicin resistance transposon Tn*4001* in *Mycoplasma pulmonis*. *Plasmid* **21**, 43-47 (1989).

41 Dybvig, K. & Alderete, J. Transformation of *Mycoplasma pulmonis* and *Mycoplasma hyorhinis*: transposition of Tn*916* and formation of cointegrate structures. *Plasmid* **20**, 33-41 (1988).

42 Chopra-Dewasthaly, R., Zimmermann, M., Rosengarten, R. & Citti, C. First steps towards the genetic manipulation of *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma bovis* using the transposon Tn4001mod. *International journal of medical microbiology : IJMM* **294**, 447-453, doi:10.1016/j.ijmm.2004.09.010 (2005).

43 Ruffin, D. C. *et al.* Transposon mutagenesis of *Mycoplasma gallisepticum* by conjugation with *Enterococcus faecalis* and determination of insertion site by direct genomic sequencing. *Plasmid* **44**, 191-195, doi:10.1006/plas.2000.1485 (2000).

44 Zimmerman, C. U. & Herrmann, R. Synthesis of a small, cysteine-rich, 29 amino acids long peptide in *Mycoplasma pneumoniae*. *FEMS microbiology letters* **253**, 315-321, doi:10.1016/j.femsle.2005.09.054 (2005).

45 Waites KB, Bébéar CM, Robertson JA, Talkington DF & GE, K. *Laboratory Diagnosis of Mycoplasmal Infections*. (Eds Cumitech 34, Washington D.C.: American Society for Microbiology Press, 2001).

46 Waites, K. B. *et al.* Methods for antimicrobial susceptibility testing for human mycoplasmas : Approved guideline. Report No. Document M43-A, (Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne (PA), 2011).

47 Dordet Frisoni, E. *et al.* ICEA of *Mycoplasma agalactiae*: a new family of self-transmissible integrative elements that confers conjugative properties to the recipient strain. *Molecular microbiology* **89**, 1226-1239, doi:10.1111/mmi.12341 (2013).

48 Dordet-Frisoni, E. *et al.* Chromosomal transfers in mycoplasmas: when minimal genomes go mobile. *mBio* **5**, e01958, doi:10.1128/mBio.01958-14 (2014).

49 Teyssou, R. *et al.* Detection of mollicutes contamination in cell cultures by 16S rDNA amplification. *Molecular and cellular probes* **7**, 209-216, doi:10.1006/mcpr.1993.1030 (1993).

50 Koren, S. *et al.* Canu: scalable and accurate long-read assembly via adaptive k-mer weighting and repeat separation. *Genome research* **27**, 722-736, doi:10.1101/gr.215087.116 (2017).

51 Lin, H. C. *et al.* AGORA: Assembly Guided by Optical Restriction Alignment. *BMC bioinformatics* **13**, 189, doi:10.1186/1471-2105-13-189 (2012).

Acknowledgments

The authors thank Christophe Boury and Charlotte Mouden for whole genome sequencing and assembling, performed at the Genome Transcriptome Facility of Bordeaux. We thank Brigitte Tauzin, Marie Gardette and Nadège Hénin for technical assistance. We also thank Emilie Dordet-Frisoni for her help on single-primer PCR. We finally thank Sébastien Rodrigue and Florence Tardy for reading the manuscript.

Author contributions

CB, CL, FR, CC, BH and SP designed the research. FR, CLR, HR and ES performed the experiments. FR, CL and CB contributed to writing of the paper.

Conflict of interest

The authors declare no competing financial interest.

POINTS ESSENTIELS

- *M. hominis* est une bactérie minimale réfractaire à la transformation, limitant les approches de génie génétique.

- *M. hominis* possède de nombreux SRM complets qui pourraient constituer une barrière à l'entrée d'ADN étranger dans la cellule.

- Une technique de transformation basée sur le polyéthylène glycol (PEG) a été développée pour trois souches de *M. hominis*.

- Contrairement aux procédures déjà décrites dans la littérature, le protocole de transformation au PEG est fiable et reproductible.

- Les mutants sont générés par mutagenèse aléatoire e n utilisant le plasposon pMT85-Tet portant le gène de résistance à la tétracycline *tet*(M).

- Le mutant 28-2 possède un transposon dans le gène codant la protéine P75, adhésine majeure de *M. hominis*. Son inactivation a été confirmée par RT-PCR.

- Un test d'adhésion à des cellules HeLa a été mis en place, et ne montre pas de différence d'adhésion entre le mutant 28-2 et la souche sauvage M132 de *M. hominis*.

- Certains mutants ont intégré plusieurs copies du transposon dans leur génome, une intégration entière du plasmide a également été observée.

- Le séquençage de génomes complets a mis en évidence des évènements de réarrangements génomiques de grande ampleur, telles que des duplications ou des inversions, chez des mutants de *M. hominis*.

- La détermination des CMI à la tétracycline des mutants 28-1, 28-2 et 29-1 a montré une augmentation de la résistance en fonction du nombre de copies du transposon retrouvées dans les différents génomes.

CONCLUSION ET DISCUSSION

CONCLUSION ET DISCUSSION

L'objectif majeur de ma thèse consistait à développer des outils génétiques pour modifier le génome de *M. hominis*, jusqu'alors considéré comme non transformable. Dans la littérature, trois équipes avaient rapporté l'obtention de mutants pour cette espèce bactérienne, par conjugaison (Roberts and Kenny, 1987), électroporation (Aleksandrova *et al*., 2000), ou par mutagenèse chimique (Pereyre *et al*., 2018). Mais ces résultats n'avaient pour certains, jamais été reproduits et pour d'autres reposaient sur des techniques lourdes à mettre en place. Pour atteindre mon objectif de thèse, nous avons opté pour une approche originale faisant appel à des technologies de BS développées récemment pour des mycoplasmes du groupe Mycoides (Lartigue *et al*., 2009). Cette approche requiert trois étapes : (i) le clonage du génome du mollicute d'intérêt (génome donneur) dans la levure *S. cerevisiae*, (ii) la modification de ce génome grâce aux outils génétiques disponibles chez la levure puis (iii) la transplantation du génome modifié, de la levure vers une bactérie receveuse de façon à produire un mollicute mutant dont le génotype et le phénotype correspondent au génome modifié. Nous avons donc entrepris le clonage du génome entier de la souche type PG21 de *M. hominis* dans la levure par la méthode du TAR-cloning (Larionov *et al.,* 1996). Après avoir vérifié la stabilité du génome dans son hôte, il a été modifié par l'outil d'édition de gènes CRISPR/Cas9, disponible chez la levure (DiCarlo *et al*., 2013; Tsarmpopoulos *et al.,* 2016). Dans le temps imparti, l'étape de transplantation des génomes *M. hominis* clonés et modifiés n'a pas été réalisée, car ce protocole de transplantation de génome entier n'est pas disponible pour cette espèce.

En parallèle du clonage et de la modification du génome de *M. hominis* dans la levure, et dans l'optique de développer à terme une méthode de transplantation de génomes entiers, la deuxième grande partie de mon travail de thèse a consisté à créer un protocole permettant d'introduire de façon artificielle de petites molécules d'ADN chez *M. hominis*. De très nombreuses expériences ont été réalisées par la méthode « essais-erreurs » et ont finalement abouti à la mise en place d'une technique de transformation reproductible utilisant le PEG. Plusieurs mutants d'intérêt ont été générés et caractérisés sur le plan génotypique et phénotypique.

Clonage du génome de *M. hominis* dans la levure. Le génome entier de *M. hominis* PG21 (665 kb) a été cloné dans *S. cerevisiae*. La souche PG21 a été sélectionnée dû à son statut de souche type de *M. hominis* et du fait qu'elle possède le plus petit génome décrit chez *M. hominis* (Pereyre *et al*., 2009). Ce génome se rajoute aux autres génomes de mycoplasmes clonés dans

la levure (Gibson *et al.,* 2008; Lartigue *et al*., 2009; Benders *et al*., 2010; Karas *et al*., 2012; Baby *et al*., 2017). La plupart des mollicutes utilisent un code génétique différent du code génétique universel dans lequel le codon stop UGA code le tryptophane. Cette propriété intrinsèque aux génomes de mycoplasmes pourrait expliquer en partie la facilité avec laquelle ces génomes sont clonés et maintenus de façon stable dans la levure. Si des gènes sont correctement transcrits, il est probable que les protéines correspondantes soient tronquées. Cette hypothèse a été confirmée lors du clonage dans la levure du génome de *A. laidlawii*, qui utilise le code génétique universel. Le clonage de son génome n'a été possible qu'après suppression d'un gène codant une endonucléase toxique pour cet hôte (Karas *et al*., 2012). De plus, les machineries et signaux de transcription et traduction eucaryotes et procaryotes étant différents, le génome bactérien cloné a peu de chance d'être exprimé et donc d'être létal pour la levure, favorisant son maintien au sein de cet organisme. Ceci a pu être confirmé dans une étude récente dans laquelle l'impact de la présence du génome de *M. florum* sur le cycle cellulaire de la levure a été évaluée (Baby *et al*., 2018). Il a été montré que ce génome bactérien n'affectait pas de manière significative le cycle cellulaire de la levure malgré quelques différences au niveau de certaines phases du cycle. Les données de transcriptomique résultant de ces travaux ont démontré que les ARN messagers produits à partir du génome bactérien étaient peu nombreux dans la levure et la machinerie de transcription de cet organisme ne reconnaissait pas les promoteurs bactériens puisque les ARNm observés étaient produits à partir de phénomènes de transcription aléatoires (Baby *et al*., 2018).

Stabilité du génome cloné dans la levure. La suite de mes travaux a eu pour but de vérifier la stabilité du génome cloné de *M. hominis* dans la levure. Il a été montré que les plasmides centromériques sont correctement maintenus dans leurs hôtes au cours du temps (Tagwerker *et al*., 2012 ; Baby *et al*. 2018). Les données obtenues sur *M. hominis* contredisent ces résultats puisque nous avons démontré que la taille du génome de *M. hominis* se réduisait au fur et à mesure des passages. La divergence de résultats peut provenir du fait que la stabilité avait seulement été évaluée à peu de passages et non pas après un grand nombre de passages comme cela a été fait dans nos travaux. Au cours de nos expériences, les clones de levure possédant le génome entier de *M. hominis* ont été propagés en milieu sélectif durant 30 passages, ce qui correspond à environ 180 générations. Les résultats ont montré des pertes de fragments de génomes à partir du dixième passage. Les analyses ont mis en évidence des mélanges de populations au sein d'un même passage, avec des levures portant des génomes de tailles variables. Les deux clones de levures testés ont également montré une évolution différente en

fonction du temps. Pour le clone B3-2, aucun génome intègre n'a été retrouvé au-delà du passage 20, alors que pour le clone B3-4, le génome complet n'est plus visible au passage 30. Il est intéressant d'observer qu'au fur et à mesure des passages, les levures abritant un génome entier disparaissent pour laisser place à des levures hébergeant des génomes de plus en plus réduits. Ce comportement peut s'expliquer par le fait que le maintien de ces génomes a un coût énergétique pour la cellule. De plus excepté pour les éléments, ces génomes entiers ne confèrent aucun avantage à leurs hôtes. Des analyses de PCR multiplex ont permis de mettre en évidence les fragments perdus et les fragments maintenus. Cela ne se fait pas de manière aléatoire puisque des zones du génome semblent préférentiellement éliminées. Il a été montré que pour être propagé de façon stable, un génome bactérien doit contenir un nombre approprié d'origines de réplication de levure, les séquences ARS (Tagwerker *et al*., 2012). La recherche de motif « ARS-like », correspondant à la séquence consensus de 11 nt « (A/T)TTTA (T/C)(A/G)TTT(A/T) » a indiqué la présence de 155 séquences ARS autour du génome de *M. hominis* (665 kb), soit une séquence ARS tous le 4 à 5 kb. Pour que les génomes soient considérés comme stables, il faut une séquence ARS tous les 150 kb (Noskov *et al.*, 2012). L'instabilité du génome cloné ne provient donc probablement pas du manque de séquence ARS. Les génomes de mycoplasmes sont riches en AT, entrainant l'apparition de multiples séquences répétées (Rocha and Blanchard, 2002). L'analyse des séquences répétées en tandem ainsi que de larges répétitions (plus de 100 nucléotides) autour du génome a montré une concordance entre ces zones de répétitions et les fragments préférentiellement perdus. Ce contexte génomique pourrait expliquer l'instabilité de ce génome cloné dans la levure. En effet, la présence de séquences répétées chez un hôte possédant une machinerie de réparation de l'ADN efficace, combiné au fait que dans la plupart des cas le génome de mycoplasme ne sont pas exprimés dans la levure, favorise certainement l'excision et la perte de larges fragments et participe à l'apparition de génomes réduits. De nombreux génomes bactériens sont clonés chez la levure (Karas *et al*., 2015) et notre étude a démontré la nécessité de contrôler l'intégrité de ces génomes à chaque étape expérimentale, ainsi que de travailler avec des clones de levures aux passages les plus précoces possibles.

Modification du génome cloné dans la levure. Par la suite, des clones de levure obtenus au deuxième passage portant le génome de *M. hominis* ont été modifiés par la technique CRISPR/Cas9. Le gène cible *vaa*, codant une adhésine majeure de *M. hominis* (Henrich *et al*., 1996) et potentiellement impliquée dans la pathogénicité de cet organisme, a été supprimé des génomes clonés. Ces ciseaux moléculaires, récemment découverts, mais déjà largement utilisés

(Ishino *et al*., 2018), ont été adaptés pour modifier la levure (DiCarlo *et al.,* 2013), puis pour modifier des génomes bactériens clonés chez la levure (Tsarmpopoulos *et al*., 2016). L'analyse de la séquence d'ADN du gène *vaa* a permis d'obtenir deux ARN guides grâce à des prédictions bio-informatiques (http://crispr.dfci.harvard.edu/SSC/). Ces deux ARN guides autoriseraient le ciblage correct de notre gène par l'endonucléase Cas9. En pratique, un seul des deux ARN guide s'est avéré efficace, indiquant la nécessité d'en dessiner plusieurs à tester lors des expériences, ou bien de tester leur fonctionnalité en amont en incubant le gène cloné dans un plasmide, les ARN guides, ainsi que la Cas9 *in vitro*, afin de vérifier la coupure correcte du double brin. Grâce à ce système d'édition, 13 transformants B3-4 Δ*vaa* ont pu être confirmés par PCR simplex, multiplex, séquençage du locus et PFGE. Au cours des différentes analyses, des transformants inattendus ayant une version tronquée du gène *vaa* ont été obtenus. Le locus *vaa* a été séquencé et comparé au type sauvage. Cette analyse a permis de mettre en évidence la présence d'une répétition de 34 nt dans le gène *vaa* qui après coupure par la Cas9, pouvait induire dans certains clones des évènements de recombinaisons intramoléculaires. L'analyse des transformants a montré trois profils en proportions égales : une suppression totale du gène, une recombinaison intra-génique entrainant la formation d'un gène tronqué, ou bien une séquence de type sauvage. Le dernier profil peut s'expliquer par le fait que le complexe Cas9/gRNA ne coupe pas sa cible, ou bien par la mise en jeu du mécanisme de NHEJ qui crée seulement une mutation ponctuelle dans le gène ou aucune mutation. Bien que les transformants les plus intéressants soient ceux possédant un génome dépourvu du gène *vaa*, nous envisageons de transplanter les génomes partiellement modifiés. Avant transplantation, les génomes modifiés seront séquencés entièrement afin de vérifier l'absence de mutation hors-cible, causées par des coupures non spécifiques de la Cas9.

Analyse des SRM chez *M. hominis*. Les SRM sont connus pour constituer une barrière à l'entrée d'ADN étranger dans la cellule. Les premières observations ont montré un nombre moins important ou moins diversifié de SRM chez des mycoplasmes transformables comme *M. genitalium* ou *M. arthritidis*, que chez *M. hominis*. Ces données peuvent expliquer notre difficulté à transformer *M. hominis*. Des comparaisons réalisées entre 20 génomes de *M. hominis* ont permis de mettre en avant des profils variables d'une souche à l'autre. De façon générale, tous les génomes de *M. hominis* possèdent de nombreux SRM (quatre à neuf SRM par génome) et de type divers (type I, de type II et de type III et/ou IV), (Cf tableau 1, chapitre 2). La présence de tant de SRM chez cette bactérie minimale est surprenante puisqu'il a été démontré qu'ils ne sont pas essentiels chez les bactéries. En revanche, ils peuvent avoir un rôle

dans le transfert et l'intégration de fragments d'ADN (Vasu and Nagaraja, 2013), ce qui expliquerait la grande plasticité des génomes de *M. hominis* et des mycoplasmes (Rocha and Blanchard, 2002). Ces données de comparaisons de SRM n'ont toutefois pas permis de sélectionner une souche de *M. hominis* qui semblait plus apte à être transformée.

Développement du protocole de transformation de *M. hominis*. Afin de concevoir le protocole de transformation de *M. hominis*, de nombreux paramètres ont été testés et combinés. La méthode a été adaptée des protocoles de transformation de *M. arthritidis*, mycoplasme le plus proche phylogénétiquement de *M. hominis* et transformable (Voelker and Dybvig, 1996), et de celui de *U. parvum*, espèce partageant la même niche et difficilement transformable (Aboklaish *et al*., 2014) .

Le succès de l'expérience dépend tout d'abord de la souche bactérienne. Quinze souches différentes ont été évaluées, et malgré plusieurs essais sur la souche de référence PG21, aucun résultat positif n'a été obtenu. Seulement trois souches, la souche de référence M132 et les souches cliniques 4016 et 5012 ont été transformées avec succès. La différence d'efficacité de transformation entre les différentes souches (de $3{,}8.10^{-10}$ à $2{,}3.10^{-9}$ transformants/UFC/µg de plasmide) ne peut pas être expliquée simplement par la nature et la diversité des SRM puisque ces trois souches possèdent entre six et huit systèmes (cf Tableau 1, chapitre 2). De plus, la souche 4235 qui possède seulement quatre systèmes n'a pas pu être transformée. Ces observations suggèrent que la capacité de *M. hominis* à incorporer l'ADN étranger n'est pas seulement influencée par les SRM. En effet, il existe d'autres systèmes contrôlant l'entrée d'ADN exogène chez les bactéries tels que les systèmes CRISPR/Cas, abi, BREX ou DISARM (Doron *et al.,* 2017). Bien que ces systèmes ne soient pas décrits chez les mycoplasmes, peut être existe-t-il des systèmes équivalents empêchant l'entrée d'ADN chez *M. hominis*. De plus, les analyses effectuées sur les SRM ne restent que des prédictions informatiques et ne donnent en aucun cas des informations sur la fonctionnalité de ceux-ci. Sont-ils tous exprimés, *in vivo* et *in vitro* ? De plus, certains systèmes sont présents en plusieurs copies chez certaines souches. Pourquoi ? Leur nombre impacterait-il le degré d'action de ces SRM ? Le SRM de type IV McrBC (Sutherland *et al.*, 1992; Panne *et al.*, 2001) est prédit chez *M. hominis* M132 (transformable) et *M. hominis* 3364 (non transformable). Pour M132, la transformation ne fonctionne que si l'ADN plasmidique est méthylé par la CpG méthyltransférase. Or les SRM de type IV ne sont actifs que sur les sites cibles méthylés. Ce résultat pourrait suggérer que même si le système est présent, il n'est peut-être pas fonctionnel, en tous cas dans nos conditions de laboratoire. Il serait intéressant d'étudier l'état de méthylation de différents génomes de

M. hominis afin de vérifier s'ils sont fortement méthylés ou non, ceci permettrait également de vérifier la fonctionnalité de certains SRM. Pour la suite des expérimentations, nous avons choisi la souche de référence M132 comme modèle d'étude.

Concernant la protection de l'ADN à transformer dans *M. hominis*, la méthylation est un critère important. En effet, les tentatives de transformation avec des plasmides non méthylés se sont soldées par des échecs, confirmant la nécessité de contourner les SRM. La méthylation des îlots CpG par une méthylase commerciale a été la seule méthode donnant des résultats positifs. La méthylation des séquences GC s'est montrée inefficace pour transformer *M. hominis*. L'optimisation du protocole de transformation pourrait être réalisée en trouvant un moyen de lutter efficacement contre ces SRM, puisque la méthylation des îlots CpG ne permet de protéger seulement que contre certains systèmes. Le moyen le plus approprié serait de développer des extraits protéiques permettant une méthylation physiologique du plasmide donneur, comme cela a déjà été fait chez d'autres mycoplasmes (Lartigue *et al*., 2009). L'obtention d'extraits protéiques fonctionnels est actuellement en cours d'élaboration au laboratoire.

Une autre étape importante a été la détermination de la phase de croissance des cellules à transformer. En effet la transformation ne fonctionnait jusqu'à présent qu'en mélangeant des cultures à différentes phases de croissance (précoce, milieu de phase exponentielle, phase tardive), comme cela a été décrit chez *U. parvum* (Aboklaish *et al*., 2014). La plupart des protocoles de transformation publiés n'utilisent qu'une seule phase de croissance, spécifique de chaque espèce (Voelker and Dybvig, 1996; Lartigue *et al.,* 2003; Washburn *et al*., 2003; Whetzel *et al*., 2003; Sharma *et al*., 2015). De manière à standardiser et à contrôler précisément la croissance de *M. hominis*, une courbe de croissance a été établie au début de mes travaux de thèse (**Figure S1, chapitre 2**). Grâce à l'utilisation de ces données et à l'optimisation du protocole, de nouveaux essais ont permis d'obtenir des mutants de *M. hominis* en utilisant une seule culture, qui semblerait correspondre à un temps de croissance précoce, soit le début de la phase exponentielle (données non montrées).

Une autre variable importante à considérer lors de l'élaboration du protocole est la nature du tampon de lavage des cellules. Effectivement, le tampon de lavage T-Buffer utilisé pour la transformation de *M. arthritidis* (Voelker and Dybvig, 1996) s'est révélé plus efficace que les tampons communément utilisés pour laver les cellules comme le PBS 1X ou le TrisHCl 10 mM pH6.5-sucrose 0,5 M. Le T Buffer est une solution de TrisHCl 10 mM à pH 6,5, ce qui peut paraitre surprenant pour une espèce comme *M. hominis*, qui tout comme *M. arthritidis,*

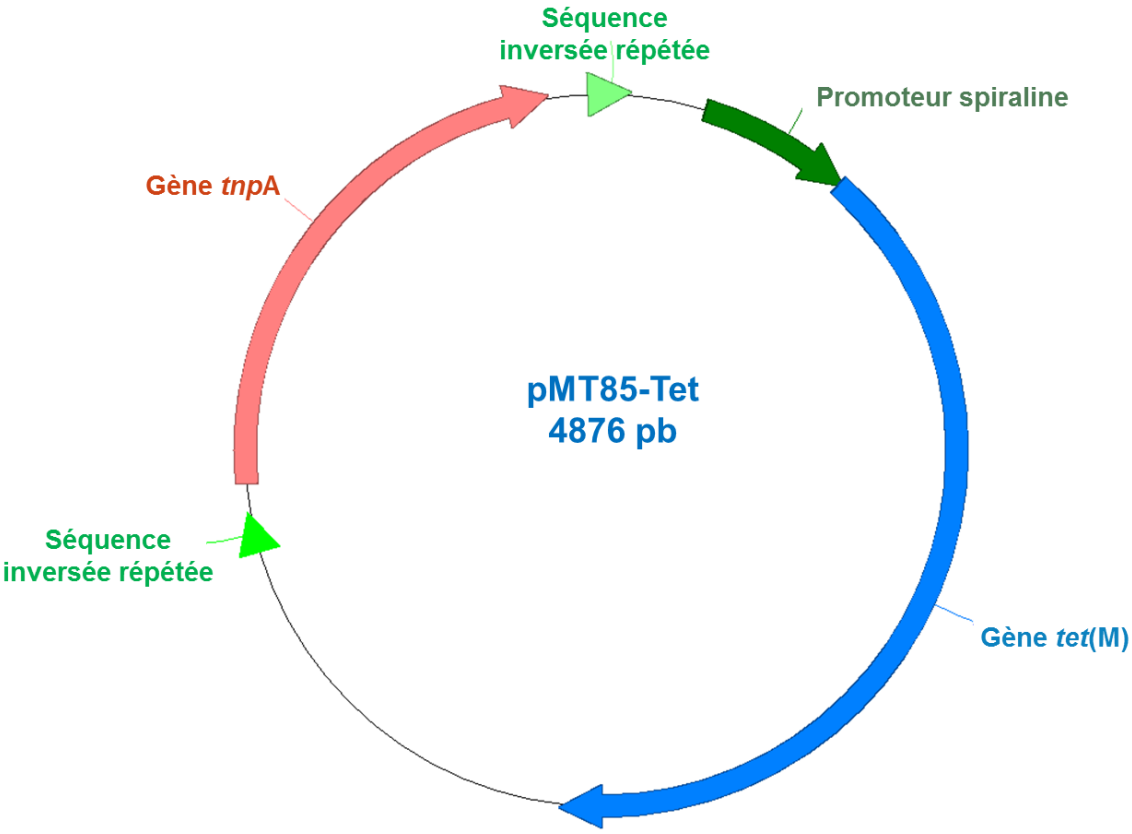


Figure 12. Représentation du vecteur pMT85-Tet.

métabolise l'arginine, et se multiplie lorsque le milieu est légèrement basique. Un tampon Tris pH 7,6, avec un pH plus basique a été tenté, sans succès.

Un des facteurs les plus critiques concerne la nature du PEG. La méthode de transformation de *M. hominis* développée ici utilise le PEG comme facteur déstabilisant les membranes cellulaires et non pas l'électroporation ; en effet notre objectif à long terme est de développer un protocole de transplantation de génomes entiers chez *M. hominis* et à ce jour, seuls les protocoles au PEG s'avèrent efficaces pour transplanter des génomes. À noter que l'électroporation avait été testée sans succès au laboratoire avant mon arrivée. Le poids moléculaire du PEG, sa concentration, le temps de contact PEG/cellules/plasmide, sont des facteurs extrêmement critiques. La méthode fonctionne uniquement avec du PEG_{8000}, relativement concentré (40 à 60 %) et avec un temps de contact dépassant les 10 minutes (jusqu'à 1h). Le poids moléculaire ainsi que la concentration qui sont utilisés dans le protocole, sont relativement semblables à ce qui est fait chez d'autres mycoplasmes. Le temps de contact est en revanche très long comparé aux protocoles décrits dans la littérature (souvent inférieur à deux minutes). Le PEG est régulièrement décrit comme toxique pour les cellules, cependant nous n'avons pas observé une mortalité plus importante des cellules lors de nos expériences (données non montrées).

Le protocole de transformation de *M. hominis* a été conçu à partir du plasmide pMT85-Tet (**Figure 12**). Ce vecteur porte un transposon au sein duquel sont présents le promoteur constitutif de la spiraline et le gène *tet*(M), conférant la résistance à la tétracycline. Le pMT85-Tet, dérivant du pMT85 décrit par Zimmerman *et al*. dans lequel le transposon entraîne une résistance à la gentamicine, porte le gène codant la transposase à l'extérieur du transposon afin de favoriser une intégration stable de celui-ci dans le génome (Pour-El *et al*., 2002; Zimmerman and Herrmann, 2005). La transformation du pMT85 originel a également été tentée, sans succès. En effet, en milieu sélectif à la gentamicine, des mutants spontanés ont été observés sur les témoins négatifs de transformation, rendant inenvisageable l'utilisation de ce vecteur. Des sélections au chloramphénicol ou à la puromycine ont également été envisagées, mais *M. hominis* présente des CMI élevées à ces antibiotiques, les rendant inappropriés pour la transformation. Le manque de marqueurs de sélection est réellement problématique dans le développement de cette technique chez *M. hominis*. L'utilisation d'un autre marqueur de sélection pourrait permettre de re-transformer une souche possédant déjà un gène *tet*(M), qui semble plus propice à la transformation et de l'utiliser comme organisme modèle. Le récent marqueur spectinomycine/streptomycine utilisé chez *M. florum* (Matteau *et al*., 2017) pourrait

être une alternative intéressante et mériterait d'être testé, même si ces deux antibiotiques appartiennent à la même classe que la gentamicine.

Durant ma thèse, la détermination des origines de réplication de *M. hominis* PG21 et M132 et leur clonage a permis la création de plusieurs versions de plasmides réplicatifs (plasmide *oriC*) de *M. hominis.* Ces plasmides n'ont pas donné de résultats probants, mais mériteraient d'être réessayés en utilisant les nouvelles conditions. Ces plasmides *ori*C sont utiles pour envisager de la mutagenèse ciblée et sont développés ou en cours de développement chez un assez grand nombre de mycoplasmes (Ye *et al*., 1994; Cordova *et al.,* 2002; Lartigue *et al*., 2003; Maglennon *et al*., 2013; Sharma *et a*l., 2015; Ishag *et al*., 2017; Matteau *et al*., 2017). Enfin, les prochains travaux envisagés pour optimiser le vecteur concernent : (i) des changements de promoteurs en amont du déterminant *tet*(M), (ii) la production d'une version du gène *tet*(M) s'appuyant sur l'usage des codons de *M. hominis* et (iii) l'utilisation de cassette de résistance isolée de souches cliniques ayant acquis naturellement un haut niveau de résistance à la tétracycline.

En combinant de nombreux paramètres, un protocole de transformation reproductible a été obtenu avec succès pour *M. hominis*. Des efficacités faibles de transformation allant jusqu'à $2{,}3.10^{-9}$ transformants/UFC/µg de plasmide sont observées à l'heure actuelle mais les facteurs discutés précédemment pourraient permettre d'améliorer ces efficacités.

Caractérisation de mutants de *M. hominis*. Cette technique de mutagenèse aléatoire nous a permis d'obtenir des mutants de *M. hominis*. Parmi ceux-ci, le mutant 28-2 possède le transposon dans un gène potentiellement impliqué dans l'adhésion, puisqu'il code le précurseur de la P75, protéine d'adhésion majeure de *M. hominis* (Henrich *et a*l., 2017; Roachford *et al.,* 2017). Après avoir vérifié une différence d'expression du gène par RT-PCR, l'implication de la protéine dans l'adhésion de *M. hominis* a été examinée par un test phénotypique d'adhésion à des cellules HeLa, en comparant la souche mutée à la souche sauvage M132. Les résultats n'ont pas montré de différences d'adhésion entre les deux souches. Quelques hypothèses peuvent être envisagées, comme l'absence de modification de la fonction ou de la production de la protéine ou le manque de sensibilité du test d'adhésion. De plus, de nombreux gènes codant des lipoprotéines impliquées dans l'adhésion chez *M. hominis* sont prédits, suggérant que la modification d'une seule de ces protéines n'est pas suffisante pour altérer la capacité de *M. hominis* à adhérer aux cellules-hôtes (cf discussion chapitre 2). L'optimisation du test d'adhésion ou l'obtention d'un mutant avec plusieurs mutations dans des gènes impliqués dans l'adhésion permettraient de confirmer ces hypothèses.

La transformation de *M. hominis* nous a permis d'observer d'autres phénomènes intéressants. En effet, au moins six transformants présentant un profil atypique après séquençage Sanger des sites d'insertion du transposon ont été obtenus. Deux de ces transformants, 28-1 et 28-2, ont été séquencés entièrement avec les technologies NGS, permettant de montrer la présence de multiples insertions du transposon dans le génome de *M. hominis*. Pour le mutant 28-1, cinq copies du transposon ont été retrouvées, dont trois étaient le plasmide pMT85-Tet entier. De plus, une large inversion génomique d'un fragment d'environ 300 kb a été observée au niveau du gène codant la tyrosine recombinase XerC. Cette recombinase est connue pour être impliquée dans l'intégration et la recombinaison de l'ADN étranger au sein des bactéries (Das *et al*., 2013; Midonet and Barre, 2014; Castillo *et al*., 2017). L'intégration du transposon après transformation a été retrouvée trois fois dans ce gène (sur 24 mutants analysés, soit chez 12,5 % des transformants). Cela pourrait signifier que cette région génomique est soit un « hotspot » de l'intégration d'ADN chez *M. hominis* ou bien que XerC peut influencer l'intégration du transposon dans cette région. Pour les autres mutants, l'insertion s'est faite de manière aléatoire. Concernant le transformant 29-1, trois copies du transposon sont présentes, dont deux se suivent et sont encadrées par une région de 9 kb parfaitement dupliquée. Etonnamment, les mutants 28-1 et 29-1 ne présentent pas de difficultés de croissance ou d'aspect particulier sur gélose. De telles insertions multiples de transposons ont déjà été observées lors de l'insertion des transposons Tn*4001* et Tn*916* (Dybvig and Alderete, 1988; Mahairas and Minion, 1989; Foissac *et al.,* 1997; Ruffin *et al*., 2000; Pour-El *et al*., 2002; Chopra-Dewasthaly *et al*., 2005; Aboklaish *et al*., 2014). Le plasposon pMT85 a été optimisé en enlevant le gène *tnp* codant la transposase du transposon dérivé du Tn*4001*, afin de limiter des problèmes d'instabilité ou de multiples insertions (Pour-El *et al*., 2002 ; Zimmerman and Herrmann, 2005). Ces résultats sont donc assez surprenants. Les perspectives concernant ce travail sont multiples. D'une part, nous souhaiterions confirmer les insertions multiples chez quatre autres mutants présentant un profil particulier après séquençage Sanger et tenter de mettre en évidence d'autres phénomènes de réarrangement génomique chez ces mutants. Nous aimerions également isoler d'autres mutants de ce type afin de comprendre les phénomènes sous-jacents. D'autre part, des mutants n'ayant intégré qu'une seule copie du transposon dans un gène non impliqué dans la croissance, la division cellulaire ou la morphologie, montrent une croissance ralentie. Nous souhaiterions mieux caractériser ces mutants, en séquençant leur génome et essayer de comprendre cet effet sur la croissance.

Nous sommes désormais capables de créer des mutants de *M. hominis* génétiquement modifiés par mutagenèse aléatoire par transposition. Certes, le protocole doit être optimisé afin

d'obtenir un plus grand nombre de mutants par expérience. Mais après deux décennies d'efforts, c'est la première fois qu'un protocole de transformation reproductible est mis en place et disponible pour *M. hominis*. C'est un grand pas pour le développement de la génomique fonctionnelle chez cette espèce mais également vers le développement de la méthode de la transplantation de génome qui permettrait à terme de réaliser de la mutagenèse ciblée. La mutagenèse aléatoire peut poser certains problèmes comme lorsque le transposon s'intégre dans des zones « hotspot » (comme ici le gène *xerC*), mais elle reste à ce jour le meilleur outil de modification génétique chez *M. hominis* permettant de vérifier la fonction de certains facteurs. Par cette technique, seuls des mutants viables, possédant des mutations dans des gènes non essentiels peuvent être obtenus.

En conclusion, durant nos travaux, le clonage du génome de *M. hominis* PG21 a été réalisé dans la levure, sa stabilité a été vérifiée et le gène *vaa* a été correctement supprimé du génome bactérien. En parallèle, une méthode reproductible de transformation de *M. hominis* a été mise au point, permettant d'envisager la possibilité de transplanter un jour des génomes modifiés afin de posséder une technique de modification génétique ciblée et efficace pour ce pathogène. Cette technique permettra de mieux comprendre la pathogénicité de cette bactérie minimale ainsi que son métabolisme particulier, reposant sur l'arginine.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Aboklaish, A. F., Dordet-Frisoni, E., Citti, C., Toleman, M. A., Glass, J. I., and Spiller, O. B. (2014). Random insertion and gene disruption via transposon mutagenesis of *Ureaplasma parvum* using a mini-transposon plasmid. *Int J Med Microbiol* 304**,** 1218-1225.

Abudayyeh, O. O., Gootenberg, J. S., Essletzbichler, P., Han, S., Joung, J., Belanto, J. J., Verdine, V., Cox, D. B. T., Kellner, M. J., Regev, A., Lander, E. S., Voytas, D. F., Ting, A. Y., and Zhang, F. (2017). RNA targeting with CRISPR-Cas13. *Nature* 550**,** 280-284.

Adli, M. (2018). The CRISPR tool kit for genome editing and beyond. *Nat Commun* 9**,** 1911.

Ajikumar, P. K., Xiao, W. H., Tyo, K. E., Wang, Y., Simeon, F., Leonard, E., Mucha, O., Phon, T. H., Pfeifer, B., and Stephanopoulos, G. (2010). Isoprenoid pathway optimization for Taxol precursor overproduction in *Escherichia coli*. *Science* 330**,** 70-74.

Aleksandrova, N. M., Bevova, M. R., and Govorun, V. M. (2000). Transformation of *Mycoplasma hominis* by plasmid pAM120 using electroporation. *Genetika* 36**,** 309-313.

Algire, M. A., Lartigue, C., Thomas, D. W., Assad-Garcia, N., Glass, J. I., and Merryman, C. (2009). New selectable marker for manipulating the simple genomes of *Mycoplasma* species. *Antimicrob Agents Chemother* 53**,** 4429-4432.

Algire, M. A., Montague, M. G., Vashee, S., Lartigue, C., and Merryman, C. (2012). A Type III restriction-modification system in *Mycoplasma mycoides subsp. capri*. *Open Biol* 2**,** 120115.

Allam, A. B., Reyes, L., Assad-Garcia, N., Glass, J. I., and Brown, M. B. (2010). Enhancement of targeted homologous recombination in *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri* by inclusion of heterologous recA. *Appl Environ Microbiol* 76**,** 6951-6954.

Allen-Daniels, M. J., Serrano, M. G., Pflugner, L. P., Fettweis, J. M., Prestosa, M. A., Koparde, V. N., Brooks, J. P., Strauss, J. F., 3rd, Romero, R., Chaiworapongsa, T., Eschenbach, D. A., Buck, G. A., and Jefferson, K. K. (2015). Identification of a gene in *Mycoplasma hominis* associated with preterm birth and microbial burden in intraamniotic infection. *Am J Obstet Gynecol* 212**,** 779 e771-779 e713.

Almagor, M., Kahane, I., Gilon, C., and Yatziv, S. (1986). Protective effects of the glutathione redox cycle and vitamin E on cultured fibroblasts infected by *Mycoplasma pneumoniae*. *Infect Immun* 52**,** 240-244.

Arfi, Y., Minder, L., Di Primo, C., Le Roy, A., Ebel, C., Coquet, L., Claverol, S., Vashee, S., Jores, J., Blanchard, A., and Sirand-Pugnet, P. (2016). MIB-MIP is a mycoplasma

system that captures and cleaves immunoglobulin G. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113**,** 5406-5411.

Baba, T., Ara, T., Hasegawa, M., Takai, Y., Okumura, Y., Baba, M., Datsenko, K. A., Tomita, M., Wanner, B. L., and Mori, H. (2006). Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Mol Syst Biol* 2**,** 2006.0008.

Baby, V., Labroussaa, F., Brodeur, J., Matteau, D., Gourgues, G., Lartigue, C., and Rodrigue, S. (2018a). Cloning and transplantation of the *Mesoplasma florum* genome. *ACS Synth Biol* 7**,** 209-217.

Baby, V., Lachance, J. C., Gagnon, J., Lucier, J. F., Matteau, D., Knight, T., and Rodrigue, S. (2018b). Inferring the minimal genome of *Mesoplasma florum* by comparative genomics and transposon mutagenesis. *mSystems* 3.

Baczynska, A., Svenstrup, H. F., Fedder, J., Birkelund, S., and Christiansen, G. (2004). Development of real-time PCR for detection of *Mycoplasma hominis*. *BMC Microbiol.* 4**,** 35.

Baeshen, M. N., Al-Hejin, A. M., Bora, R. S., Ahmed, M. M., Ramadan, H. A., Saini, K. S., Baeshen, N. A., and Redwan, E. M. (2015). Production of Biopharmaceuticals in *E. coli*: Current Scenario and Future Perspectives. *J Microbiol Biotechnol* 25**,** 953-962.

Bandyopadhyay, P. K., Studier, F. W., Hamilton, D. L., and Yuan, R. (1985). Inhibition of the type I restriction-modification enzymes EcoB and EcoK by the gene 0.3 protein of bacteriophage T7. *J Mol Biol* 182**,** 567-578.

Barrangou, R. (2015). Diversity of CRISPR-Cas immune systems and molecular machines. *Genome Biol* 16**,** 247.

Barrangou, R., Fremaux, C., Deveau, H., Richards, M., Boyaval, P., Moineau, S., Romero, D. A., and Horvath, P. (2007). CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science* 315**,** 1709-1712.

Bébéar, C, Pereyre, S., and Quentin, R. (2015). Mycoplasmes, in *REMIC 5ème Edition*. (Paris, France: Société Française de Microbiologie), 559-565.

Bébéar, C., and Bébéar, Ch. (2017). Mycoplasmes. *EMC-Biologie médicale* 13(1):1-12.

Bébéar, C. M., and Bébéar, C. (2002). Antimycoplasmal agents, in *Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas.*, eds. S. Razin & R. Herrmann. (London: Kluwer Academic/Plenum Publishers), 545-566.

Bébéar, C. M., De Barbeyrac, B., Pereyre, S., Renaudin, H., Clerc, M., and Bébéar, C. (2008). Activity of moxifloxacin against the urogenital mycoplasmas *Ureaplasma* spp.,

Mycoplasma hominis and *Mycoplasma genitalium* and *Chlamydia trachomatis*. *Clin Microbiol Infect* 14**,** 801-805.

Bébéar, C.M. (2006). *Mycoplasma, Ureaplasma,* in *Antibiogramme,* eds. P. Courvalin, R. Leclercq & E. Bingen. (Paris: ESKA), 491-500.

Bébéar, C.M., and Kempf, I. (2005). Antimicrobial therapy and antimicrobial resistance, in *Mycoplasmas: Molecular Biology Pathogenicity and Strategies for Control,* eds. A. Blanchard & G.F. Browning. (Norfolk: Horizon bioscience), 535-568.

Benders, G. A., Noskov, V. N., Denisova, E. A., Lartigue, C., Gibson, D. G., Assad-Garcia, N., Chuang, R. Y., Carrera, W., Moodie, M., Algire, M. A., Phan, Q., Alperovich, N., Vashee, S., Merryman, C., Venter, J. C., Smith, H. O., Glass, J. I., and Hutchison, C. A., 3rd (2010). Cloning whole bacterial genomes in yeast. *Nucleic Acids Res.* 38**,** 2558-2569.

Beneyton, T., Krafft, D., Bednarz, C., Kleineberg, C., Woelfer, C., Ivanov, I., Vidakovic-Koch, T., Sundmacher, K., and Baret, J. C. (2018). Out-of-equilibrium microcompartments for the bottom-up integration of metabolic functions. *Nat Commun* 9**,** 2391.

Bergemann, A. D., Whitley, J. C., and Finch, L. R. (1989). Homology of mycoplasma plasmid pADB201 and staphylococcal plasmid pE194. *J Bacteriol* 171**,** 593-595.

Bickle, T. A. (2004). Restricting restriction. *Mol Microbiol* 51**,** 3-5.

Bikard, D., Jiang, W., Samai, P., Hochschild, A., Zhang, F., and Marraffini, L. A. (2013). Programmable repression and activation of bacterial gene expression using an engineered CRISPR-Cas system. *Nucleic Acids Res* 41**,** 7429-7437.

Blanchard, A. (1990). *Ureaplasma urealyticum* urease genes; use of a UGA tryptophan codon. *Mol Microbiol* 4**,** 669-676.

Blanchard, A., Yanez, A., Dybvig, K., Watson, H. L., Griffiths, G., and Cassell, G. H. (1993). Evaluation of intraspecies genetic variation within the 16S rRNA gene of *Mycoplasma hominis* and detection by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 31**,** 1358-1361.

Blattner, F. R., Plunkett, G., 3rd, Bloch, C. A., Perna, N. T., Burland, V., Riley, M., Collado-Vides, J., Glasner, J. D., Rode, C. K., Mayhew, G. F., Gregor, J., Davis, N. W., Kirkpatrick, H. A., Goeden, M. A., Rose, D. J., Mau, B., and Shao, Y. (1997). The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* 277**,** 1453-1462.

Blotz, C., Lartigue, C., Valverde Timana, Y., Ruiz, E., Paetzold, B., Busse, J., and Stulke, J. (2018). Development of a replicating plasmid based on the native oriC in Mycoplasma pneumoniae. *Microbiology* 164**,** 1372-1382.

Blotz, C., and Stulke, J. (2017). Glycerol metabolism and its implication in virulence in Mycoplasma. *FEMS Microbiol Rev* 41**,** 640-652.

Boesen, T., Emmersen, J., Baczynska, A., Birkelund, S., and Christiansen, G. (2004). The *vaa* locus of *Mycoplasma hominis* contains a divergent genetic islet encoding a putative membrane protein. *BMC Microbiol* 4**,** 37.

Boesen, T., Emmersen, J., Jensen, L. T., Ladefoged, S. A., Thorsen, P., Birkelund, S., and Christiansen, G. (1998). The *Mycoplasma hominis vaa* gene displays a mosaic gene structure. *Mol Microbiol* 29**,** 97-110.

Boutros, M., and Ahringer, J. (2008). The art and design of genetic screens: RNA interference. *Nat Rev Genet* 9**,** 554-566.

Breton, M., Duret, S., Danet, J. L., Dubrana, M. P., and Renaudin, J. (2010a). Sequences essential for transmission of *Spiroplasma citri* by its leafhopper vector, *Circulifer haematoceps*, revealed by plasmid curing and replacement based on incompatibility. *Appl Environ Microbiol* 76**,** 3198-3205.

Breton, M., Sagne, E., Duret, S., Beven, L., Citti, C., and Renaudin, J. (2010b). First report of a tetracycline-inducible gene expression system for mollicutes. *Microbiology* 156**,** 198-205.

Breton, M., Tardy, F., Dordet-Frisoni, E., Sagne, E., Mick, V., Renaudin, J., Sirand-Pugnet, P., Citti, C., and Blanchard, A. (2012). Distribution and diversity of mycoplasma plasmids: lessons from cryptic genetic elements. *BMC Microbiol* 12**,** 257.

Brocchi, Marcelo, Vasconcelos, Ana Tereza Ribeiro De, and Zaha, Arnaldo (2007). Restriction-modification systems in *Mycoplasma* spp. *Genetics and Molecular Biology* 30**,** 236-244.

Brokowski, C., and Adli, M. (2018). CRISPR Ethics: Moral Considerations for Applications of a Powerful Tool. *J Mol Biol* Epub ahead of print.

Brooks, A. K., and Gaj, T. (2018). Innovations in CRISPR technology. *Curr Opin Biotechnol* 52**,** 95-101.

Burgos, R., Wood, G. E., Young, L., Glass, J. I., and Totten, P. A. (2012). RecA mediates MgpB and MgpC phase and antigenic variation in *Mycoplasma genitalium*, but plays a minor role in DNA repair. *Mol Microbiol* 85**,** 669-683.

Calcutt, M. J., and Foecking, M. F. (2015a). Analysis of the complete *Mycoplasma hominis* LBD-4 genome sequence reveals strain-variable prophage insertion and distinctive repeat-containing surface protein arrangements. *Genome Announc* 3.

Calcutt, M. J., and Foecking, M. F. (2015b). Complete genome sequence of *Mycoplasma hominis* strain Sprott (ATCC 33131), isolated from a patient with nongonococcal urethritis. *Genome Announc* 3.

Calero, P., and Nikel, P. I. (2018). Chasing bacterial chassis for metabolic engineering: a perspective review from classical to non-traditional microorganisms. *Microb Biotechnol* Epub ahead of print.

Calisto, B. M., Pich, O. Q., Pinol, J., Fita, I., Querol, E., and Carpena, X. (2005). Crystal structure of a putative type I restriction-modification S subunit from *Mycoplasma genitalium*. *J Mol Biol* 351**,** 749-762.

Campos, L.A. (2006). *Radium and the secret of life: A dissertation.* Harvard University.

Campos, Luis (2010). That was the synthetic biology that was, in *Synthetic Biology: the technoscience and its societal consequences,* eds. M. Schmidt, A. Kelle, A. Ganguli-Mitra & H. Vriend. (Dordrecht: Springer Netherlands), 5-21.

Cao, C. J., Wang, Y. F., Fang, D. M., and Hu, Y. (2018). Relation between mycoplasma infection and recurrent spontaneous abortion. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 22**,** 2207-2211.

Cao, J., Kapke, P. A., and Minion, F. C. (1994). Transformation of *Mycoplasma gallisepticum* with *Tn*916, *Tn*4001, and integrative plasmid vectors. *J Bacteriol* 176**,** 4459-4462.

Capoccia, R., Greub, G., and Baud, D. (2013). *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma hominis* and adverse pregnancy outcomes. *Curr Opin Infect Dis* 26**,** 231-240.

Carlson, D. F., Lancto, C. A., Zang, B., Kim, E. S., Walton, M., Oldeschulte, D., Seabury, C., Sonstegard, T. S., and Fahrenkrug, S. C. (2016). Production of hornless dairy cattle from genome-edited cell lines. *Nat Biotechnol* 34**,** 479-481.

Chandran, S., Noskov, V. N., Segall-Shapiro, T. H., Ma, L., Whiteis, C., Lartigue, C., Jores, J., Vashee, S., and Chuang, R. Y. (2014). TREC-IN: gene knock-in genetic tool for genomes cloned in yeast. *BMC Genomics* 15**,** 1180.

Chanock, R. M., Hayflick, L., and Barile, M. F. (1962). Growth on artificial medium of an agent associated with atypical pneumonia and its identification as a PPLO. *Proc Natl Acad Sci U S A* 48**,** 41-49.

Charlesworth, C.T., Deshpande, P. S., Dever, D. P., Dejene, B., Gomez-Ospina, N., Mantri, S., Pavel-Dinu, M., Camarena, J., Weinberg, K. I., and Porteus, M. H. (2018). Identification of pre-existing adaptive immunity to Cas9 proteins in humans. *BioRxiv, the preprint server for biology*.

Chen, B., Gilbert, L. A., Cimini, B. A., Schnitzbauer, J., Zhang, W., Li, G. W., Park, J., Blackburn, E. H., Weissman, J. S., Qi, L. S., and Huang, B. (2013). Dynamic imaging of genomic loci in living human cells by an optimized CRISPR/Cas system. *Cell* 155**,** 1479-1491.

Chen, B., Lee, H. L., Heng, Y. C., Chua, N., Teo, W. S., Choi, W. J., Leong, S. S. J., Foo, J. L., and Chang, M. W. (2018). Synthetic biology toolkits and applications in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Adv* 36**,** 1870-1881.

Chew, W. L., Tabebordbar, M., Cheng, J. K., Mali, P., Wu, E. Y., Ng, A. H., Zhu, K., Wagers, A. J., and Church, G. M. (2016). A multifunctional AAV-CRISPR-Cas9 and its host response. *Nat Methods* 13**,** 868-874.

Chopin, M. C., Chopin, A., and Bidnenko, E. (2005). Phage abortive infection in *Lactococci*: variations on a theme. *Curr Opin Microbiol* 8**,** 473-479.

Chopra-Dewasthaly, R., Citti, C., Glew, M. D., Zimmermann, M., Rosengarten, R., and Jechlinger, W. (2008). Phase-locked mutants of *Mycoplasma agalactiae*: defining the molecular switch of high-frequency Vpma antigenic variation. *Mol Microbiol* 67**,** 1196-1210.

Chopra-Dewasthaly, R., Marenda, M., Rosengarten, R., Jechlinger, W., and Citti, C. (2005a). Construction of the first shuttle vectors for gene cloning and homologous recombination in *Mycoplasma agalactiae*. *FEMS Microbiol Lett* 253**,** 89-94.

Chopra-Dewasthaly, R., Zimmermann, M., Rosengarten, R., and Citti, C. (2005b). First steps towards the genetic manipulation of *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma bovis* using the transposon *Tn*4001mod. *Int J Med Microbiol* 294**,** 447-453.

Chow, R. D., Guzman, C. D., Wang, G., Schmidt, F., Youngblood, M. W., Ye, L., Errami, Y., Dong, M. B., Martinez, M. A., Zhang, S., Renauer, P., Bilguvar, K., Gunel, M., Sharp, P. A., Zhang, F., Platt, R. J., and Chen, S. (2017). AAV-mediated direct in vivo CRISPR screen identifies functional suppressors in glioblastoma. *Nat Neurosci* 20**,** 1329-1341.

Christen, B., Abeliuk, E., Collier, J. M., Kalogeraki, V. S., Passarelli, B., Coller, J. A., Fero, M. J., Mcadams, H. H., and Shapiro, L. (2011). The essential genome of a bacterium. *Mol Syst Biol* 7**,** 528.

Christian, M., Cermak, T., Doyle, E. L., Schmidt, C., Zhang, F., Hummel, A., Bogdanove, A. J., and Voytas, D. F. (2010). Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases. *Genetics* 186**,** 757-761.

Church, G. M., Elowitz, M. B., Smolke, C. D., Voigt, C. A., and Weiss, R. (2014). Realizing the potential of synthetic biology. *Nat Rev Mol Cell Biol* 15**,** 289-294.

Citti, C., and Blanchard, A. (2013). Mycoplasmas and their host: emerging and re-emerging minimal pathogens. *Trends Microbiol* 21**,** 196-203.

Citti, C., Dordet-Frisoni, E., Nouvel, L. X., Kuo, C. H., and Baranowski, E. (2018). Horizontal gene transfers in mycoplasmas (*Mollicutes*). *Curr Issues Mol Biol* 29**,** 3-22.

Citti, C., Nouvel, L. X., and Baranowski, E. (2010). Phase and antigenic variation in mycoplasmas. *Future Microbiol* 5**,** 1073-1085.

Clewell, D. B., and Gawron-Burke, C. (1986). Conjugative transposons and the dissemination of antibiotic resistance in streptococci. *Annu Rev Microbiol* 40**,** 635-659.

Cobb, R. E., Wang, Y., and Zhao, H. (2015). High-efficiency multiplex genome editing of *Streptomyces species* using an engineered CRISPR/Cas system. *ACS Synth Biol* 4**,** 723-728.

Cong, L., Ran, F. A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., Hsu, P. D., Wu, X., Jiang, W., Marraffini, L. A., and Zhang, F. (2013). Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science* 339**,** 819-823.

Cordova, C. M., Hoeltgebaum, D. L., Machado, L. D., and Santos, L. D. (2016). Molecular biology of mycoplasmas: from the minimum cell concept to the artificial cell. *An Acad Bras Cienc* 88 Suppl 1**,** 599-607.

Cordova, C. M., Lartigue, C., Sirand-Pugnet, P., Renaudin, J., Cunha, R. A., and Blanchard, A. (2002). Identification of the origin of replication of the *Mycoplasma pulmonis* chromosome and its use in *ori*C replicative plasmids. *J Bacteriol* 184**,** 5426-5435.

Cyranoski, D. (2015). Ethics of embryo editing divides scientists. *Nature* 519**,** 272.

De Barbeyrac, B., Dupon, M., Rodriguez, P., Renaudin, H., and Bébéar, C. (1996). A Tn*1545*-like transposon carries the *tet(M)* gene in tetracycline resistant strains of *Bacteroides ureolyticus* as well as *Ureaplasma urealyticum* but not *Neisseria gonorrhoeae. J. Antimicrob. Chemother.* 37**,** 223-232.

Dégrange, S., Renaudin, H., Charron, A., Pereyre, S., Bébéar, C., and Bébéar, C. M. (2008). Reduced susceptibility to tetracyclines is associated in vitro with the presence of 16S rRNA mutations in *Mycoplasma hominis* and *Mycoplasma pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother* 61**,** 1390-1392.

Deltcheva, E., Chylinski, K., Sharma, C. M., Gonzales, K., Chao, Y., Pirzada, Z. A., Eckert, M. R., Vogel, J., and Charpentier, E. (2011). CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature* 471**,** 602-607.

Dhandayuthapani, S., Blaylock, M. W., Bébéar, C. M., Rasmussen, W. G., and Baseman, J. B. (2001). Peptide methionine sulfoxide reductase (MsrA) is a virulence determinant in *Mycoplasma genitalium*. *J Bacteriol* 183**,** 5645-5650.

Dhandayuthapani, S., Rasmussen, W. G., and Baseman, J. B. (1999). Disruption of gene *mg218* of *Mycoplasma genitalium* through homologous recombination leads to an adherence-deficient phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96**,** 5227-5232.

Dicarlo, J. E., Norville, J. E., Mali, P., Rios, X., Aach, J., and Church, G. M. (2013). Genome engineering in *Saccharomyces cerevisiae* using CRISPR-Cas systems. *Nucleic Acids Res* 41**,** 4336-4343.

Doron, S., Melamed, S., Ofir, G., Leavitt, A., Lopatina, A., Keren, M., Amitai, G., and Sorek, R. (2018). Systematic discovery of antiphage defense systems in the microbial pangenome. *Science* 359.

Douglas, T., and Savulescu, J. (2010). Synthetic biology and the ethics of knowledge. *J Med Ethics* 36**,** 687-693.

Dower, W. J. (1990). Electroporation of bacteria: a general approach to genetic transformation. *Genet Eng (N Y)* 12**,** 275-295.

Dryden, D. T., Murray, N. E., and Rao, D. N. (2001). Nucleoside triphosphate-dependent restriction enzymes. *Nucleic Acids Res* 29**,** 3728-3741.

Dupuis, M. E., Villion, M., Magadan, A. H., and Moineau, S. (2013). CRISPR-Cas and restriction-modification systems are compatible and increase phage resistance. *Nat Commun* 4**,** 2087.

Duret, S., Danet, J. L., Garnier, M., and Renaudin, J. (1999). Gene disruption through homologous recombination in *Spiroplasma citri:* an *scm1*-disrupted motility mutant is pathogenic. *J Bacteriol* 181**,** 7449-7456.

Dybvig, K. (1989). Transformation of *Acholeplasma laidlawii* with streptococcal plasmids pVA868 and pVA920. *Plasmid* 21**,** 155-160.

Dybvig, K., and Alderete, J. (1988). Transformation of *Mycoplasma pulmonis* and *Mycoplasma hyorhinis*: transposition of Tn*916* and formation of cointegrate structures. *Plasmid* 20**,** 33-41.

Dybvig, K., Cao, Z., French, C. T., and Yu, H. (2007). Evidence for type III restriction and modification systems in *Mycoplasma pulmonis*. *J Bacteriol* 189**,** 2197-2202.

Dybvig, K., and Cassell, G. H. (1987). Transposition of gram-positive transposon *Tn*916 in *Acholeplasma laidlawii* and *Mycoplasma pulmonis*. *Science* 235**,** 1392-1394.

Dybvig, K., French, C. T., and Voelker, L. L. (2000). Construction and use of derivatives of transposon Tn*4001* that function in *Mycoplasma pulmonis* and *Mycoplasma arthritidis*. *J Bacteriol* 182**,** 4343-4347.

Dybvig, K., and Voelker, L. L. (1996). Molecular biology of mycoplasmas. *Annu Rev Microbiol* 50**,** 25-57.

Dybvig, K., and Woodard, A. (1992). Construction of *rec*A mutants of *Acholeplasma laidlawii* by insertional inactivation with a homologous DNA fragment. *Plasmid* 28**,** 262-266.

Dybvig, K., and Yu, H. (1994). Regulation of a restriction and modification system via DNA inversion in *Mycoplasma pulmonis*. *Mol Microbiol* 12**,** 547-560.

Eaton, M. D., Meiklejohn, G., and Van Herick, W. (1944). Studies on the etiology of primary atypical pneumonia : a filterable agent transmissible to cotton rats, hamsters, and chick embryos. *J Exp Med* 79**,** 649-668.

Ershova, A. S., Rusinov, I. S., Spirin, S. A., Karyagina, A. S., and Alexeevski, A. V. (2015). Role of restriction-modification systems in prokaryotic evolution and ecology. *Biochemistry (Mosc)* 80**,** 1373-1386.

Esvelt, K. M., Mali, P., Braff, J. L., Moosburner, M., Yaung, S. J., and Church, G. M. (2013). Orthogonal Cas9 proteins for RNA-guided gene regulation and editing. *Nat Methods* 10**,** 1116-1121.

Férandon, C., Peuchant, O., Janis, C., Benard, A., Renaudin, H., Pereyre, S., and Bébéar, C. (2011). Development of a real-time PCR targeting the *yidC* gene for the detection of *Mycoplasma hominis* and comparison with quantitative culture. *Clin. Microbiol. Infect.* 17**,** 155-159.

Férandon, C., Peuchant, O., Renaudin, H., and Bébéar, C. (2013). Diversity of *Mycoplasma hominis* clinical isolates from Bordeaux, France, as assessed by multiple-locus variable-number tandem repeat analysis. *BMC Microbiol.* 13**,** 120.

Fisunov, G. Y., Evsyutina, D. V., Manuvera, V. A., and Govorun, V. M. (2017). Binding site of restriction-modification system controller protein in *Mollicutes*. *BMC Microbiol* 17**,** 26.

Fleischmann, Rd, Adams, Md, White, O, Clayton, Ra, Kirkness, Ef, Kerlavage, Ar, Bult, Cj, Tomb, Jf, Dougherty, Ba, Merrick, Jm, and Al., Et (1995). Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science* 269**,** 496-512.

Foissac, X., Bove, J. M., and Saillard, C. (1997a). Sequence analysis of *Spiroplasma phoeniceum* and *Spiroplasma kunkelii* spiralin genes and comparison with other spiralin genes. *Curr Microbiol* 35**,** 240-243.

Foissac, X., Saillard, C., and Bove, J. M. (1997b). Random insertion of transposon Tn*4001* in the genome of *Spiroplasma citri* strain GII3. *Plasmid* 37**,** 80-86.

Forster, A. C., and Church, G. M. (2006). Towards synthesis of a minimal cell. *Mol Syst Biol* 2**,** 45.

Foschi, C., Salvo, M., D'antuono, A., Gaspari, V., Banzola, N., Cevenini, R., and Marangoni, A. (2018). Distribution of genital *Mollicutes* in the vaginal ecosystem of women with different clinical conditions. *New Microbiol* 41**,** 225-229.

Fraser, C. M., Gocayne, J. D., White, O., Adams, M. D., Clayton, R. A., Fleischmann, R. D., Bult, C. J., Kerlavage, A. R., Sutton, G., Kelley, J. M., Fritchman, R. D., Weidman, J. F., Small, K. V., Sandusky, M., Fuhrmann, J., Nguyen, D., Utterback, T. R., Saudek, D. M., Phillips, C. A., Merrick, J. M., Tomb, J. F., Dougherty, B. A., Bott, K. F., Hu, P. C., Lucier, T. S., Peterson, S. N., Smith, H. O., Hutchison, C. A., 3rd, and Venter, J. C. (1995). The minimal gene complement of *Mycoplasma genitalium*. *Science* 270**,** 397-403.

French, C. T., Lao, P., Loraine, A. E., Matthews, B. T., Yu, H., and Dybvig, K. (2008). Large-scale transposon mutagenesis of *Mycoplasma pulmonis*. *Mol Microbiol* 69**,** 67-76.

Friedland, A. E., Tzur, Y. B., Esvelt, K. M., Colaiacovo, M. P., Church, G. M., and Calarco, J. A. (2013). Heritable genome editing in *C. elegans* via a CRISPR-Cas9 system. *Nat Methods* 10**,** 741-743.

Furnkranz, U., Henrich, B., and Walochnik, J. (2018a). *Mycoplasma hominis* impacts gene expression in *Trichomonas vaginalis*. *Parasitol Res* 117**,** 841-847.

Furnkranz, U., Walochnik, J., and Henrich, B. (2018b). Mycoplasma hominis shows strain-dependent increase in resistance to selected antibiotics after symbiosis with Trichomonas vaginalis. *J Glob Antimicrob Resist* 14**,** 169-175.

Gao, Y., Wu, H., Wang, Y., Liu, X., Chen, L., Li, Q., Cui, C., Zhang, J., and Zhang, Y. (2017). Single Cas9 nickase induced generation of NRAMP1 knockin cattle with reduced off-target effects. *Genome Biol* 18**,** 13.

Gardner, T. S., and Hawkins, K. (2013). Synthetic biology: evolution or revolution? A co-founder's perspective. *Curr Opin Chem Biol* 17**,** 871-877.

Gasiunas, G., Barrangou, R., Horvath, P., and Siksnys, V. (2012). Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109**,** E2579-2586.

Gibson, D. G., Benders, G. A., Andrews-Pfannkoch, C., Denisova, E. A., Baden-Tillson, H., Zaveri, J., Stockwell, T. B., Brownley, A., Thomas, D. W., Algire, M. A., Merryman,

C., Young, L., Noskov, V. N., Glass, J. I., Venter, J. C., Hutchison Iii, C. A., and Smith, H. O. (2008a). Complete chemical synthesis, assembly, and cloning of a *Mycoplasma genitalium* genome. *Science* 319**,** 1215-1220.

Gibson, D. G., Benders, G. A., Axelrod, K. C., Zaveri, J., Algire, M. A., Moodie, M., Montague, M. G., Venter, J. C., Smith, H. O., and Hutchison, C. A., 3rd (2008b). One-step assembly in yeast of 25 overlapping DNA fragments to form a complete synthetic *Mycoplasma genitalium* genome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105**,** 20404-20409.

Gibson, D. G., Glass, J. I., Lartigue, C., Noskov, V. N., Chuang, R. Y., Algire, M. A., Benders, G. A., Montague, M. G., Ma, L., Moodie, M. M., Merryman, C., Vashee, S., Krishnakumar, R., Assad-Garcia, N., Andrews-Pfannkoch, C., Denisova, E. A., Young, L., Qi, Z. Q., Segall-Shapiro, T. H., Calvey, C. H., Parmar, P. P., Hutchison, C. A., 3rd, Smith, H. O., and Venter, J. C. (2010). Creation of a bacterial cell controlled by a chemically synthesized genome. *Science* 329**,** 52-56.

Gilbert, L. A., Larson, M. H., Morsut, L., Liu, Z., Brar, G. A., Torres, S. E., Stern-Ginossar, N., Brandman, O., Whitehead, E. H., Doudna, J. A., Lim, W. A., Weissman, J. S., and Qi, L. S. (2013). CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes. *Cell* 154**,** 442-451.

Glass, J. I., Assad-Garcia, N., Alperovich, N., Yooseph, S., Lewis, M. R., Maruf, M., Hutchison, C. A., 3rd, Smith, H. O., and Venter, J. C. (2006). Essential genes of a minimal bacterium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103**,** 425-430.

Glass, J. I., Merryman, C., Wise, K. S., Hutchison, C. A., 3rd, and Smith, H. O. (2017). Minimal cells-real and imagined. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 9.

Goffeau, A., Barrell, B. G., Bussey, H., Davis, R. W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J. D., Jacq, C., Johnston, M., Louis, E. J., Mewes, H. W., Murakami, Y., Philippsen, P., Tettelin, H., and Oliver, S. G. (1996). Life with 6000 genes. *Science* 274**,** 546-567.

Goldenberg, R. L., Andrews, W. W., Goepfert, A. R., Faye-Petersen, O., Cliver, S. P., Carlo, W. A., and Hauth, J. C. (2008). The Alabama Preterm Birth Study: umbilical cord blood *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* cultures in very preterm newborn infants. *Am J Obstet Gynecol* 198**,** 43 e41-45.

Gong, T., Xu, X., Dang, Y., Kong, A., Wu, Y., Liang, P., Wang, S., Yu, H., Xu, P., and Yang, C. (2018). An engineered *Pseudomonas putida* can simultaneously degrade organophosphates, pyrethroids and carbamates. *Sci Total Environ* 628-629**,** 1258-1265.

Gophna, U., Allers, T., and Marchfelder, A. (2017). Finally, archaea get their CRISPR-Cas toolbox. *Trends Microbiol* 25**,** 430-432.

Goret, J., Beven, L., Faustin, B., Contin-Bordes, C., Le Roy, C., Claverol, S., Renaudin, H., Bebear, C., and Pereyre, S. (2017). Interaction of Mycoplasma hominis PG21 with Human Dendritic Cells: Interleukin-23-Inducing Mycoplasmal Lipoproteins and Inflammasome Activation of the Cell. *J Bacteriol* 199.

Goret, J., Le Roy, C., Touati, A., Mesureur, J., Renaudin, H., Claverol, S., Bébéar, C., Beven, L., and Pereyre, S. (2016). Surface lipoproteome of *Mycoplasma hominis* PG21 and differential expression after contact with human dendritic cells. *Future Microbiol.* 11**,** 179-194.

Gratz, S. J., Rubinstein, C. D., Harrison, M. M., Wildonger, J., and O'connor-Giles, K. M. (2015). CRISPR-Cas9 Genome Editing in Drosophila. *Curr Protoc Mol Biol* 111**,** 31 32 31-20.

Grau, O., Kovacic, R., Griffais, R., Launay, V., and Montagnier, L. (1994). Development of PCR-based assays for the detection of two human mollicute species, *Mycoplasma penetrans* and *M. hominis*. *Mol. Cell. Probes* 8**,** 139-147.

Grissa, I., Vergnaud, G., and Pourcel, C. (2007). CRISPRFinder: a web tool to identify clustered regularly interspaced short palindromic repeats. *Nucleic Acids Res* 35**,** W52-57.

Guo, X., Zhang, T., Hu, Z., Zhang, Y., Shi, Z., Wang, Q., Cui, Y., Wang, F., Zhao, H., and Chen, Y. (2014). Efficient RNA/Cas9-mediated genome editing in *Xenopus tropicalis*. *Development* 141**,** 707-714.

Gupta, P., and Phulara, S. C. (2015). Metabolic engineering for isoprenoid-based biofuel production. *J Appl Microbiol* 119**,** 605-619.

Guzman-Trampe, S., Ceapa, C. D., Manzo-Ruiz, M., and Sanchez, S. (2017). Synthetic biology era: Improving antibiotic's world. *Biochem Pharmacol* 134**,** 99-113.

Hahn, R. G., and Kenny, G. E. (1974). Differences in arginine requirement for growth among arginine-utilizing *Mycoplasma* species. *J. Bacteriol.* 117**,** 611-618.

Hahn, T. W., Mothershed, E. A., Waldo, R. H., 3rd, and Krause, D. C. (1999). Construction and analysis of a modified Tn*4001* conferring chloramphenicol resistance in *Mycoplasma pneumoniae*. *Plasmid* 41**,** 120-124.

Hai, T., Teng, F., Guo, R., Li, W., and Zhou, Q. (2014). One-step generation of knockout pigs by zygote injection of CRISPR/Cas system. *Cell Res* 24**,** 372-375.

Hale, C. R., Zhao, P., Olson, S., Duff, M. O., Graveley, B. R., Wells, L., Terns, R. M., and Terns, M. P. (2009). RNA-guided RNA cleavage by a CRISPR RNA-Cas protein complex. *Cell* 139**,** 945-956.

Hames, C., Halbedel, S., Hoppert, M., Frey, J., and Stulke, J. (2009). Glycerol metabolism is important for cytotoxicity of *Mycoplasma pneumoniae*. *J Bacteriol* 191**,** 747-753.

Hammond, A., Galizi, R., Kyrou, K., Simoni, A., Siniscalchi, C., Katsanos, D., Gribble, M., Baker, D., Marois, E., Russell, S., Burt, A., Windbichler, N., Crisanti, A., and Nolan, T. (2016). A CRISPR-Cas9 gene drive system targeting female reproduction in the malaria mosquito vector *Anopheles gambiae*. *Nat Biotechnol* 34**,** 78-83.

Handa, N., Nakayama, Y., Sadykov, M., and Kobayashi, I. (2001). Experimental genome evolution: large-scale genome rearrangements associated with resistance to replacement of a chromosomal restriction-modification gene complex. *Mol Microbiol* 40**,** 932-940.

Hedreyda, C. T., Lee, K. K., and Krause, D. C. (1993). Transformation of *Mycoplasma pneumoniae* with *Tn*4001 by electroporation. *Plasmid* 30**,** 170-175.

Henrich, B., Feldmann, R. C., and Hadding, U. (1993). Cytoadhesins of *Mycoplasma hominis*. *Infect Immun* 61**,** 2945-2951.

Henrich, B., Kitzerow, A., Feldmann, R. C., Schaal, H., and Hadding, U. (1996). Repetitive elements of the *Mycoplasma hominis* adhesin P50 can be differentiated by monoclonal antibodies. *Infect Immun* 64**,** 4027-4034.

Henrich, B., Kretzmer, F., Deenen, R., and Kohrer, K. (2017). Validation of a novel Mho microarray for a comprehensive characterisation of the *Mycoplasma hominis* action in HeLa cell infection. *PLoS One* 12**,** e0181383.

Hopfe, M., Deenen, R., Degrandi, D., Kohrer, K., and Henrich, B. (2013). Host cell responses to persistent mycoplasmas-Different stages in infection of HeLa cells with *Mycoplasma hominis*. *PLoS One* 8**,** e54219.

Horvath, P., and Barrangou, R. (2010). CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea. *Science* 327**,** 167-170.

Horvath, P., Romero, D. A., Coute-Monvoisin, A. C., Richards, M., Deveau, H., Moineau, S., Boyaval, P., Fremaux, C., and Barrangou, R. (2008). Diversity, activity, and evolution of CRISPR loci in *Streptococcus thermophilus*. *J Bacteriol* 190**,** 1401-1412.

Hou, Z., Zhang, Y., Propson, N. E., Howden, S. E., Chu, L. F., Sontheimer, E. J., and Thomson, J. A. (2013). Efficient genome engineering in human pluripotent stem cells using Cas9 from *Neisseria meningitidis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110**,** 15644-15649.

Hsu, P. D., Lander, E. S., and Zhang, F. (2014). Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell* 157**,** 1262-1278.

Hu, Z., Yu, L., Zhu, D., Ding, W., Wang, X., Zhang, C., Wang, L., Jiang, X., Shen, H., He, D., Li, K., Xi, L., Ma, D., and Wang, H. (2014). Disruption of HPV16-E7 by CRISPR/Cas system induces apoptosis and growth inhibition in HPV16 positive human cervical cancer cells. *Biomed Res Int* 2014**,** 612823.

Hutchison, C. A., 3rd, Chuang, R. Y., Noskov, V. N., Assad-Garcia, N., Deerinck, T. J., Ellisman, M. H., Gill, J., Kannan, K., Karas, B. J., Ma, L., Pelletier, J. F., Qi, Z. Q., Richter, R. A., Strychalski, E. A., Sun, L., Suzuki, Y., Tsvetanova, B., Wise, K. S., Smith, H. O., Glass, J. I., Merryman, C., Gibson, D. G., and Venter, J. C. (2016). Design and synthesis of a minimal bacterial genome. *Science* 351**,** aad6253.

Hutchison, C. A., Peterson, S. N., Gill, S. R., Cline, R. T., White, O., Fraser, C. M., Smith, H. O., and Venter, J. C. (1999). Global transposon mutagenesis and a minimal *Mycoplasma* genome. *Science* 286**,** 2165-2169.

Hwang, W. Y., Fu, Y., Reyon, D., Maeder, M. L., Tsai, S. Q., Sander, J. D., Peterson, R. T., Yeh, J. R., and Joung, J. K. (2013). Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system. *Nat Biotechnol* 31**,** 227-229.

Hynes, A. P., Rousseau, G. M., Agudelo, D., Goulet, A., Amigues, B., Loehr, J., Romero, D. A., Fremaux, C., Horvath, P., Doyon, Y., Cambillau, C., and Moineau, S. (2018). Widespread anti-CRISPR proteins in virulent bacteriophages inhibit a range of Cas9 proteins. *Nat Commun* 9**,** 2919.

International Human Genome Sequencing, Consortium (2004). Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature* 431**,** 931.

Ishag, H. Z. A., Xiong, Q., Liu, M., Feng, Z., and Shao, G. (2017a). Development of *ori*C-plasmids for use in *Mycoplasma hyorhinis*. *Sci Rep* 7**,** 10596.

Ishag, H. Z. A., Xiong, Q., Liu, M., Feng, Z., and Shao, G. (2017b). *E. coli recA* gene improves gene targeted homologous recombination in *Mycoplasma hyorhinis*. *J Microbiol Methods* 136**,** 49-56.

Ishag, H. Z., Liu, M. J., Yang, R. S., Xiong, Q. Y., Feng, Z. X., and Shao, G. Q. (2016). A replicating plasmid-based vector for GFP expression in *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Genet Mol Res* 15.

Ishino, Y., Krupovic, M., and Forterre, P. (2018). History of CRISPR-Cas from encounter with a mysterious repeated sequence to genome editing technology. *J Bacteriol* 200.

Ishino, Y., Shinagawa, H., Makino, K., Amemura, M., and Nakata, A. (1987). Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *J Bacteriol* 169**,** 5429-5433.

Itakura, K, Hirose, T, Crea, R, Riggs, Ad, Heyneker, Hl, Bolivar, F, and Boyer, Hw (1977). Expression in *Escherichia coli* of a chemically synthesized gene for the hormone somatostatin. *Science* 198**,** 1056-1063.

Jakociunas, T., Jensen, M. K., and Keasling, J. D. (2016). CRISPR/Cas9 advances engineering of microbial cell factories. *Metab Eng* 34**,** 44-59.

Janis, C., Bischof, D., Gourgues, G., Frey, J., Blanchard, A., and Sirand-Pugnet, P. (2008). Unmarked insertional mutagenesis in the bovine pathogen *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC: characterization of a *lppQ* mutant. *Microbiology* 154**,** 2427-2436.

Janis, C., Lartigue, C., Frey, J., Wroblewski, H., Thiaucourt, F., Blanchard, A., and Sirand-Pugnet, P. (2005). Versatile use of *oriC* plasmids for functional genomics of *Mycoplasma capricolum subsp. capricolum*. *Appl Environ Microbiol* 71**,** 2888-2893.

Jansen, R., Embden, J. D., Gaastra, W., and Schouls, L. M. (2002). Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Mol Microbiol* 43**,** 1565-1575.

Jewett, M. C., and Forster, A. C. (2010). Update on designing and building minimal cells. *Curr Opin Biotechnol* 21**,** 697-703.

Jiang, W., Bikard, D., Cox, D., Zhang, F., and Marraffini, L. A. (2013). RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems. *Nat Biotechnol* 31**,** 233-239.

Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A., and Charpentier, E. (2012). A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* 337**,** 816-821.

Jironkin, A., Brown, R. J., Underwood, A., Chalker, V. J., and Spiller, O. B. (2016). Genomic determination of minimum multi-locus sequence typing schemas to represent the genomic phylogeny of *Mycoplasma hominis*. *BMC Genomics* 17**,** 964.

Johansson, K. E., and Pettersson, B. (2002). Taxonomy of *Mollicutes*, in *Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas,* eds. S. Razin & R. Herrmann. (London: Kluwer Academic/Plenum Publishers), 1-29.

Juhas, M., Eberl, L., and Glass, J. I. (2011). Essence of life: essential genes of minimal genomes. *Trends Cell Biol* 21**,** 562-568.

Juhas, M., Reuss, D. R., Zhu, B., and Commichau, F. M. (2014). *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* essential genes and minimal cell factories after one decade of genome engineering. *Microbiology* 160**,** 2341-2351.

Kannan, K., Tsvetanova, B., Chuang, R. Y., Noskov, V. N., Assad-Garcia, N., Ma, L., Hutchison Iii, C. A., Smith, H. O., Glass, J. I., Merryman, C., Venter, J. C., and Gibson, D. G. (2016). One step engineering of the small-subunit ribosomal RNA using CRISPR/Cas9. *Sci Rep* 6**,** 30714.

Kannan, T. R., and Baseman, J. B. (2006). ADP-ribosylating and vacuolating cytotoxin of *Mycoplasma pneumoniae* represents unique virulence determinant among bacterial pathogens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103**,** 6724-6729.

Karas, B. J., Jablanovic, J., Sun, L., Ma, L., Goldgof, G. M., Stam, J., Ramon, A., Manary, M. J., Winzeler, E. A., Venter, J. C., Weyman, P. D., Gibson, D. G., Glass, J. I., Hutchison, C. A., 3rd, Smith, H. O., and Suzuki, Y. (2013). Direct transfer of whole genomes from bacteria to yeast. *Nat Methods* 10**,** 410-412.

Karas, B. J., Tagwerker, C., Yonemoto, I. T., Hutchison, C. A., 3rd, and Smith, H. O. (2012). Cloning the *Acholeplasma laidlawii* PG-8A genome in *Saccharomyces cerevisiae* as a yeast centromeric plasmid. *ACS Synth Biol* 1**,** 22-28.

Kato, J., and Hashimoto, M. (2008). Construction of long chromosomal deletion mutants of *Escherichia coli* and minimization of the genome. *Methods Mol Biol* 416**,** 279-293.

Kent, B. N., Foecking, M. F., and Calcutt, M. J. (2012). Development of a novel plasmid as a shuttle vector for heterologous gene expression in *Mycoplasma yeatsii*. *J Microbiol Methods* 91**,** 121-127.

Ketner, G., Spencer, F., Tugendreich, S., Connelly, C., and Hieter, P. (1994). Efficient manipulation of the human adenovirus genome as an infectious yeast artificial chromosome clone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91**,** 6186-6190.

Kim, D., Choi, K. Y., Yoo, M., Zylstra, G. J., and Kim, E. (2018). Biotechnological potential of *Rhodococcus* biodegradative pathways. *J Microbiol Biotechnol* 28**,** 1037-1051.

Kim, E., Koo, T., Park, S. W., Kim, D., Kim, K., Cho, H. Y., Song, D. W., Lee, K. J., Jung, M. H., Kim, S., Kim, J. H., and Kim, J. S. (2017). In vivo genome editing with a small Cas9 orthologue derived from *Campylobacter jejuni*. *Nat Commun* 8**,** 14500.

King, K. W., and Dybvig, K. (1991). Plasmid transformation of *Mycoplasma mycoides* subspecies *mycoides* is promoted by high concentrations of polyethylene glycol. *Plasmid* 26**,** 108-115.

King, K. W., and Dybvig, K. (1992). Nucleotide sequence of *Mycoplasma mycoides* subspecies *mycoides* plasmid pKMK1. *Plasmid* 28**,** 86-91.

King, K. W., and Dybvig, K. (1994a). Mycoplasmal cloning vectors derived from plasmid pKMK1. *Plasmid* 31**,** 49-59.

King, K. W., and Dybvig, K. (1994b). Transformation of *Mycoplasma capricolum* and examination of DNA restriction modification in *M. capricolum* and *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides*. *Plasmid* 31**,** 308-311.

Kitzerow, A., Hadding, U., and Henrich, B. (1999). Cyto-adherence studies of the adhesin P50 of *Mycoplasma hominis*. *J Med Microbiol* 48**,** 485-493.

Knight, T. (2005a). *Idempotent vector design for standard assembly of biobricks.* http://hdl.handle.net/1721.1/21168.

Knight, T. F. (2005b). Engineering novel life. *Mol Syst Biol* 1**,** 2005.0020.

Kobayashi, I. (2001). Behavior of restriction-modification systems as selfish mobile elements and their impact on genome evolution. *Nucleic Acids Res* 29**,** 3742-3756.

Kobayashi, K., Ehrlich, S. D., Albertini, A., Amati, G., Andersen, K. K., Arnaud, M., Asai, K., Ashikaga, S., Aymerich, S., Bessieres, P., Boland, F., Brignell, S. C., Bron, S., Bunai, K., Chapuis, J., Christiansen, L. C., Danchin, A., Debarbouille, M., Dervyn, E., Deuerling, E., Devine, K., Devine, S. K., Dreesen, O., Errington, J., Fillinger, S., Foster, S. J., Fujita, Y., Galizzi, A., Gardan, R., Eschevins, C., Fukushima, T., Haga, K., Harwood, C. R., Hecker, M., Hosoya, D., Hullo, M. F., Kakeshita, H., Karamata, D., Kasahara, Y., Kawamura, F., Koga, K., Koski, P., Kuwana, R., Imamura, D., Ishimaru, M., Ishikawa, S., Ishio, I., Le Coq, D., Masson, A., Mauel, C., Meima, R., Mellado, R. P., Moir, A., Moriya, S., Nagakawa, E., Nanamiya, H., Nakai, S., Nygaard, P., Ogura, M., Ohanan, T., O'reilly, M., O'rourke, M., Pragai, Z., Pooley, H. M., Rapoport, G., Rawlins, J. P., Rivas, L. A., Rivolta, C., Sadaie, A., Sadaie, Y., Sarvas, M., Sato, T., Saxild, H. H., Scanlan, E., Schumann, W., Seegers, J. F., Sekiguchi, J., Sekowska, A., Seror, S. J., Simon, M., Stragier, P., Studer, R., Takamatsu, H., Tanaka, T., Takeuchi, M., Thomaides, H. B., Vagner, V., Van Dijl, J. M., Watabe, K., Wipat, A., Yamamoto, H., Yamamoto, M., Yamamoto, Y., Yamane, K., Yata, K., Yoshida, K., Yoshikawa, H., Zuber, U., and Ogasawara, N. (2003). Essential *Bacillus subtilis* genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100**,** 4678-4683.

Kouprina, N., Graves, J., Cancilla, M. R., Resnick, M. A., and Larionov, V. (1997). Specific isolation of human rDNA genes by TAR cloning. *Gene* 197**,** 269-276.

Kouprina, N., and Larionov, V. (2003). Exploiting the yeast *Saccharomyces cerevisiae* for the study of the organization and evolution of complex genomes. *FEMS Microbiol Rev* 27**,** 629-649.

Kouprina, N., and Larionov, V. (2006). TAR cloning: insights into gene function, long-range haplotypes and genome structure and evolution. *Nat Rev Genet* 7**,** 805-812.

Krishnamurthy, M., Moore, R. T., Rajamani, S., and Panchal, R. G. (2016). Bacterial genome engineering and synthetic biology: combating pathogens. *BMC Microbiol* 16**,** 258.

Labroussaa, F., Lebaudy, A., Baby, V., Gourgues, G., Matteau, D., Vashee, S., Sirand-Pugnet, P., Rodrigue, S., and Lartigue, C. (2016). Impact of donor-recipient phylogenetic distance on bacterial genome transplantation. *Nucleic Acids Res* 44**,** 8501-8511.

Ladefoged, S. A. (2000). Molecular dissection of *Mycoplasma hominis*. *Apmis* 108**,** 5-45.

Ladefoged, S. A., and Christiansen, G. (1992). Physical and genetic mapping of the genomes of five *Mycoplasma hominis* strains by pulsed-field gel electrophoresis. *J Bacteriol* 174**,** 2199-2207.

Lam, Carolyn M.C., Godinho, Miguel, and Dos Santos, Vítor A.P. Martins (2010). An introduction to Synthetic Biology, in *Synthetic Biology: the technoscience and its societal consequences*, eds. M. Schmidt, A. Kelle, A. Ganguli-Mitra & H. Vriend. (Dordrecht: Springer Netherlands), 23-48.

Larionov, V., Kouprina, N., Graves, J., Chen, X. N., Korenberg, J. R., and Resnick, M. A. (1996). Specific cloning of human DNA as yeast artificial chromosomes by transformation-associated recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93**,** 491-496.

Larionov, V., Kouprina, N., Solomon, G., Barrett, J. C., and Resnick, M. A. (1997). Direct isolation of human BRCA2 gene by transformation-associated recombination in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94**,** 7384-7387.

Lartigue, C., Blanchard, A., Renaudin, J., Thiaucourt, F., and Sirand-Pugnet, P. (2003). Host specificity of mollicutes *ori*C plasmids: functional analysis of replication origin. *Nucleic Acids Res* 31**,** 6610-6618.

Lartigue, C., Duret, S., Garnier, M., and Renaudin, J. (2002). New plasmid vectors for specific gene targeting in *Spiroplasma citri*. *Plasmid* 48**,** 149-159.

Lartigue, C., Glass, J. I., Alperovich, N., Pieper, R., Parmar, P. P., Hutchison, C. A., 3rd, Smith, H. O., and Venter, J. C. (2007). Genome transplantation in bacteria: changing one species to another. *Science* 317**,** 632-638.

Lartigue, C., Lebaudy, A., Blanchard, A., El Yacoubi, B., Rose, S., Grosjean, H., and Douthwaite, S. (2014). The flavoprotein Mcap0476 (RlmFO) catalyzes m5U1939 modification in *Mycoplasma capricolum* 23S rRNA. *Nucleic Acids Res* 42**,** 8073-8082.

Lartigue, C., Vashee, S., Algire, M. A., Chuang, R. Y., Benders, G. A., Ma, L., Noskov, V. N., Denisova, E. A., Gibson, D. G., Assad-Garcia, N., Alperovich, N., Thomas, D. W., Merryman, C., Hutchison, C. A., 3rd, Smith, H. O., Venter, J. C., and Glass, J. I. (2009).

Creating bacterial strains from genomes that have been cloned and engineered in yeast. *Science* 325**,** 1693-1696.

Leduc, S. (1912). *La biologie synthétique.* A. Poinat.

Lee, S. K., Chou, H., Ham, T. S., Lee, T. S., and Keasling, J. D. (2008a). Metabolic engineering of microorganisms for biofuels production: from bugs to synthetic biology to fuels. *Curr Opin Biotechnol* 19**,** 556-563.

Lee, S. W., Browning, G. F., and Markham, P. F. (2008b). Development of a replicable oriC plasmid for *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma imitans*, and gene disruption through homologous recombination in *M. gallisepticum*. *Microbiology* 154**,** 2571-2580.

Levskaya, A., Chevalier, A. A., Tabor, J. J., Simpson, Z. B., Lavery, L. A., Levy, M., Davidson, E. A., Scouras, A., Ellington, A. D., Marcotte, E. M., and Voigt, C. A. (2005). Synthetic biology: engineering *Escherichia coli* to see light. *Nature* 438**,** 441-442.

Li, J., Zhang, J., Zhang, N., Zhang, Y., and Wu, W. (2015). Development of a replicative plasmid for gene expression in *Mycoplasma bovis*. *J Microbiol Methods* 108**,** 12-18.

Liang, P., Xu, Y., Zhang, X., Ding, C., Huang, R., Zhang, Z., Lv, J., Xie, X., Chen, Y., Li, Y., Sun, Y., Bai, Y., Songyang, Z., Ma, W., Zhou, C., and Huang, J. (2015). CRISPR/Cas9-mediated gene editing in human tripronuclear zygotes. *Protein Cell* 6**,** 363-372.

Lin, L. F., Posfai, J., Roberts, R. J., and Kong, H. (2001). Comparative genomics of the restriction-modification systems in *Helicobacter pylori*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98**,** 2740-2745.

Liu, H., Sui, T., Liu, D., Liu, T., Chen, M., Deng, J., Xu, Y., and Li, Z. (2018). Multiple homologous genes knockout (KO) by CRISPR/Cas9 system in rabbit. *Gene* 647**,** 261-267.

Lluch-Senar, M., Delgado, J., Chen, W. H., Llorens-Rico, V., O'reilly, F. J., Wodke, J. A., Unal, E. B., Yus, E., Martinez, S., Nichols, R. J., Ferrar, T., Vivancos, A., Schmeisky, A., Stulke, J., Van Noort, V., Gavin, A. C., Bork, P., and Serrano, L. (2015). Defining a minimal cell: essentiality of small ORFs and ncRNAs in a genome-reduced bacterium. *Mol Syst Biol* 11**,** 780.

Loeb, Jacques (1900). On artificial parthogenesis in sea urchins. *Science* 11**,** 1030-1030.

Luria, S. E. (1953). Host-induced modifications of viruses. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 18**,** 237-244.

Luria, S. E., and Human, M. L. (1952). A nonhereditary, host-induced variation of bacterial viruses. *J Bacteriol* 64**,** 557-569.

Ma, H., Marti-Gutierrez, N., Park, S. W., Wu, J., Lee, Y., Suzuki, K., Koski, A., Ji, D., Hayama, T., Ahmed, R., Darby, H., Van Dyken, C., Li, Y., Kang, E., Park, A. R., Kim, D., Kim, S. T., Gong, J., Gu, Y., Xu, X., Battaglia, D., Krieg, S. A., Lee, D. M., Wu, D. H., Wolf, D. P., Heitner, S. B., Belmonte, J. C. I., Amato, P., Kim, J. S., Kaul, S., and Mitalipov, S. (2017). Correction of a pathogenic gene mutation in human embryos. *Nature* 548**,** 413-419.

Ma, Y., Zhang, X., Shen, B., Lu, Y., Chen, W., Ma, J., Bai, L., Huang, X., and Zhang, L. (2014). Generating rats with conditional alleles using CRISPR/Cas9. *Cell Res* 24**,** 122-125.

Maglennon, G. A., Cook, B. S., Matthews, D., Deeney, A. S., Bosse, J. T., Langford, P. R., Maskell, D. J., Tucker, A. W., Wren, B. W., and Rycroft, A. N. (2013). Development of a self-replicating plasmid system for *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Vet Res* 44**,** 63.

Makarova, K. S., Wolf, Y. I., Alkhnbashi, O. S., Costa, F., Shah, S. A., Saunders, S. J., Barrangou, R., Brouns, S. J., Charpentier, E., Haft, D. H., Horvath, P., Moineau, S., Mojica, F. J., Terns, R. M., Terns, M. P., White, M. F., Yakunin, A. F., Garrett, R. A., Van Der Oost, J., Backofen, R., and Koonin, E. V. (2015). An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems. *Nat Rev Microbiol* 13**,** 722-736.

Mali, P., Esvelt, K. M., and Church, G. M. (2013a). Cas9 as a versatile tool for engineering biology. *Nat Methods* 10**,** 957-963.

Mali, P., Yang, L., Esvelt, K. M., Aach, J., Guell, M., Dicarlo, J. E., Norville, J. E., and Church, G. M. (2013b). RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science* 339**,** 823-826.

Mao, Y., Zhang, Z., Feng, Z., Wei, P., Zhang, H., Botella, J. R., and Zhu, J. K. (2016). Development of germ-line-specific CRISPR-Cas9 systems to improve the production of heritable gene modifications in *Arabidopsis*. *Plant Biotechnol J* 14**,** 519-532.

Mardassi, B. B., Ayari, H., Bejaoui-Khiari, A., Mlik, B., Moalla, I., and Amouna, F. (2007). Genetic variability of the P120' surface protein gene of *Mycoplasma hominis* isolates recovered from Tunisian patients with uro-genital and infertility disorders. *BMC Infect. Dis.* 7**,** 142.

Margarita, V., Rappelli, P., Dessi, D., Pintus, G., Hirt, R. P., and Fiori, P. L. (2016). Symbiotic association with *Mycoplasma hominis* can influence growth rate, ATP production, cytolysis and inflammatory response of *Trichomonas vaginalis*. *Front Microbiol* 7**,** 953.

Mariscal, A. M., Kakizawa, S., Hsu, J. Y., Tanaka, K., Gonzalez-Gonzalez, L., Broto, A., Querol, E., Lluch-Senar, M., Pinero-Lambea, C., Sun, L., Weyman, P. D., Wise, K. S., Merryman, C., Tse, G., Moore, A. J., Hutchison, C. A., 3rd, Smith, H. O., Tomita, M.,

Venter, J. C., Glass, J. I., Pinol, J., and Suzuki, Y. (2018). Tuning gene activity by inducible and targeted regulation of gene expression in minimal bacterial cells. *ACS Synth Biol* 7**,** 1538-1552.

Matteau, D., Pepin, M. E., Baby, V., Gauthier, S., Arango Giraldo, M., Knight, T. F., and Rodrigue, S. (2017). Development of *oriC*-based plasmids for *Mesoplasma florum*. *Appl Environ Microbiol* 83.

Mcauliffe, L., Ellis, R. J., Miles, K., Ayling, R. D., and Nicholas, R. A. (2006). Biofilm formation by mycoplasma species and its role in environmental persistence and survival. *Microbiology* 152**,** 913-922.

Mccallum, C. M., Comai, L., Greene, E. A., and Henikoff, S. (2000). Targeting induced local lesions IN genomes (TILLING) for plant functional genomics. *Plant Physiol* 123**,** 439-442.

Mccutcheon, J. P., and Moran, N. A. (2010). Functional convergence in reduced genomes of bacterial symbionts spanning 200 My of evolution. *Genome Biol Evol* 2**,** 708-718.

Mercenier, A., and Chassy, B. M. (1988). Strategies for the development of bacterial transformation systems. *Biochimie* 70**,** 503-517.

Meygret, A., Le Roy, C., Renaudin, H., Bebear, C., and Pereyre, S. (2018). Tetracycline and fluoroquinolone resistance in clinical *Ureaplasma* spp. and *Mycoplasma hominis* isolates in France between 2010 and 2015. *J Antimicrob Chemother* 73**,** 2696-2703.

Miller, J. C., Holmes, M. C., Wang, J., Guschin, D. Y., Lee, Y. L., Rupniewski, I., Beausejour, C. M., Waite, A. J., Wang, N. S., Kim, K. A., Gregory, P. D., Pabo, C. O., and Rebar, E. J. (2007). An improved zinc-finger nuclease architecture for highly specific genome editing. *Nat Biotechnol* 25**,** 778-785.

Mojica, F. J., Diez-Villasenor, C., Soria, E., and Juez, G. (2000). Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of archaea, bacteria and mitochondria. *Mol Microbiol* 36**,** 244-246.

Morada, M., Manzur, M., Lam, B., Tan, C., Tachezy, J., Rappelli, P., Dessi, D., Fiori, P. L., and Yarlett, N. (2010). Arginine metabolism in *Trichomonas vaginalis* infected with *Mycoplasma hominis*. *Microbiology* 156**,** 3734-3743.

Mruk, I., and Kobayashi, I. (2014). To be or not to be: regulation of restriction-modification systems and other toxin-antitoxin systems. *Nucleic Acids Res* 42**,** 70-86.

Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., and Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51 Pt 1**,** 263-273.

Murray, N. E. (2000). Type I restriction systems: sophisticated molecular machines (a legacy of Bertani and Weigle). *Microbiol Mol Biol Rev* 64**,** 412-434.

Murray, N. E. (2002). 2001 Fred Griffith review lecture. Immigration control of DNA in bacteria: self versus non-self. *Microbiology* 148**,** 3-20.

Mushegian, A. R., and Koonin, E. V. (1996). A minimal gene set for cellular life derived by comparison of complete bacterial genomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93**,** 10268-10273.

Mussolino, C., and Cathomen, T. (2011). On target? Tracing zinc-finger-nuclease specificity. *Nat Methods* 8**,** 725-726.

Naito, T., Kusano, K., and Kobayashi, I. (1995). Selfish behavior of restriction-modification systems. *Science* 267**,** 897-899.

Nathans, D., and Smith, H. O. (1975). Restriction endonucleases in the analysis and restructuring of dna molecules. *Annu Rev Biochem* 44**,** 273-293.

Neidhardt, Frederick C., and Curtiss, Roy (1996). *Escherichia coli and Salmonella : cellular and molecular biology*. Washington, D.C.: ASM Press.

Nelson, K. E., Richardson, D. L., and Dougherty, B. A. (1997). Tn*916* transposition in *Haemophilus influenzae* Rd: preferential insertion into noncoding DNA. *Microb Comp Genomics* 2**,** 313-321.

Noskov, V. N., Karas, B. J., Young, L., Chuang, R. Y., Gibson, D. G., Lin, Y. C., Stam, J., Yonemoto, I. T., Suzuki, Y., Andrews-Pfannkoch, C., Glass, J. I., Smith, H. O., Hutchison, C. A., 3rd, Venter, J. C., and Weyman, P. D. (2012). Assembly of large, high G+C bacterial DNA fragments in yeast. *ACS Synth Biol* 1**,** 267-273.

Noskov, V. N., Segall-Shapiro, T. H., and Chuang, R. Y. (2010). Tandem repeat coupled with endonuclease cleavage (TREC): a seamless modification tool for genome engineering in yeast. *Nucleic Acids Res* 38**,** 2570-2576.

Novosad, S. A., Basavaraju, S. V., Annambhotla, P., Mohr, M., Halpin, A., Foy, L., Chmielewski, R., Winchell, J. M., Benitez, A. J., Morrison, S. S., Johnson, T., Crabb, D. M., Ratliff, A. E., Waites, K., and Kuehnert, M. J. (2017). *Mycoplasma hominis* infections transmitted through amniotic tissue product. *Clin Infect Dis* 65**,** 1152-1158.

Oliveira, P. H., Touchon, M., and Rocha, E. P. (2014). The interplay of restriction-modification systems with mobile genetic elements and their prokaryotic hosts. *Nucleic Acids Res* 42**,** 10618-10631.

Paddon, C. J., and Keasling, J. D. (2014). Semi-synthetic artemisinin: a model for the use of synthetic biology in pharmaceutical development. *Nat Rev Microbiol* 12**,** 355-367.

Panne, D., Muller, S. A., Wirtz, S., Engel, A., and Bickle, T. A. (2001). The McrBC restriction endonuclease assembles into a ring structure in the presence of G nucleotides. *EMBO J* 20**,** 3210-3217.

Pascual, A., Jaton, K., Ninet, B., Bille, J., and Greub, G. (2010). New diagnostic real-time PCR for specific detection of *Mycoplasma hominis* DNA. *Int J Microbiol* pii: 317512.

Pawluk, A., Davidson, A. R., and Maxwell, K. L. (2018). Anti-CRISPR: discovery, mechanism and function. *Nat Rev Microbiol* 16**,** 12-17.

Peltier, M. R., Freeman, A. J., Mu, H. H., and Cole, B. C. (2005). Characterization and partial purification of a macrophage-stimulating factor from *Mycoplasma hominis*. *Am J Reprod Immunol* 54**,** 342-351.

Pereyre, S., and Bébéar, C. Infections à *Mycoplasma hominis*. *EMC- maladies infectieuses* in press.

Pereyre, S., Bébéar, Ch., and Bébéar, C. (2015). *Mycoplasma hominis, M. genitalium, Ureaplasma* spp, in *Antimicrobial Therapy and Vaccines; volume I : Microbes,* ed. V.L. Yu. (Pittsburgh, PA, USA: Esun technologies).

Pereyre, S., Bénard, C., Bres, C., Le Roy, C., Mauxion, J. P., Rideau, F., Sirand-Pugnet, P., Henrich, B., and Bébéar, C. (2018). Generation of *Mycoplasma hominis* gene-targeted mutants by targeting-induced local lesions in genomes (TILLING). *BMC Genomics* 19**,** 525.

Pereyre, S., Gonzalez, P., De Barbeyrac, B., Darnige, A., Renaudin, H., Charron, A., Raherison, S., Bébéar, C., and Bébéar, C. M. (2002). Mutations in 23S rRNA account for intrinsic resistance to macrolides in *Mycoplasma hominis* and *Mycoplasma fermentans* and for acquired resistance to macrolides in *M. hominis. Antimicrob. Agents Chemother.* 46**,** 3142-3150.

Pereyre, S., Renaudin, H., Charron, A., Bébéar, C., and Bébéar, C. M. (2006). Emergence of a 23S rRNA mutation in *Mycoplasma hominis* associated with a loss of the intrinsic resistance to erythromycin and azithromycin. *J. Antimicrob. Chemother.* 57**,** 753-756.

Pereyre, S., Sirand-Pugnet, P., Beven, L., Charron, A., Renaudin, H., Barre, A., Avenaud, P., Jacob, D., Couloux, A., Barbe, V., De Daruvar, A., Blanchard, A., and Bebear, C. (2009). Life on arginine for *Mycoplasma hominis*: clues from its minimal genome and comparison with other human urogenital mycoplasmas. *PLoS Genet* 5**,** e1000677.

Pereyre, S., Tardy, F., Renaudin, H., Cauvin, E., Del Pra Netto Machado, L., Tricot, A., Benoit, F., Treilles, M., and Bébéar, C. (2013). Identification and subtyping of clinically

relevant human and ruminant mycoplasmas by use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J. Clin. Microbiol.* 51**,** 3314-3323.

Piatek, A., Ali, Z., Baazim, H., Li, L., Abulfaraj, A., Al-Shareef, S., Aouida, M., and Mahfouz, M. M. (2015). RNA-guided transcriptional regulation in planta via synthetic dCas9-based transcription factors. *Plant Biotechnol J* 13**,** 578-589.

Pilo, P., Frey, J., and Vilei, E. M. (2007). Molecular mechanisms of pathogenicity of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC. *Vet J* 174**,** 513-521.

Pingoud, A., Fuxreiter, M., Pingoud, V., and Wende, W. (2005). Type II restriction endonucleases: structure and mechanism. *Cell Mol Life Sci* 62**,** 685-707.

Platt, R. J., Chen, S., Zhou, Y., Yim, M. J., Swiech, L., Kempton, H. R., Dahlman, J. E., Parnas, O., Eisenhaure, T. M., Jovanovic, M., Graham, D. B., Jhunjhunwala, S., Heidenreich, M., Xavier, R. J., Langer, R., Anderson, D. G., Hacohen, N., Regev, A., Feng, G., Sharp, P. A., and Zhang, F. (2014). CRISPR-Cas9 knockin mice for genome editing and cancer modeling. *Cell* 159**,** 440-455.

Potter, H. (1988). Electroporation in biology: methods, applications, and instrumentation. *Anal Biochem* 174**,** 361-373.

Pulecio, J., Verma, N., Mejia-Ramirez, E., Huangfu, D., and Raya, A. (2017). CRISPR/Cas9-Based Engineering of the Epigenome. *Cell Stem Cell* 21**,** 431-447.

Pyne, M. E., Moo-Young, M., Chung, D. A., and Chou, C. P. (2015). Coupling the CRISPR/Cas9 system with lambda red recombineering enables simplified chromosomal gene replacement in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 81**,** 5103-5114.

Ran, F. A., Cong, L., Yan, W. X., Scott, D. A., Gootenberg, J. S., Kriz, A. J., Zetsche, B., Shalem, O., Wu, X., Makarova, K. S., Koonin, E. V., Sharp, P. A., and Zhang, F. (2015). In vivo genome editing using *Staphylococcus aureus* Cas9. *Nature* 520**,** 186-191.

Ran, F. A., Hsu, P. D., Wright, J., Agarwala, V., Scott, D. A., and Zhang, F. (2013). Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Protoc* 8**,** 2281-2308.

Razin, S., Yogev, D., and Naot, Y. (1998). Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. *Microbiol Mol Biol Rev* 62**,** 1094-1156.

Rebatchouk, D., Daraselia, N., and Narita, J. O. (1996). NOMAD: a versatile strategy for in vitro DNA manipulation applied to promoter analysis and vector design. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93**,** 10891-10896.

Reddy, S. P., Rasmussen, W. G., and Baseman, J. B. (1996). Isolation and characterization of transposon Tn*4001*-generated, cytadherence-deficient transformants of *Mycoplasma pneumoniae* and *Mycoplasma genitalium*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 15**,** 199-211.

Renaudin, J., Breton, M., and Citti, C. (2014). Molecular Genetic Tools for *Mollicutes*. In: Browning G, Citti C, editors. Mollicutes: molecular biology and pathogenesis. Norwich UK: Horizon scientific press; 2014. p. 55–76.

Renaudin, Joël (2002). Extrachromosomal elements and gene transfer, in *Molecular Biology and Pathogenicity of Mycoplasmas*, eds. S. Razin & R. Herrmann. (Boston, MA: Springer US), 347-370.

Rideau, F., Le Roy, C., Descamps, E. C. T., Renaudin, H., Lartigue, C., and Bebear, C. (2017). Cloning, Stability, and Modification of *Mycoplasma hominis* Genome in Yeast. *ACS Synth Biol* 6**,** 891-901.

Ro, D. K., Paradise, E. M., Ouellet, M., Fisher, K. J., Newman, K. L., Ndungu, J. M., Ho, K. A., Eachus, R. A., Ham, T. S., Kirby, J., Chang, M. C., Withers, S. T., Shiba, Y., Sarpong, R., and Keasling, J. D. (2006). Production of the antimalarial drug precursor artemisinic acid in engineered yeast. *Nature* 440**,** 940-943.

Roachford, O. S. E., Nelson, K. E., and Mohapatra, B. R. (2017). Comparative genomics of four *Mycoplasma* species of the human urogenital tract: analysis of their core genomes and virulence genes. *Int J Med Microbiol* 307**,** 508-520.

Roberts, M. C., and Kenny, G. E. (1987). Conjugal transfer of transposon Tn*916* from *Streptococcus faecalis* to *Mycoplasma hominis*. *J Bacteriol* 169**,** 3836-3839.

Roberts, R. J., Belfort, M., Bestor, T., Bhagwat, A. S., Bickle, T. A., Bitinaite, J., Blumenthal, R. M., Degtyarev, Skh, Dryden, D. T., Dybvig, K., Firman, K., Gromova, E. S., Gumport, R. I., Halford, S. E., Hattman, S., Heitman, J., Hornby, D. P., Janulaitis, A., Jeltsch, A., Josephsen, J., Kiss, A., Klaenhammer, T. R., Kobayashi, I., Kong, H., Kruger, D. H., Lacks, S., Marinus, M. G., Miyahara, M., Morgan, R. D., Murray, N. E., Nagaraja, V., Piekarowicz, A., Pingoud, A., Raleigh, E., Rao, D. N., Reich, N., Repin, V. E., Selker, E. U., Shaw, P. C., Stein, D. C., Stoddard, B. L., Szybalski, W., Trautner, T. A., Van Etten, J. L., Vitor, J. M., Wilson, G. G., and Xu, S. Y. (2003). A nomenclature for restriction enzymes, DNA methyltransferases, homing endonucleases and their genes. *Nucleic Acids Res* 31**,** 1805-1812.

Roberts, R. J., and Macelis, D. (1997). REBASE-restriction enzymes and methylases. *Nucleic Acids Res* 25**,** 248-262.

Roberts, R. J., and Macelis, D. (2000). REBASE - restriction enzymes and methylases. *Nucleic Acids Res* 28**,** 306-307.

Roberts, R. J., Vincze, T., Posfai, J., and Macelis, D. (2015). REBASE--a database for DNA restriction and modification: enzymes, genes and genomes. *Nucleic Acids Res* 43**,** D298-299.

Rocha, E. P., and Blanchard, A. (2002). Genomic repeats, genome plasticity and the dynamics of Mycoplasma evolution. *Nucleic Acids Res* 30**,** 2031-2042.

Rocha, E. P., Cornet, E., and Michel, B. (2005). Comparative and evolutionary analysis of the bacterial homologous recombination systems. *PLoS Genet* 1**,** e15.

Romero, R., Schaudinn, C., Kusanovic, J. P., Gorur, A., Gotsch, F., Webster, P., Nhan-Chang, C. L., Erez, O., Kim, C. J., Espinoza, J., Goncalves, L. F., Vaisbuch, E., Mazaki-Tovi, S., Hassan, S. S., and Costerton, J. W. (2008). Detection of a microbial biofilm in intraamniotic infection. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 198**,** 135 e131-135.

Rottem, S. (2003). Interaction of mycoplasmas with host cells. *Physiol Rev* 83**,** 417-432.

Rouch, D. A., Byrne, M. E., Kong, Y. C., and Skurray, R. A. (1987). The *aacA-aphD* gentamicin and kanamycin resistance determinant of Tn*4001* from *Staphylococcus aureus*: expression and nucleotide sequence analysis. *J Gen Microbiol* 133**,** 3039-3052.

Saillard, C., Carle, P., Duret-Nurbel, S., Henri, R., Killiny, N., Carrere, S., Gouzy, J., Bove, J. M., Renaudin, J., and Foissac, X. (2008). The abundant extrachromosomal DNA content of the *Spiroplasma citri* GII3-3X genome. *BMC Genomics* 9**,** 195.

Sapranauskas, R., Gasiunas, G., Fremaux, C., Barrangou, R., Horvath, P., and Siksnys, V. (2011). The *Streptococcus thermophilus* CRISPR/Cas system provides immunity in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res* 39**,** 9275-9282.

Savitskaya, E. E., Musharova, O. S., and Severinov, K. V. (2016). Diversity of CRISPR-Cas-mediated mechanisms of adaptive immunity in prokaryotes and their application in biotechnology. *Biochemistry (Mosc)* 81**,** 653-661.

Schaefer, K. A., Wu, W. H., Colgan, D. F., Tsang, S. H., Bassuk, A. G., and Mahajan, V. B. (2017). Unexpected mutations after CRISPR-Cas9 editing in vivo. *Nat Methods* 14**,** 547-548.

Schieck, E., Lartigue, C., Frey, J., Vozza, N., Hegermann, J., Miller, R. A., Valguarnera, E., Muriuki, C., Meens, J., Nene, V., Naessens, J., Weber, J., Lowary, T. L., Vashee, S., Feldman, M. F., and Jores, J. (2016). Galactofuranose in *Mycoplasma mycoides* is important for membrane integrity and conceals adhesins but does not contribute to serum resistance. *Mol Microbiol* 99**,** 55-70.

Schroeder, C., Jurkschat, H., Meisel, A., Reich, J. G., and Kruger, D. (1986). Unusual occurrence of EcoP1 and EcoP15 recognition sites and counterselection of type II methylation and restriction sequences in bacteriophage T7 DNA. *Gene* 45**,** 77-86.

Shabbir, M. A., Hao, H., Shabbir, M. Z., Hussain, H. I., Iqbal, Z., Ahmed, S., Sattar, A., Iqbal, M., Li, J., and Yuan, Z. (2016). Survival and evolution of CRISPR-Cas system in prokaryotes and its applications. *Front Immunol* 7**,** 375.

Shahid, M. A., Marenda, M. S., Markham, P. F., and Noormohammadi, A. H. (2014). Development of an *oriC* vector for use in *Mycoplasma synoviae*. *J Microbiol Methods* 103**,** 70-76.

Sharma, S., Citti, C., Sagne, E., Marenda, M. S., Markham, P. F., and Browning, G. F. (2015). Development and host compatibility of plasmids for two important ruminant pathogens, *Mycoplasma bovis* and *Mycoplasma agalactiae*. *PLoS One* 10**,** e0119000.

Sharp, P. M. (1986). Molecular evolution of bacteriophages: evidence of selection against the recognition sites of host restriction enzymes. *Mol Biol Evol* 3**,** 75-83.

Simmons, W. L., and Dybvig, K. (2009). *Mycoplasma* biofilms *ex vivo* and *in vivo*. *FEMS Microbiol Lett* 295**,** 77-81.

Simmons, W. L., and Dybvig, K. (2015). Catalase enhances growth and biofilm production of *Mycoplasma pneumoniae*. *Curr Microbiol* 71**,** 190-194.

Sirand-Pugnet, P., Citti, C., Barre, A., and Blanchard, A. (2007a). Evolution of mollicutes: down a bumpy road with twists and turns. *Res Microbiol* 158**,** 754-766.

Sirand-Pugnet, P., Lartigue, C., Marenda, M., Jacob, D., Barre, A., Barbe, V., Schenowitz, C., Mangenot, S., Couloux, A., Segurens, B., De Daruvar, A., Blanchard, A., and Citti, C. (2007b). Being pathogenic, plastic, and sexual while living with a nearly minimal bacterial genome. *PLoS Genet* 3**,** e75, 744-758.

Smibert, O. C., Wilson, H. L., Sohail, A., Narayanasamy, S., Schultz, M. B., Ballard, S. A., Kwong, J. C., De Boer, J., Morrissey, C. O., Peleg, A. Y., Snell, G. I., Paraskeva, M. A., and Jenney, A. W. J. (2017). Donor-Derived Mycoplasma hominis and an Apparent Cluster of M. hominis Cases in Solid Organ Transplant Recipients. *Clin Infect Dis* 65**,** 1504-1508.

Sorek, R., Lawrence, C. M., and Wiedenheft, B. (2013). CRISPR-mediated adaptive immune systems in bacteria and archaea. *Annu Rev Biochem* 82**,** 237-266.

Sovova, T., Kerins, G., Demnerova, K., and Ovesna, J. (2017). Genome editing with engineered nucleases in economically important animals and plants: state of the art in the research pipeline. *Curr Issues Mol Biol* 21**,** 41-62.

Srugo, I., Steinberg, J., Madeb, R., Gershtein, R., Elias, I., Tal, J., and Nativ, O. (2003). Agents of non-gonococcal urethritis in males attending an Israeli clinic for sexually transmitted diseases. *Isr Med Assoc J* 5**,** 24-27.

Stephanopoulos, G. (2012). Synthetic biology and metabolic engineering. *ACS Synth Biol* 1**,** 514-525.

Sternberg, S. H., Redding, S., Jinek, M., Greene, E. C., and Doudna, J. A. (2014). DNA interrogation by the CRISPR RNA-guided endonuclease Cas9. *Nature* 507**,** 62-67.

Sutherland, E., Coe, L., and Raleigh, E. A. (1992). McrBC: a multisubunit GTP-dependent restriction endonuclease. *J Mol Biol* 225**,** 327-348.

Tagwerker, C., Dupont, C. L., Karas, B. J., Ma, L., Chuang, R. Y., Benders, G. A., Ramon, A., Novotny, M., Montague, M. G., Venepally, P., Brami, D., Schwartz, A., Andrews-Pfannkoch, C., Gibson, D. G., Glass, J. I., Smith, H. O., Venter, J. C., and Hutchison, C. A., 3rd (2012). Sequence analysis of a complete 1.66 Mb *Prochlorococcus marinus* MED4 genome cloned in yeast. *Nucleic Acids Res* 40**,** 10375-10383.

Taylor-Robinson, D., Ainsworth, J. G., and Mccormack, W. M. (1999). Genital mycoplasmas, in *Sexually Transmitted Diseases,* eds. K.K. Holmes, P.F. Sparling, P.A. Mardh, S.M. Lemon, W.E. Stamm, P. P. & J.N. Wasserheit. 3rd ed (New York: McGraw Hill), 533-548.

Taylor-Robinson, D., and Lamont, R. F. (2011). Mycoplasmas in pregnancy. *BJOG* 118**,** 164-174.

Teachman, A. M., French, C. T., Yu, H., Simmons, W. L., and Dybvig, K. (2002). Gene transfer in *Mycoplasma pulmonis*. *J Bacteriol* 184**,** 947-951.

Terahara, N., Tulum, I., and Miyata, M. (2017). Transformation of crustacean pathogenic bacterium *Spiroplasma eriocheiris* and expression of yellow fluorescent protein. *Biochem Biophys Res Commun* 487**,** 488-493.

Tock, M. R., and Dryden, D. T. (2005). The biology of restriction and anti-restriction. *Curr Opin Microbiol* 8**,** 466-472.

Truchetet, M. E., Béven, L., Renaudin, H., Douchet, I., Férandon, C., Charron, A., Blanco, P., Schaeverbeke, T., Contin-Bordes, C., and Bébéar, C. (2011). Potential role of *Mycoplasma hominis* in interleukin (IL)-17-producing CD4+ T-cell generation via induction of IL-23 secretion by human dendritic cells. *J. Infect. Dis.* 204**,** 1796-1805.

Tsarmpopoulos, I., Gourgues, G., Blanchard, A., Vashee, S., Jores, J., Lartigue, C., and Sirand-Pugnet, P. (2016). In-yeast engineering of a bacterial genome using CRISPR/Cas9. *ACS Synth Biol* 5**,** 104-109.

Tsarmpopoulos, Iason (2017). *Engineering the genome of minimal bacteria using CRISPR/Cas9 tools.* Université de Bordeaux.

Tully, Joseph G., Bové, Joseph M., Laigret, Frédéric, and Whitcomb, Robert F. (1993). Notes: Revised Taxonomy of the Class Mollicutes: Proposed Elevation of a Monophyletic Cluster of Arthropod-Associated Mollicutes to Ordinal Rank (Entomoplasmatales ord. nov.), with Provision for Familial Rank To Separate Species with Nonhelical Morphology (Entomoplasmataceae fam. nov.) from Helical Species (Spiroplasmataceae), and Emended Descriptions of the Order Mycoplasmatales, Family Mycoplasmataceae. *Int J Syst Evol Microbiol* 43**,** 378-385.

Vancini, R. G., Pereira-Neves, A., Borojevic, R., and Benchimol, M. (2008). *Trichomonas vaginalis* harboring *Mycoplasma hominis* increases cytopathogenicity in vitro. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 27**,** 259-267.

Vasu, K., and Nagaraja, V. (2013). Diverse functions of restriction-modification systems in addition to cellular defense. *Microbiol Mol Biol Rev* 77**,** 53-72.

Voelker, L. L., and Dybvig, K. (1996). Gene transfer in *Mycoplasma arthritidis*: transformation, conjugal transfer of Tn*916*, and evidence for a restriction system recognizing AGCT. *J Bacteriol* 178**,** 6078-6081.

Voigt, C. A. (2012). Synthetic biology: Bacteria collaborate to sense arsenic. *Nature* 481**,** 33.

Waites, K. B., and Bébéar, C. *Mycoplasma* and *Ureaplasma*. *Manual of Clinical Microbiology,* ASM press (Washington D.C.)**,** in press.

Waites, K. B., Bébéar, C. M., Roberston, J. A., Talkington, D. F., and Kenny, G. E. (2001). "Cumitech 34, Laboratory diagnosis of mycoplasmal infections.", in: *Cumitech.* (ed.) F.S. Nolte.).

Waites, K. B., Lysnyanski, I., and Bébéar, C.M. (2014). Emerging antimicrobial resistance in mycoplasmas of humans and animals, in *Molecular Biology and Pathogenesis,*, ed. C.C. Browning G.F.), 289-322.

Waites, K. B., Schelonka, R. L., Xiao, L., Grigsby, P. L., and Novy, M. J. (2009). Congenital and opportunistic infections: *Ureaplasma* species and *Mycoplasma hominis*. *Semin. Fetal Neonatal Med.* 14**,** 190-199.

Waites, K., and Bébéar, C (2016). Mycoplasma, in *Manual of commercial methods in clinical microbiology, second edition,* ed. A.L. Truant. (Hoboken, New jersey: Wiley J. and Sons), 195-213.

Waites, K., and Talkington, D. (2005). New developments in human diseases due to mycoplasmas, in *Mycoplasmas Molecular Biology Pathogenicity and Strategies for Control*, eds. A. Blanchard & G.F. Browning. (Norfolk: Horizon Bioscience), 289-354.

Waites, K.B., Bade, D.J., Bébéar, C., S.D., Brown, Davidson, M., Duffy, L.B., Kenny, G. E., Matlow, A., Shortridge, D., Talkington, D.F., Totten, P.A., Watts, J.L., and Zheng, X. (2011). "Methods for antimicrobial susceptibility testing for human mycoplasmas : Approved guideline". (Wayne (PA): Clinical and Laboratory Standards Institute).

Waites, K.B., and Bébéar, C.M. (2013). Chemotherapy of *Mycoplasma* and *Ureaplasma* infections, in *Encyclopedia of Pharmaceutical Microbiology* eds. C. Gahan, C.H. Nightingale & H. Charles. Springer).

Walkinshaw, M. D., Taylor, P., Sturrock, S. S., Atanasiu, C., Berge, T., Henderson, R. M., Edwardson, J. M., and Dryden, D. T. (2002). Structure of Ocr from bacteriophage T7, a protein that mimics B-form DNA. *Mol Cell* 9**,** 187-194.

Wang, H., Deng, F., Pijlman, G. P., Chen, X., Sun, X., Vlak, J. M., and Hu, Z. (2003). Cloning of biologically active genomes from a *Helicoverpa armigera* single-nucleocapsid nucleopolyhedrovirus isolate by using a bacterial artificial chromosome. *Virus Res.* 97**,** 57-63.

Wang, Y., Yi, L., Zhang, F., Qiu, X., Tan, L., Yu, S., Cheng, X., and Ding, C. (2017). Identification of genes involved in *Mycoplasma gallisepticum* biofilm formation using mini-*Tn*4001-SGM transposon mutagenesis. *Vet Microbiol* 198**,** 17-22.

Weisburg, W. G., Tully, J. G., Rose, D. L., Petzel, J. P., Oyaizu, H., Yang, D., Mandelco, L., Sechrest, J., Lawrence, T. G., Van Etten, J., and Et Al. (1989). A phylogenetic analysis of the mycoplasmas: basis for their classification. *J Bacteriol* 171**,** 6455-6467.

Whetzel, P. L., Hnatow, L. L., Keeler, C. L., Jr., and Dohms, J. E. (2003). Transposon mutagenesis of *Mycoplasma gallisepticum*. *Plasmid* 49**,** 34-43.

Whitley, J. C., and Finch, L. R. (1989). Location of sites of transposon Tn*916* insertion in the *Mycoplasma mycoides* genome. *J Bacteriol* 171**,** 6870-6872.

Wiles, M. V., Qin, W., Cheng, A. W., and Wang, H. (2015). CRISPR-Cas9-mediated genome editing and guide RNA design. *Mamm Genome* 26**,** 501-510.

Wilson, G. G. (1991). Organization of restriction-modification systems. *Nucleic Acids Res* 19**,** 2539-2566.

Woese, C. R., Maniloff, J., and Zablen, L. B. (1980). Phylogenetic analysis of the mycoplasmas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77**,** 494-498.

Wu, W. H., Tsai, Y. T., Justus, S., Lee, T. T., Zhang, L., Lin, C. S., Bassuk, A. G., Mahajan, V. B., and Tsang, S. H. (2016). CRISPR Repair Reveals Causative Mutation in a Preclinical Model of Retinitis Pigmentosa. *Mol Ther* 24**,** 1388-1394.

Yang, H., Wang, H., and Jaenisch, R. (2014). Generating genetically modified mice using CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Nat Protoc* 9**,** 1956-1968.

Ye, F., Renaudin, J., Bové, J. M., and Laigret, F. (1994). Cloning and sequencing of the replication origin (*ori*C) of the *Spiroplasma citri* chromosome and construction of autonomously replicating artificial plasmids. *Curr Microbiol* 29**,** 23-29.

Yuen, K. S., Chan, C. P., Wong, N. H., Ho, C. H., Ho, T. H., Lei, T., Deng, W., Tsao, S. W., Chen, H., Kok, K. H., and Jin, D. Y. (2015). CRISPR/Cas9-mediated genome editing of Epstein-Barr virus in human cells. *J Gen Virol* 96**,** 626-636.

Zdrodowska-Stefanow, B., Klosowska, W. M., Ostaszewska-Puchalska, I., Bulhak-Koziol, V., and Kotowicz, B. (2006). *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* infections in male urethritis and its complications. *Adv Med Sci* 51**,** 254-257.

Zhang, Q., and Wise, K. S. (1996). Molecular basis of size and antigenic variation of a *Mycoplasma hominis* adhesin encoded by divergent *vaa* genes. *Infect Immun* 64**,** 2737-2744.

Zhang, Q., and Wise, K. S. (1997). Localized reversible frameshift mutation in an adhesin gene confers a phase-variable adherence phenotype in mycoplasma. *Mol Microbiol* 25**,** 859-869.

Zhou, J., Wang, C., Zhang, K., Wang, Y., Gong, X., Li, S., and Luo, Y. (2016). Generation of human embryonic stem cell line expressing zsgreen in cholinergic neurons using CRISPR/Cas9 system. *Neurochem Res* 41**,** 2065-2074.

Zhu, Y., Zhang, F., and Huang, Z. (2018). Structural insights into the inactivation of CRISPR-Cas systems by diverse anti-CRISPR proteins. *BMC Biol* 16**,** 32.

Zimmerman, C. U., and Herrmann, R. (2005). Synthesis of a small, cysteine-rich, 29 amino acids long peptide in *Mycoplasma pneumoniae*. *FEMS Microbiol Lett* 253**,** 315-321.

ANNEXE

Pereyre *et al. BMC Genomics* (2018) 19:525
https://doi.org/10.1186/s12864-018-4917-1

BMC Genomics

METHODOLOGY ARTICLE Open Access

Generation of *Mycoplasma hominis* gene-targeted mutants by targeting-induced local lesions in genomes (TILLING)

S. Pereyre[1,2,3*], C. Bénard[1,2,3], C. Brès[4,5], C. Le Roy[1,2], J. P. Mauxion[4,5], F. Rideau[1,2], P. Sirand-Pugnet[4,5], B. Henrich[6†] and C. Bébéar[1,2,3†]

Abstract

Background: *Mycoplasma hominis* is a human urogenital pathogen involved in gynaecological, neonatal and extra-genital infections. However, no versatile genetic tools are currently available to study the pathogenicity of this bacterium. Targeting-Induced Local Lesions IN Genomes (TILLING) is a reverse-genetic method that combines point mutations induced by chemical mutagenesis with a DNA screening technique. We used ethyl methanesulfonate (EMS) that introduces C-G to T-A transition mutations to generate a library of *M. hominis* mutants. As a proof of concept, mutagenized organisms were screened for mutations in two target genes previously associated with the mycoplasma pathogenicity, the *vaa* gene encoding an adhesin lipoprotein and the *oppA* gene encoding the main *ecto*ATPase of the bacterium. The resulting mutants were evaluated using functional assays, an adhesion to HeLa cell assay for *vaa*-mutants and an ATPase activity test for *oppA*-mutants.

Results: A 1200-clone library was generated by exposing *M. hominis* PG21 to 9 mg/mL EMS for 3 h. To identify mutants of interest, targeted gene fragments were amplified, heat-denatured, slowly reannealed and digested with the mismatch-specific endonuclease ENDO1. If multiple alleles were present in the PCR amplicons, these alleles formed heteroduplexes during reannealing that were specifically cleaved by ENDO1 at mismatching positions. A total of four *vaa*-mutants and two *oppA*-mutants harbouring missense mutations were obtained and fully sequenced. Zero to eight additional mutations were identified in the genomes of each mutant. The *vaa*-mutants were tested for adhesion to immobilized HeLa cells but their adhesion was not significantly different from the adhesion of *M. hominis* PG21. One of the two *oppA*-mutants that were tested for ATPase activity presented a higher affinity for its ATP substrate than the parental strain.

Conclusion: For the first time, we demonstrated that *M. hominis* gene-targeted mutants could be successfully obtained using this TILLING strategy. In the absence of robust genetic tools for studying *M. hominis*, the TILLING strategy that can target any gene of the genome could help to elucidate gene functions and to better understand the pathogenesis of this human pathogenic species.

Keywords: *Mycoplasma hominis*, Chemical mutagenesis, Ethyl methanesulfonate, TILLING

* Correspondence: sabine.pereyre@u-bordeaux.fr
†B. Henrich and C. Bébéar contributed equally to this work.
[1]USC-EA 3671 Mycoplasmal and Chlamydial Infections in Humans, University of Bordeaux, Campus Bordeaux Carreire, 146 rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux Cedex, France
[2]USC-EA 3671 Mycoplasmal and Chlamydial Infections in Humans, INRA, Bordeaux, France
Full list of author information is available at the end of the article

© The Author(s). 2018 **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

Background

Mycoplasma hominis is a human urogenital pathogen involved in gynaecological, neonatal and extra-genital infections [1]. The genome of the reference strain, *M. hominis* PG21, is the second smallest genome among self-replicating free-living organisms [2]. Although a conjugal transfer of the transposon Tn*916* from *Streptococcus faecalis* to *M. hominis* was reported 30 years ago [3], no versatile genetic tools are currently available for this species. Whereas *Mycoplasma arthritidis,* a phylogenetically closely related species belonging to the same Hominis group, has successfully been transformed using the PEG method [4], all attempts to transform *M. hominis* using either PEG or electroporation methods, as well as transposons, suicide plasmids or replicative plasmids have failed. Only one study reported the transformation of *M. hominis* by the plasmid pAM120 using electroporation in the 2000s [5], but the experiments could not be reproduced. A cutting-edge synthetic biology approach, which consists of cloning and subsequent engineering of *M. hominis* genome in yeast is currently under development but the back transplantation of the genome from yeast to a recipient bacterium has not been achieved yet [6]. The lack of genetic engineering tools for *M. hominis* has limited our capacity to modify its genome in order to elucidate gene functions and to understand its pathogenesis.

Chemical mutagenesis methods may offer an interesting alternative method to modify the genome of this intractable species. Targeting-Induced Local Lesions IN Genomes (TILLING) combines point mutations induced by standard chemical mutagenesis with a sensitive DNA screening technique that identifies single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the targeted gene. This reverse-genetic strategy has mainly been used in plants such as *Arabidopsis thaliana* [7], tomato [8] and *Cucurbita pepo* [9] but also in parasites such as *Toxoplasma gondii* [10]. Only one publication reported its use in a bacterium, the intracellular *Chlamydia trachomatis* species [11].

In this study, we used ethyl methanesulfonate (EMS) that introduces C-G to T-A transition mutations to generate a library of *M. hominis* mutants. As a proof of principle, mutagenized organisms were screened for mutations in two target genes, the *vaa* gene encoding the variable adherence-associated (Vaa) adhesin lipoprotein [12] and the *oppA* gene encoding the substrate binding subunit of an oligopeptide permease and the main *ecto*ATPase of the bacteria [13, 14]. The generated *vaa*- and *oppA*-mutants were fully sequenced and evaluated using two functional assays, an adhesion test to HeLa cells for *vaa*-mutants and an ATPase activity test for *oppA*-mutants.

Results

Generation of a *M. hominis* mutant library

The effect of EMS on *M. hominis* survival was assessed after contact times of 1.5 h and 3 h (Fig. 1). A positive correlation was observed between the concentration of EMS and the killing of the bacteria. The contact time with EMS also slightly affected the survival of *M. hominis*. For the generation of the mutant library, a concentration of 9 mg/ml EMS applied for 3 h that resulted in 75% killing was chosen according to the bibliography [11]. After culture filtration to avoid bacterial aggregates and plating on agar medium, 1200 individual colonies were picked, grown and frozen.

Screening of the *M. hominis* mutant library for *vaa*- and *oppA*-mutants

To screen the library for *vaa*-mutants, a 1692-bp PCR fragment of the *M. hominis* genome encompassing the 1295 nucleotides at the 5′-end of the *vaa* gene (MHO_3470, 1416 bp [2]) was targeted (Table 1, Fig. 2). To screen for *opp*A-mutants, a 1144-bp PCR fragment of the *oppA* gene encompassing the regions encoding the CS3, Walker B and Walker A domains involved in ATPase activity [14] of the OppA protein (MHO_1510, 2886 bp) was amplified (Table 1, Fig. 2).

After the screening procedure using ENDO1 nuclease, a total of six *vaa* and four *oppA M. hominis* mutants were obtained (Table 2). Four mutants were discarded: (i) two *vaa*-mutants that harboured a C to T transition located upstream of the *vaa* gene (these mutants were initially screened because the amplified DNA fragment encompassed 397 nucleotides upstream of the gene) and (ii) two *oppA*-mutants that harboured a G181068A and a G180439A silent substitution, respectively. Overall, four *vaa*-mutants (Mho66, Mho119, Mho787 and Mho1133) and two *oppA*-mutants (Mho369 and Mho940), each harbouring one amino-acid substitution in the targeted region of the *vaa* and *oppA* genes, respectively, were selected. The genomes of these six selected mutants were fully sequenced. The expected mutation was found in every mutant and zero to eight additional mutations were retrieved in the whole genome of each mutant (Table 3). Notably, mutant Mho66 harboured no additional mutation and mutant Mho369 harboured only one additional mutation in an intergenic region.

Functional assays applied to *vaa*- and *oppA*-mutants

The four *vaa*-mutants, Mho66, Mho119, Mho787 and Mho1133, and the parental PG21 *M. hominis* strain, which has a functional in-frame *vaa* gene, were tested for adhesion to HeLa cells immobilized on microtiter plates to quantify bacterial adherence. In all cases, the number of adherent *M. hominis* cells increased with the amount of *M. hominis* inoculum used in the assay

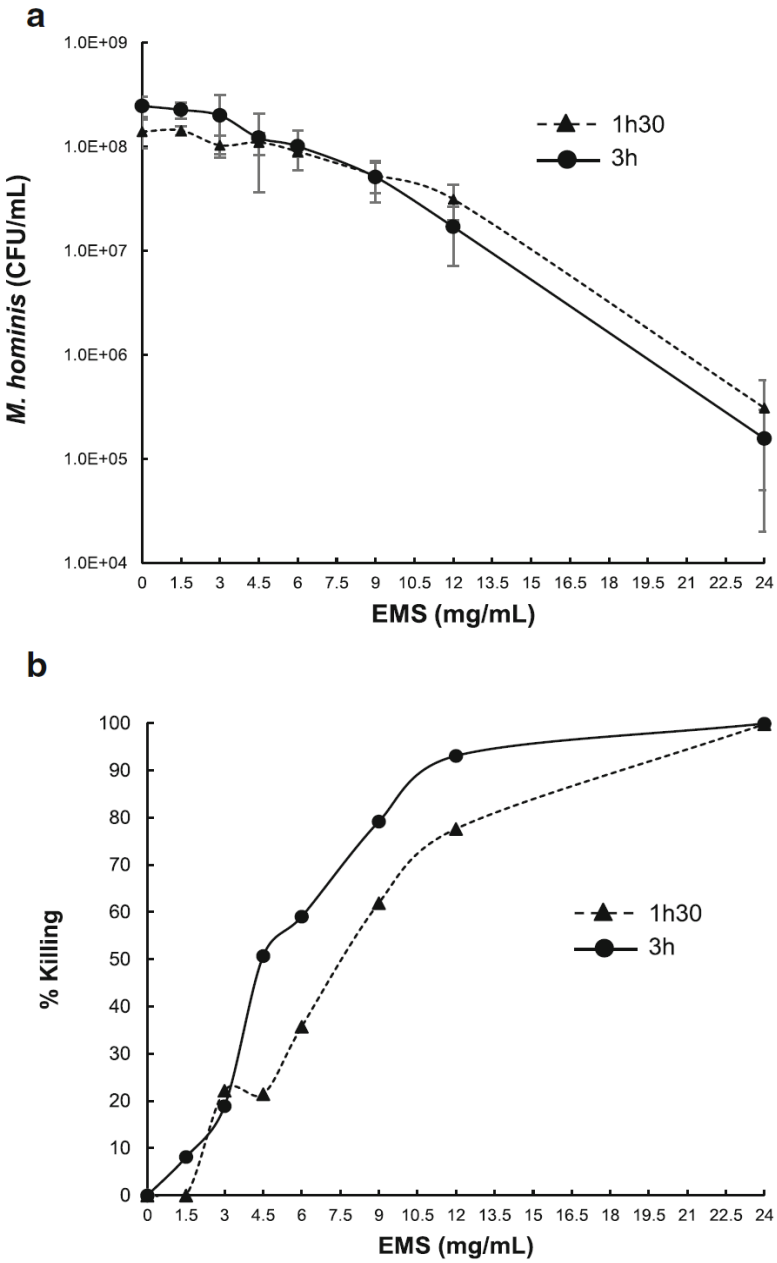


Fig. 1 Effects of EMS mutagenesis on *M. hominis* survival. Concentrations of *M. hominis* PG21 were determined after treatment with various concentration of EMS for 1.5 h and 3 h (**a**). Three independent experiments were performed. The percentage of killing was calculated (**b**). In accordance with the literature, a 75% killing rate corresponding to exposure to approximately 9 mg/ml EMS for 3 h was chosen to generate the *M. hominis* PG21 mutant library

(Fig. 3). The adhesion of the four *vaa*-mutants and the non-mutated *M. hominis* PG21 strain was not significantly different ($p = 0.73$, Kruskal-Wallis test).

The two *oppA*-mutants, Mho369 and Mho940, and the parental PG21 strain were tested for ATPase activity (Fig. 4) during which the kinetics of ATP hydrolysis were analysed by measuring the release of free phosphate [14]. Both mutants had a higher V_{max} than *M. hominis* PG21 and the Mho369 mutant had the lowest Michaelis-Menten K_m constant, although the 95% confidence intervals were overlapping.

Discussion

Because the transformation of *M. hominis* PG21 has so far been elusive, chemical mutagenesis using EMS appears to be an alternative option to create gene-targeted

Table 1 Oligonucleotides used in this study

Primer target and designation	Primer sequence	Product size (bp)
vaa gene[a]		
VaaPG21-FE	5′-AATGGGATAGTTAGTAAAGTCGG-3′	1983
VaaPG21-RE	5′-AACCCTACCATTGTCGCTAAGA-3′	
VaaPG21-FE-IRD700	5′-IRD700-AATGGGATAGTTAGTAAAGTCGG-3′	1692
VaaPG21-RI-IRD800	5′-IRD800-GAAAAATCTCCTCGTGCTGATG-3′	
oppA gene		
OppAPG21-FE	5′-GACAGTGGAAAAGCAGACAC-3′	1524
OppAPG21-RE	5′-AGGAACTAAAATGTCCGGGT-3′	
OppAPG21-FI-IRD700	5′-IRDye700- CATCTTCTGGCCAAGCAACT – 3′	1144
OppAPG21-RI-IRD800	5′-IRDye800-CAGTCTTGGTATGAATCAAC-3′	

[a]VaaPG21-FE and VaaPG21-RE primers are located upstream and downstream the *vaa* gene, respectively

mutants. In several organisms, a positive correlation was observed between the concentrations of EMS applied, the killing of the organism and the mutation frequency obtained [8, 11]. Only one study has reported the generation of EMS mutants and TILLING strategy in bacteria. Indeed, to generate *C. trachomatis* mutants using EMS, the concentration of EMS that generated a single C-G base pair mutation per genome corresponded to a 75% killing. Because we also observed a positive correlation between the concentration of EMS and the killing of *M. hominis*, we decided to choose, for the generation of the library, the concentration of EMS that killed approximately 75% of the *M. hominis* population, i.e. 9 mg/ml applied for 3 h.

Using these conditions, we demonstrated, after screening the 1200-clone library, that four and two *M. hominis* mutants were successfully generated in two targeted genes previously associated with the bacterium's pathogenicity, the *vaa* gene involved in cytadherence [12] and the *oppA* gene involved in oligopeptide binding and the *ecto*ATPase activity [13, 15], respectively. Because the ATPase activity of the OppA protein is due mainly to the CS3, Walker B and Walker A gene regions [14], a fragment of 1144 bp encompassing these regions was chosen. Regarding the *vaa* gene, a 1692-bp fragment encompassing the 5′-end conserved region of the gene was targeted for this proof of concept experiment because an early premature stop in protein synthesis would have had the greatest effect on loss of Vaa-mediated cytoadhesion. To our knowledge, the substitutions that were found in the mutated Vaa and OppA have never been reported in the alleles present in other *M. hominis* strains.

The four *vaa*-mutants were tested for adhesion to immobilized HeLa cells [14]. Unfortunately, the

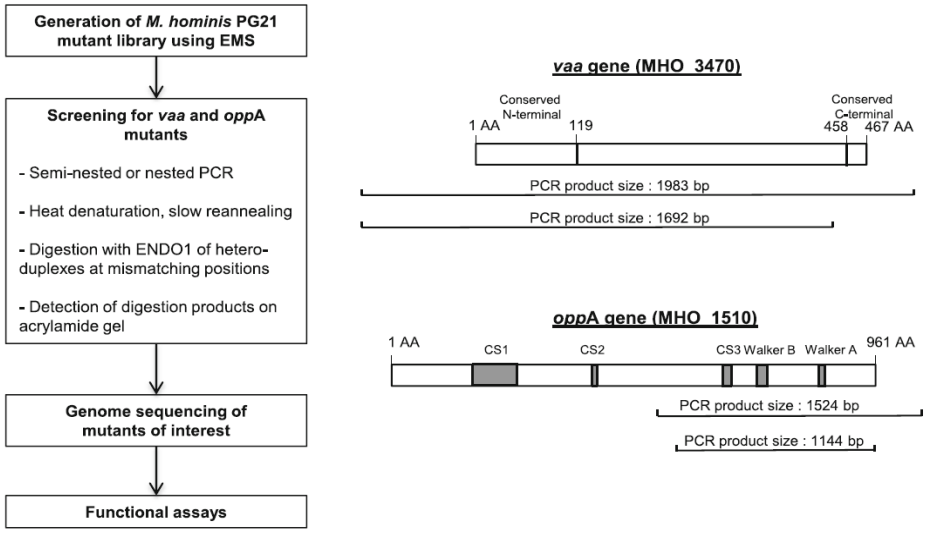


Fig. 2 Schematic representation of the TILLING strategy used in this study

Table 2 *vaa*- and *oppA*-mutants obtained by screening the 1200 EMS-generated *M. hominis* clone library

Mutant designation	Targeted gene	Nucleotide substitution[a]	Amino-acid substitution[b]	Comments
Mho66	*vaa*	G410726A	Glu54Lys	
Mho119	*vaa*	C411332T	Leu328Phe	
Mho787	*vaa*	C410526A	Pro59His	
Mho864	*vaa*	C410197T	none	Mutation located upstream of the *vaa* gene (intergenic region)
Mho1055	*vaa*	C410154T	none	Mutation located upstream of the *vaa* gene (intergenic region)
Mho1133	*vaa*	G410726A	Gly126Ser	
Mho258	*oppA*	G181068A	Leu813Leu	Silent mutation
Mho369	*oppA*	G180439A	Asp604Asn	
Mho785	*oppA*	C181239T	Asp870Asp	Silent mutation
Mho940	*oppA*	G180634A	Glu669Lys	

[a]Nucleotide substitutions are numbered according to the *M. hominis* PG21 genome (GenBank accession number FP236530)
[b]Amino acid substitutions are numbered from the N-terminal end of the targeted protein

adhesion of the four mutants did not show any significant difference with the adhesion of the parental *M. hominis* PG21 strain. However, because *M. hominis* harbours several adhesin proteins such as the P120 lipoprotein and the Lmp-related proteins [16], this adhesion assay may not be sensitive enough to detect a potential adhesion decrease caused by the mutation of the Vaa protein. A control strain with an inactivated Vaa protein or a phase variable "OFF" variant would be necessary to determine whether the sensitivity of this assay was

Table 3 Mutations harboured by EMS-generated *M. hominis* mutants in comparison to the sequence of the *M. hominis* PG21 strain not exposed to EMS

Mutant designation	Expected mutation[a] (gene, position in the gene)	Other mutations in the genome[a] (Locus, gene)	Number of additional mutations
Mho66	G410726A (*vaa*, 376)	none	0
Mho119	C411332T (*vaa*, 982)	- C230929T (intergenic) - C316577T (MHO_2640, CHP) - G463593A (MHO_3770, *licA*, Protein LicA homolog) - G494526A (MHO_3990, *nusG*, Transcription antitermination protein)	4
Mho787	C410526A (*vaa*, 176)	- C5000T (MHO_0050, *dnaN*, DNA polymerase III beta chain) - C44025T (MHO_0340, *ktrA*, Potassium uptake protein KtrA) - C172081T (MHO_1460, *rpsG*, 30S ribosomal protein S7) - C258548T (MHO_2150, *rpoD*, RNA polymerase sigma factor) - C283090T (MHO_2320, ABC transporter, ATP-binding protein) - G288972A (MHO_2370, tRNA/rRNA methyltransferase) - C441828T (MHO_3650, *asnA*, Aspartate-ammonia ligase) - C571686T (MHO_4600, *pyrH*, Uridylate kinase)	8
Mho1133	G410726A (*vaa*, 376)	- G179389A (MHO_1510, *oppA*) - C206418T (MHO_1700, *recU*, Recombination protein U homolog) - C381191T (MHO_3200, CHP, Hypothetical lipoprotein) - G462316A (MHO_3760, *gyrB*, DNA gyrase subunit B) - G490546A (intergenic) - C644067T (MHO_5190, *pip*, Proline iminopeptidase)	6
Mho369	G180439A (*oppA*, 1813)	- G230779A (intergenic)	1
Mho940	G180634A (*oppA*, 2008)	- G136127A (MHO_1080, ATB-binding protein) - G138607A (MHO_1090, HP) - G203092A (MHO_1670, *cmk*, Cytidylate kinase) - G211597A (MHO_1740, *oppB*, Oligopeptide transport system permease protein) - A227310G (MHO_1880, *aspS*, Aspartyl-tRNA synthetase) - G357674A (MHO_3060, *leuS*, Leucyl-tRNA synthetase) - G371725A (MHO_3130, *atpA*, F1-likeX0) - G649646C (MHO_5220, *hsdS*, Type I restriction enzyme specificity protein)	8

[a]mutations are numbered according to the *M. hominis* PG21 genome (GenBank accession number FP236530)
CHP conserved hypothetical protein, *HP* hypothetical protein

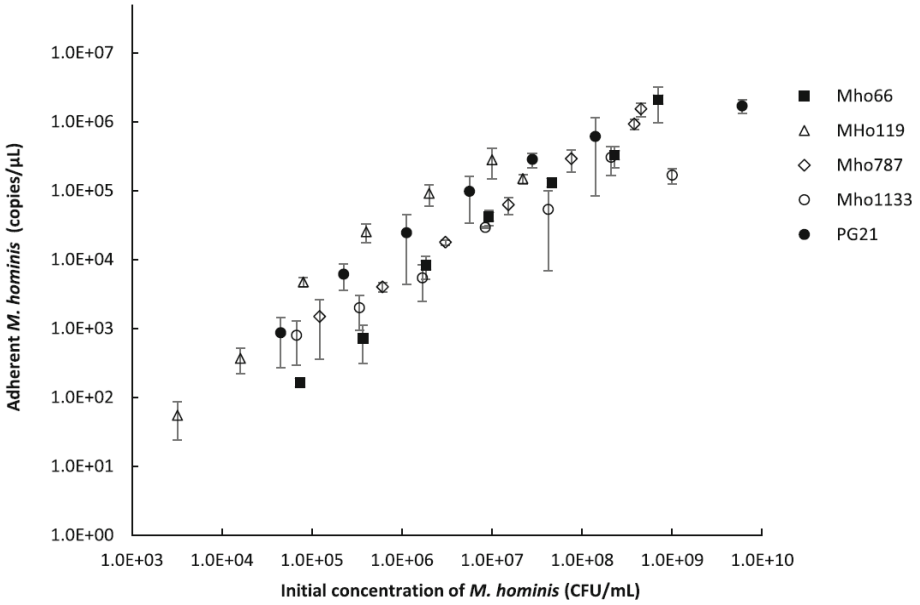
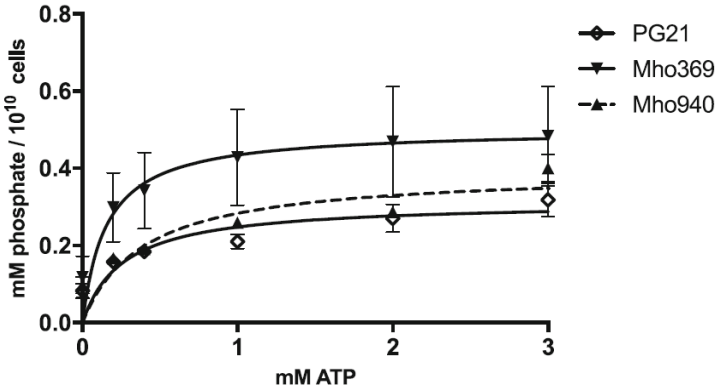


Fig. 3 Adhesion to HeLa cells of EMS-generated *M. hominis vaa*-mutants. *M. hominis* cells were added to immobilized HeLa cells in triplicate and incubated 4 h at 37 °C. After removal of unbound *M. hominis* cells by washing, the adherent *M. hominis* cells were quantified by real-time PCR. One representative experiment of three is shown

accurate. Analysis of the *vaa* gene sequence of the *M. hominis* PG21 genome showed that C-G to T-A EMS-generated transitions could theoretically create 23 stop codons, leading to truncated proteins. Thus, enlarging our EMS library may generate null mutants.

Regarding the two *oppA*-mutants, mutant Mho369 was of interest because (i) it harboured only one additional mutation in an intergenic region of its genome, suggesting that the observed phenotype could be attributed to the EMS-generated *oppA* mutation with a high



	PG21	Mho369	Mho940
V_{max} [95%IC]	**0.3133** [0.2474-0.3792]	**0.5013** [0.3177-0.6849]	**0.3938** [0.3151-0.4724]
K_m [95%IC]	**0.2642** [0.0325-0.4959]	**0.1546** [0.00-0.4529]	**0.3898** [0.1091-0.6704]

Fig. 4 *ecto*ATPase activity of EMS-generated *M. hominis oppA*-mutants. *ecto*ATPase activity of EMS-generated Mho369 and Mho940 *M. hominis* mutants and of *M. hominis* PG21 parental strain was determined by measuring the release of free phosphate per 10^{10} cells as a function of the ATP concentration. The data represent the means and standard errors of five (Mho369) and four (Mho940 and PG21) independent experiments with triplicate samples in each experiment. V_{max}, maximum rate, K_m, Michaelis-Menten constant, 95% IC, 95% confidence interval

degree of certainty and (ii) it had a higher V_{max} and a lower K_m than *M. hominis* PG21, although 95% confidence intervals were overlapping. This finding suggests that Mho369 may have the capacity to hydrolyse ATP with a higher turnover. This mutant harboured an aspartic acid-to-asparagine substitution located upstream of the CS3 motif, known to be involved in the ATPase activity of the protein [14]. Further studies such as cloning, expression and analysis of the mutated OppA protein could be informative in future works. Nevertheless, although recombinant OppA-mutant proteins have previously been generated [14], *oppA*-mutated *M. hominis* cells had never been obtained before. Since OppA is involved in *M. hominis* pathogenicity [13, 15], such mutated *M. hominis* cells will allow for the characterization of the effect of single amino-acid changes in OppA on the pathogenicity of the mycoplasma.

The TILLING strategy used in this study presents some advantages and some drawbacks. The principal advantage is its capacity to generate gene-targeted mutants in species such as *M. hominis* that are difficult to genetically manipulate. The ultimate goal of the method is to generate null mutants. All genes could be potentially targeted except those genes that are essential for growth in vitro, and thus cannot be targeted for null mutations. In addition, once a library has been generated, it can be reused to search for mutants in other genes of interest. However, this method is labour-intensive, both for the generation of the library and its handling. The 1200-clone library generated in this study was not representative of the whole *M. hominis* genome and the isolation of a null mutant of Vaa and OppA was not achieved. Sequencing the whole genome of the selected mutants is necessary to check for additional mutations that could have been created in other regions of the chromosome. Indeed, the occurrence of multiple mutations in the same clone may be disruptive for functional studies. However, in a future use of the TILLING strategy, whole genome sequencing will only have to be performed on mutants presenting interesting phenotypes upon functional assays. In the present study, only one of the six sequenced mutants had no other mutation in the genome. Because one to eight additional mutations were present in the five other mutants, it is likely that the concentration and/or the EMS exposure time with *M. hominis* should be decreased slightly in future experiments. Decreasing these parameters would require screening more than 1200 clones to select for a mutant, which would increase the workload of the method. However, the technical improvement of robotic colony pickers may unlock this limitation, making the TILLING strategy a broader avenue for the functional genomic of intractable bacteria.

Conclusion

Although genetic manipulations are still hardly achievable in *M. hominis*, targeted mutants were successfully generated using the TILLING strategy. Further experiments are needed to adjust the conditions of EMS mutagenesis to limit the mutation frequency to one mutation per genome, but this strategy will be helpful to elucidate the gene functions and to better understand the pathogenesis of this human urogenital species.

Methods

EMS mutagenesis of *M. hominis* PG21

The *M. hominis* PG21 reference strain (ATCC 23114) was grown in Hayflick broth supplemented with arginine (hereafter named Hayflick arginine medium) [17]. One millilitre of a culture of *M. hominis* PG21 ranging between 1×10^8 and 3×10^8 colony forming unit (CFU)/ml was exposed to concentrations of EMS ranging from 0 to 24 mg/ml for 1.5 h and 3 h at room temperature, including a 30-min centrifugation step at 15,000 *g*. Pellets were resuspended in 1 ml of Hayflick arginine medium, and *M. hominis* concentration was determined by plating on Hayflick agar plates to assess *M. hominis* survival.

To generate the mutant library, a 10^8 CFU/ml *M. hominis* culture was exposed to EMS, filtered on 0.45 µm sterile mixed cellulose ester membrane (Millex-HA, Merck Millipore, Cork, Ireland), and 10^{-1} to 10^{-4} serial dilutions in Hayflick arginine medium were plated on Hayflick agar plates. After 48 h at 37 °C under 5% CO_2, individual colonies were picked and grown in 1 ml of Hayflick arginine medium until the colour changed. A total of 800 µl of the latter culture was frozen at − 80 °C, and 200 µl was used for DNA extraction.

Screening for *vaa*- and *oppA*-mutants in *M. hominis*

Two hundred microliters from four distinct clone cultures were pooled together before DNA extraction using the MagNA Pure 96 DNA and Viral NA Small Volume kit on the MagNA Pure 96 instrument (Roche Diagnostics, Meylan, France). DNA extraction was also performed on 200 µl of each of four single clone cultures when a mutated pool of clones was identified.

PCR fragments of 1692 bp and 1144 bp in regions of interest of the *vaa* and the *oppA* genes were amplified by semi-nested and nested PCR, respectively, using primers presented in Table 1. The first round of PCR was performed on a CFX96 real-time PCR detection system (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) in a final volume of 25 µl using 2.5 µM of tartrazine 10X buffer (50 mM Tris HCl pH 8, 500 µg/ml bovine serum albumin, 0.5% Ficoll, 1% sucrose, 30 mM KCl, 3 mM $MgCl_2$, 1 mM tartrazine), 0.1 µM of each primer, 120 µM dNTP, 0.0005 U of GoTaq® qPCR Master Mix (Promega, Madison, WI, USA), and 1 µl of DNA extract.

The amplification conditions were 3 min at 95 °C followed by 35 cycles of 15 s at 95 °C, 20 s at 58–68 °C, 2 min at 72 °C then 10 min at 72 °C. The second round of PCR was performed using 0.5 μl from the first PCR and IRD700- and IRD800-labelled primers (Table 1). After checking accurate amplification by agarose gel electrophoresis, 5 μl of the PCR products was used to screen for *vaa*- and *oppA*-mutants. PCR amplicons were heat-denatured 3 min at 95 °C and slowly reannealed using a temperature gradient from 95 °C to 8 °C (0.1 °C/s) before a 4 °C final step. The reannealed amplicons were digested using ENDO1 nuclease at 0.33 U/μl, prepared as previously reported [8], for 20 min at 45 °C and cooled to 4 °C to stop the enzyme activity. At this step, if multiple alleles were present in the PCR amplicons, these alleles formed heteroduplexes during reannealing that were specifically cleaved by ENDO1 at mismatching positions. The digested amplicons were purified and dried as described previously [18].

SNP screening was performed using a LiCOR® DNA analyser as previously described [19]. Pools of clones containing *vaa*- and *oppA*-mutants were identified by the appearance of lower-mass DNA digestion products after electrophoresis on a 6.5% acrylamide gel. The PCR products of *vaa* or *oppA* genes from the four individual clones of the mutated pool were sequenced by Sanger method (Eurofins Genomics, Ebersberg, Germany) to identify the mutated clone and the mutation type.

M. hominis genome sequencing

The genomic DNA from four *vaa*-mutants, two *oppA*--mutants and from the *M. hominis* PG21 parental strain was extracted using NucleoBond® AXG100 columns (Macherey-Nagel, Düren, Germany) and the NucleoBond® buffer Set III (Macherey-Nagel). The genomes were sequenced using paired-end V2 2X250 bp sequencing on MiSeq Illumina apparatus (San Diego, CA, USA) after generating the genomic DNA libraries using the of Nextera XT DNA Library Preparation Kit (Illumina). About 160,000 to 200,000 paired reads were obtained for each genome. Data processing including quality check, trimming, alignment with BWA (Galaxy Version 1.2.3) and variant calling using Varscan (Galaxy Version 0.1) was performed using Galaxy at https://usegalaxy.org/ [20].

Adhesion to HeLa cell assay

M. hominis adhesion to immobilized HeLa cells was performed as previously reported with some modifications [14]. A calibrated culture of each *M. hominis* mutant, with concentrations ranging between 1×10^8 and 4×10^8 CFU/ml, was concentrated 10 times by centrifugation and serially diluted 1:5 in Hayflick arginine medium. Fifty microliters of each dilution was incubated in triplicate with HeLa cells that had been lysine-coated on 96-well microplates in 50 μl of Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 1% fetal bovine serum (DMEM-FBS) for 4 h at 37 °C. Unbound *M. hominis* cells were removed by three washings with DMEM-FBS. Adherent *M. hominis* cells were lysed using 20 μl of proteinase K 20 mg/ml from the NucleoSpin® Tissue kit (Macherey-Nagel) for 1 h at 56 °C and DNA was extracted using the MagNA Pure 96 DNA and Viral NA Small Volume kit on the MagNA Pure 96 instrument (Roche Diagnostics). A quantitative real-time PCR targeting the *yidC* gene of *M. hominis* was then performed as previously described [21]. The non-parametric Kruskal-Wallis test was used to compare the adhesion of mutants and the PG21 parental strain. A significant *p*-value was set at < 0.05.

ATPase activity test

The ATPase assay was conducted by incubating *M. hominis* cells with ATP and subsequently using an ammonium molybdate solution to quantify the emerging free phosphates [13]. *M. hominis* cells were collected from 10 ml of logarithmic growth culture by centrifugation (6700 *g* for 10 min at 6 °C), washed twice in buffer A (120 mM NaCl, 5 mM KCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7.5) and resuspended in 1.2 ml of buffer A. *M. hominis* cells were quantified by Taqman PCR as published earlier [22]. Triplicates of 20 μl of mycoplasma cell suspension and 20 μl of buffer A (as negative control) were each adjusted to 0, 0.2, 0.4, 1, 2 or 3 mM ATP and immediately assayed for free phosphate (to estimate phosphate background of mycoplasma suspension) or incubated for 4 h at 37 °C.

Hydrolysis of ATP was terminated by adding 200 μl of malachite green reagent (5.72% [*w*/*v*] ammonium molybdate in 6 N HCl, 2.32% [w/v] polyvinyl alcohol, 0.0812% [w/v] malachite green, and distilled water at a ratio of 1:1:2:2). The relative absorbance of the samples was measured in relation to a blank at 620 nm (Tecan Rainbow, SLT Labinstruments, Crailsheim, Germany). Inorganic phosphate at concentrations ranging from 1 to 20 nmol was used as quantification standard. Values of ATPase activity of *M. hominis* expressed as the release of nmol phosphate were corrected for the phosphate background of ATP, adjusted to 10^{10} *M. hominis* cells and used in the Michaelis-Menten equation to calculate the values of V_{max} and K_m using the Graph Pad Prism 6.01 software.

Abbreviations

C. trachomatis: *Chlamydia trachomatis*; CHP: Conserved hypothetical protein; EMS: Ethyl methanesulfonate; HP: Hypothetical protein; *M. hominis*: *Mycoplasma hominis*; TILLING: Targeting-Induced Local Lesions IN Genomes

Acknowledgements
The authors thank E. Chancerel for genome sequencing.

Funding
This study was mainly supported by internal funding. Genome sequencing was performed at the Genome Transcriptome Facility of Bordeaux (PGTB, https://pgtb.cgfb.u-bordeaux.fr/) that is supported by grants from the Conseil Régional d'Aquitaine n°20030304002FA and 20040305003FA, from the European Union FEDER n°2003227 and from Investissements d'Avenir ANR-10-EQPX-16-01. PGTB staff produced genome sequences of the *M. hominis* mutants and provided the corresponding FastQ files.

Availability of data and materials
The PG21 *M. hominis* reference strain and the EMS-generated *M. hominis* mutant sequence information were deposited in NCBI Sequence Read Archive (SRA) with the following accession numbers: PG21 (ATCC 23114) SRX4325267, Mho66 SRX4325266, Mho119 SRX4325269, Mho369 SRX4325268, Mho787 SRX4325264, Mho940 SRX4325263 and Mho1133 SRX4325265.

Authors' contributions
SP, PSP, BH and CBéb conceived and designed the study. SP, CBén, CBr, CLR, JPM, FR and BH conducted the experiments and performed data analysis. SP wrote the manuscript with contributions from CBr, PSP, BH and CBéb. All authors read and approved the final manuscript.

Ethics approval and consent to participate
Not applicable. No human samples and no animals were used.
The *M. hominis* PG21 reference strain was from ATCC (ATCC 23114). The HeLa cells were Human cervical carcinoma cell line HeLa S3 (ATCC CCL2.2).

Consent for publication
Not applicable.

Competing interests
The authors declare that they have no competing interests.

Publisher's Note
Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Author details
[1]USC-EA 3671 Mycoplasmal and Chlamydial Infections in Humans, University of Bordeaux, Campus Bordeaux Carreire, 146 rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux Cedex, France. [2]USC-EA 3671 Mycoplasmal and Chlamydial Infections in Humans, INRA, Bordeaux, France. [3]Bacteriology department, French National Reference Center for bacterial STI, CHU Bordeaux, Bordeaux, France. [4]UMR 1332 BFP, INRA, Univ. Bordeaux, F-33140 Villenave d'Ornon, France. [5]Bordeaux Genome-Transcriptome Facility, F-33610 Cestas, France. [6]Institute of Medical Microbiology and Hospital Hygiene, Medical Faculty of the Heinrich-Heine-University Duesseldorf, Düsseldorf, Germany.

Received: 20 April 2018 Accepted: 3 July 2018
Published online: 09 July 2018

References

1. Waites K, Talkington D. New developments in human diseases due to mycoplasmas. Mycoplasmas: Molecular Biology, Pathogenicity, and Strategies for Control; 2005. p. 289–354.
2. Pereyre S, Sirand-Pugnet P, Beven L, Charron A, Renaudin H, Barré A, Avenaud P, Jacob D, Couloux A, Barbe V, et al. Life on arginine for *Mycoplasma hominis*: clues from its minimal genome and comparison with other human urogenital mycoplasmas. PLoS Genet. 2009;5(10):e1000677.
3. Roberts MC, Kenny GE. Conjugal transfer of transposon Tn*916* from *Streptococcus faecalis* to *Mycoplasma hominis*. J Bacteriol. 1987;169(8):3836–9.
4. Dybvig K, French CT, Voelker LL. Construction and use of derivatives of transposon Tn*4001* that function in *Mycoplasma pulmonis* and *Mycoplasma arthritidis*. J Bacteriol. 2000;182(15):4343–7.
5. Aleksandrova NM, Bevova MR, Govorun VM. Transformation of *Mycoplasma hominis* with plasmid pAM120 through electroporation. Russ J Genet. 2000; 36(3):237–40.
6. Rideau F, Le Roy C, Descamps ECT, Renaudin H, Lartigue C, Bébéar C. Cloning, stability, and modification of *Mycoplasma hominis* genome in yeast. ACS Synth Biol. 2017;6(5):891–901.
7. McCallum CM, Comai L, Greene EA, Henikoff S. Targeted screening for induced mutations. Nat Biotechnol. 2000;18(4):455–7.
8. Okabe Y, Asamizu E, Saito T, Matsukura C, Ariizumi T, Bres C, Rothan C, Mizoguchi T, Ezura H. Tomato TILLING technology: development of a reverse genetics tool for the efficient isolation of mutants from micro-tom mutant libraries. Plant Cell Physiol. 2011;52(11):1994–2005.
9. Vicente-Dolera N, Troadec C, Moya M, del Rio-Celestino M, Pomares-Viciana T, Bendahmane A, Pico B, Roman B, Gomez P. First TILLING platform in *Cucurbita pepo*: a new mutant resource for gene function and crop improvement. PLoS One. 2014;9(11):e112743.
10. Farrell A, Coleman BI, Benenati B, Brown KM, Blader IJ, Marth GT, Gubbels MJ. Whole genome profiling of spontaneous and chemically induced mutations in *Toxoplasma gondii*. BMC Genomics. 2014;15:354.
11. Kari L, Goheen MM, Randall LB, Taylor LD, Carlson JH, Whitmire WM, Virok D, Rajaram K, Endresz V, McClarty G, et al. Generation of targeted *Chlamydia trachomatis* null mutants. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011;108(17):7189–93.
12. Boesen T, Emmersen J, Baczynska A, Birkelund S, Christiansen G. The *vaa* locus of *Mycoplasma hominis* contains a divergent genetic islet encoding a putative membrane protein. BMC Microbiol. 2004;4(1):37.
13. Hopfe M, Henrich B. OppA, the substrate-binding subunit of the oligopeptide permease, is the major Ecto-ATPase of *Mycoplasma hominis*. J Bacteriol. 2004;186(4):1021–8.
14. Hopfe M, Dahlmanns T, Henrich B. In *Mycoplasma hominis* the OppA-mediated cytoadhesion depends on its ATPase activity. BMC Microbiol. 2011;11:185.
15. Hopfe M, Henrich B. OppA, the ecto-ATPase of *Mycoplasma hominis* induces ATP release and cell death in HeLa cells. BMC Microbiol. 2008;8(1):55.
16. Ladefoged SA. Molecular dissection of *Mycoplasma hominis*. APMIS. 2000; 108(Suppl. 97:5–45.
17. Waites KB, Bébéar CM, Roberston JA, Talkington DF, Kenny GE. Cumitech 34, laboratory diagnosis of mycoplasmal infections. In: Nolte FS, editor. Cumitech. Washington D. C: American Society for Microbiology. p. 2001.
18. Till BJ, Zerr T, Comai L, Henikoff S. A protocol for TILLING and Ecotilling in plants and animals. Nat Protoc. 2006;1(5):2465–77.
19. Triques K, Piednoir E, Dalmais M, Schmidt J, Le Signor C, Sharkey M, Caboche M, Sturbois B, Bendahmane A. Mutation detection using ENDO1: application to disease diagnostics in humans and TILLING and eco-TILLING in plants. BMC Mol Biol. 2008;9:42.
20. Afgan E, Baker D, Batut B, van den Beek M, Bouvier D, Cech M, Chilton J, Clements D, Coraor N, Gruning BA, et al. The galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2018 update. Nucleic Acids Res. 2018
21. Férandon C, Peuchant O, Janis C, Benard A, Renaudin H, Pereyre S, Bébéar C. Development of a real-time PCR targeting the *yidC* gene for the detection of *Mycoplasma hominis* and comparison with quantitative culture. Clin Microbiol Infect. 2011;17(2):155–9.
22. Mobius N, Brenneisen W, Schaeffer A, Henrich B. Protocol for the rapid detection of the urogenital tract mollicutes and *Chlamydia* with concomitant LGV-(sub)typing. Methods Mol Biol. 2012;903:235–53.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more biomedcentral.com/submissions

BMC

Development of genetic tools for *Mycoplasma hominis* with synthetic biology approach.

Mycoplasma hominis is an opportunistic human pathogen responsible for genital and neonatal infections. Genetically modifying this bacterium is necessary to understand the virulence and infection mechanisms of this pathogen. There is currently no effective molecular tool to engineer the genome of this bacterium, limiting research on its pathogenicity and its peculiar metabolism based on arginine.

New technologies have recently emerged in the field of Synthetic Biology (BS), offering new perspectives for the study of mycoplasmas by allowing large scale genome modifications and the production of mutant strains. Work at the J. Craig Venter Institute (JCVI, USA) has shown that the genome of related mycoplasmas can be cloned and manipulated in yeast before being transplanted into a recipient cell. The yeast serves as a temporary host to modify the genome of the bacterium. This innovative approach opens many perspectives in the development of functional genomics in mycoplasmas for which there are few effective genetic tools. The goal of this thesis was to adapt a number of BS tools to *M. hominis* for the first time, in order to create mutants deficient for a given function.

To achieve this goal, the genome of the *M. hominis* type strain PG21 (665 kb) was cloned into the yeast *Saccharomyces cerevisiae* by Transformation-Associated Recombination cloning (TAR-cloning). Two yeast clones (B3-2 and B3-4) possessing the complete genome of *M. hominis* were validated by simplex PCR, multiplex PCR and Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) analyses. These yeast clones were then propagated in a selective medium for 180 generations (30 passages) to evaluate the stability of the bacterial genome in its host. This experiment showed that (i) the size of the genome of *M. hominis* did not change during the first passages, it decreased progressively from the tenth passage (≈60 generations), and (ii) the enriched genome areas in repeated sequence were preferentially lost. Thus, the genome of *M. hominis* was modified in the B3-4 clone at early passages using the Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/Cas9 (CRISPR/Cas9) technology. Yeast clones with a complete *M. hominis* PG21 genome with a deleted *vaa* gene, encoding a major adhesion protein, were produced using this approach.

The final step of this approach was to transplant the modified genome into a recipient cell of *M. hominis* or *Mycoplasma arthritidis*, the species phylogenetically closest to *M. hominis*. As no *M. hominis* transformation protocol was available at the beginning of our work, this step constituted a major obstacle in the implementation of BS tools in this species. This barrier has been partially lifted since a method of transformation of *M. hominis* based on polyethylene glycol (PEG) and involving the plasposon pMT85 (plasmid carrying a transposon conferring resistance to tetracycline) has been developed in the laboratory.

This transformation technique, developed for the reference strain *M. hominis* M132 (745 kb) still remains not very efficient; it is nevertheless reproducible and allowed to obtain *M. hominis* mutants of interest. The *Mhom132_2390* gene, encoding the precursor of the P75 protein, a putative adhesin of *M. hominis*, was effectively mutated in transformant No. 28-2. Complete genome sequencing of other transformants revealed the insertion of multiple copies of the transposon and the presence of duplication and inversion of large DNA fragments within at least two *M. hominis* genomes.

In conclusion, this data has opened the way for the development and transposition of existing genetic modification approaches to *M. hominis*, previously considered as a genetically intractable bacterium.

Keywords: *Mycoplasma hominis* / Synthetic Biology / CRISPR/Cas9 / Transformation

---

USC EA3671 Infections humaines à mycoplasmes et à chlamydiae
Professeur Cécile Bébéar
Université de Bordeaux, campus carreire
146 rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux cedex, France

Développement d'outils génétiques chez *Mycoplasma hominis via* la biologie de synthèse.

Mycoplasma hominis est un pathogène humain opportuniste responsable d'infections génitales et néo-natales. Modifier génétiquement cette bactérie est nécessaire afin de comprendre les mécanismes de virulence et d'infection de ce pathogène. Il n'existe à ce jour aucun outil moléculaire efficace permettant de manipuler le génome de *M. hominis*, limitant les recherches sur sa pathogénicité et son métabolisme particulier reposant sur l'arginine.

De nouvelles technologies rassemblées sous le terme de Biologie de Synthèse (BS) ont récemment émergé, offrant des perspectives inédites pour l'étude des mycoplasmes en permettant de modifier leurs génomes à grande échelle et de produire des souches mutantes. Ces travaux menés au J. Craig Venter Institute (JCVI, USA) ont montré que le génome de mycoplasmes apparentés pouvait être cloné et manipulé dans la levure avant d'être transplanté dans une cellule receveuse. La levure sert d'hôte d'accueil temporaire pour modifier le génome de la bactérie. Cette approche novatrice ouvre de nombreuses perspectives dans le cadre du développement de la génomique fonctionnelle chez les mycoplasmes pour lesquels les outils génétiques efficaces sont peu nombreux. Le but de cette thèse a été d'adapter pour la première fois certains outils de BS à *M. hominis* dans le but de créer des mutants déficients pour une fonction donnée. Pour cela, le génome de la souche type de *M. hominis* PG21 (665 kb) a été cloné dans la levure *Saccharomyces cerevisiae* par « Transformation-Associated Recombination cloning » (TAR-cloning). Deux clones (B3-2 et B3-4) de levure possédant le génome complet de *M. hominis* ont été validés par analyse en PCR simplex, PCR multiplex et électrophorèse en champs pulsé (PFGE). Ces clones levures ont ensuite été propagés en milieu sélectif durant 180 générations (30 passages), afin d'évaluer la stabilité du génome bactérien dans son hôte. Cette expérience a montré que (i) si la taille du génome de *M. hominis* ne variait pas au cours des premiers passages, elle diminuait progressivement à partir du dixième passage (≈60 générations), et que (ii) les zones du génome enrichies en séquence répétées étaient préférentiellement perdues. En tenant compte de ces résultats, le génome de *M. hominis* a été modifié chez le clone B3-4 par la technique « Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/Cas9 » (CRISPR/Cas9) lors de passages précoces. Des clones de *S. cerevisiae* possédant un génome de *M. hominis* PG21 complet délété du gène *vaa*, codant une protéine d'adhésion majeure, ont été ainsi produits. La dernière étape de cette approche consistait à transplanter le génome modifié dans une cellule receveuse de *M. hominis* ou de *Mycoplasma arthritidis*, espèce phylogénétiquement la plus proche de *M. hominis*. Aucun protocole de transformation de *M. hominis* n'étant disponible au début de nos travaux, cette étape constituait un verrou majeur dans la mise en place des outils de BS chez cette espèce. Ce verrou a été en partie levé puisqu'une méthode de transformation de *M. hominis* basée sur du polyéthylène glycol (PEG) et mettant en jeu le plasposon pMT85 (plasmide contenant un transposon conférant la résistance à la tétracycline) a été mise au point au laboratoire. Cette technique de transformation, développée pour la souche de référence *M. hominis* M132 (745 kb) reste encore peu efficace ; elle est néanmoins reproductible et a permis d'obtenir des mutants d'intérêt de *M. hominis*. Le transformant n°28-2 a, ainsi, été muté dans le gène *Mhom132_2390*, codant le précurseur de la protéine P75, une adhésine putative de *M. hominis*. Le séquençage des génomes complets d'autres transformants a révélé l'insertion de multiples copies du transposon et la présence d'évènements de duplication et d'inversion de larges fragments d'ADN dans au moins deux génomes de *M. hominis*.

En conclusion, nos travaux ont permis d'ouvrir la voie au développement et à la transposition d'approches de modifications génétiques existantes chez *M. hominis*, jusqu'alors considéré comme bactérie génétiquement non manipulable.

Mots clés : *Mycoplasma hominis* / Biologie de synthèse / CRISPR/Cas9 / Transformation

---

USC EA3671 Infections humaines à mycoplasmes et à chlamydiae
Professeur Cécile Bébéar
Université de Bordeaux, campus carreire
146 rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux cedex, France