



Caractérisation d'éléments conjugatifs intégratifs (ICE) chez *Mycoplasma hominis*

Alexandra Meygret

► To cite this version:

Alexandra Meygret. Caractérisation d'éléments conjugatifs intégratifs (ICE) chez *Mycoplasma hominis*. Médecine humaine et pathologie. Université de Bordeaux, 2019. Français. NNT : 2019BORD0177 . tel-02399550

HAL Id: tel-02399550

<https://theses.hal.science/tel-02399550>

Submitted on 9 Dec 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 Alexandra MEYGRET

Caractérisation d'éléments conjugatifs intégratifs (ICE) chez
Mycoplasma hominis

Sous la direction de : Sabine PEREYRE

Soutenue le 14 Octobre 2019

Membres du jury :

Pr Alain BLANCHARD, Professeur à l'Université de Bordeaux
Dr Florence TARDY, Directeur de recherche à l'ANSES de Lyon
Pr Vincent CATTOIR, Praticien hospitalier et Professeur à l'Université de Rennes
Pr Corinne ARPIN, Professeur à l'Université de Bordeaux
Dr Eric BARANOWSKI, Chargé de recherche à l'Université de Toulouse
Dr Sabine PEREYRE, MCU-PH à l'Université de Bordeaux

Président
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Directeur de Thèse

REMERCIEMENTS

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier ma directrice de thèse, le Docteur Sabine Pereyre, Maître de Conférences à l'USC EA3671 INRA, Infections humaines à mycoplasmes et chlamydiae de l'Université de Bordeaux. Merci pour ton encadrement, ta présence, ton soutien et ta réactivité tout au long de ma thèse. J'ai beaucoup appris à tes côtés tant humainement que scientifiquement. Un grand merci pour ta bonne humeur quotidienne malgré ton emploi du temps chargé, ici ou de l'autre côté de l'Atlantique, mais aussi pour les soirées rafraichissantes en pleine canicule et ton adorable famille. Je compte sincèrement sur vous pour venir boire des Ti-punch avec nous sous les cocotiers antillais.

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.

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.

Je remercie le Professeur Vincent Cattoir, Praticien hospitalier et Professeur à l'Université de Rennes de me faire l'honneur de participer et de juger mes travaux de thèse en étant rapporteur de mon travail.

J'adresse mes remerciements à Madame Corinne Arpin, Professeur à l'Université de Bordeaux, pour l'honneur que vous me faites en acceptant d'être examinateur de ma thèse et de juger mon travail.

J'adresse mes remerciements à Monsieur le Docteur Eric Baranowski, Directeur de recherche à l'Université de Toulouse, pour l'honneur que vous me faites en acceptant d'être examinateur de ma thèse et de juger mon travail.

Je voudrais également remercier Madame le Professeur Cécile Bébéar, Directrice de l'USC EA3671, infections humaines à mycoplasmes et chlamydiae de l'Université de Bordeaux. Merci d'avoir accueilli une petite assistante non Bordelaise dans votre service et pour l'immense plaisir que j'ai eu à faire parti des deux équipes, hospitalière et universitaire pendant ces trois ans. J'ai énormément appris et soyez assurée de ma plus sincère gratitude.

Je tiens à remercier Madame le Docteur Emilie Dordet-frisoni, Chargé de recherche à l'ENVT de Toulouse. Merci pour ta gentillesse, ta disponibilité et toute l'aide que tu nous as apporté, ce fut un réel plaisir de travailler avec toi.

Je tiens à remercier Madame le Docteur Christine Citti, Directrice de l'UMR 1225, INRA, Interactions Hôtes-Agents Pathogènes de l'ENVT de Toulouse, pour m'avoir permis de venir me former au sein de son unité, pour son humour et ses conseils, toujours pertinents et avisés.

Je voudrais remercier Monsieur le Docteur Pascal Sirand-Pugnet, Maître de Conférence à l'UMR 1332, Unité Biologie du Fruit et Pathologie, INRA de l'Université de Bordeaux. Merci pour ta gentillesse, ta pédagogie et ta disponibilité tout au long de ces trois années. Merci pour tous tes précieux conseils.

Je remercie également Madame le Docteur Laure Béven, Maître de Conférence à l'UMR 1332, Unité Biologie du Fruit et Pathologie, INRA de l'Université de Bordeaux. Merci pour ton enthousiasme contagieux, pour m'avoir fait part de tes connaissances et pour ton aide précieuse sur ce travail.

Je voudrais remercier toute l'équipe du laboratoire USC EA 3671 IHMC, pour son accueil, sa sympathie, sa gentillesse et son ambiance tout au long de ces trois années. Arabella, Bribri, Nadège, Chloé, Angélique, Cécile, Marie ne changez surtout pas.

Je voudrais remercier mes deux co-assistants de choc, Hugo et Alice, merci pour votre bonne humeur quotidienne, les soirées thermomix, costumées et aux futures soirées avec Isaac aux caraïbes. Mais merci également pour votre rigueur, ça a été un réel plaisir de travailler avec vous soyez assurés de ma profonde amitié.

J'adresse également mes sincères remerciements à tous les biologistes du service de Bactériologie de Pellegrin. Au Professeur Véronique Dubois, ma référente résistances aux antibiotiques, merci d'avoir supporté les milliards de questions que j'ai pu te poser et surtout d'y avoir toujours répondu avec une grande pédagogie et gentillesse. Au Docteur Peuchant Olivia, merci de m'avoir fait découvrir le fabuleux monde des mycobactéries et pour ton enseignement. Mais également Au Professeur Philippe Lehours, Au Docteur Emilie Bessede et Au Docteur Bertille de Barbeyrac, un grand merci pour votre gentillesse et pour m'avoir intégré au sein de votre équipe. Soyez assurés de ma profonde estime.

Je remercie aussi Laurent doudou, Amélie et Jo petit pain au lait pour tous ces bons moments passés ensemble, pour ces fous rires, ces week-ends et soirées déjantées à chapeaux. Soyez assurés de m'avoir sur le dos encore de nombreuses années. Merci aussi à Susu, juju et Victorius pour votre amitié précieuse à mes yeux et tous les moments que nous avons pu passer ensemble depuis bientôt 2 ans, surf, bad, week pays basque et j'en passe. Victor, tu sais qu'on t'adopte quand tu veux.

Enfin, je tenais à dédier ce travail à ceux qui me soutiennent et m'entourent depuis de nombreuses années, A mes parents, Aimé et Florence ; A Frédérique et Patrick ; A mes deux frères Nicolas et Hugo ; A ma soeur Nora et A mes deux grand-mères Bernadette et Blanche. Merci pour votre amour, votre soutien, je vous aime et j'espère vous rendre fiers.

Je terminerai en remerciant mon amour, Romain, pour m'avoir supporté et soutenue durant cette thèse et pour avoir décidé de commencer une nouvelle aventure avec moi et nos deux boules de poils sous le soleil de Guadeloupe. Merci pour ton amour, ton soutien et ta confiance, en espérant qu'ils durent toujours.

Je t'aime mon cœur.

LISTE DES ABREVIATIONS

LISTE DES ABBREVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
ADH	Arginine dihydrolase
ARN	Acide ribonucléique
ARNr	Acide ribonucléique ribosomique
ATP	Adénosine triphosphate
CARDS	Community-acquired respiratory distress syndrome
CDS	Coding sequence
CK	Carbamate kinase
CMI	Concentration minimale inhibitrice
HGT	Horizontal gene transfer
ICE	Integrative and conjugative element
IL	Interleukine
IS	Insertion sequence
Kbp	Kilo paire de bases
KDa	Kilo Dalton
LCR	Liquide céphalo-rachidien
Lmp	Large membrane protein
LPS	Lipopolysaccharide
MALDI-TOF	Matrix-assisted laser desorption ionisation-Time of flight
MLSK	Macrolide-lincosamide-streptogramine-kétolide
MLST	Multi-locus sequence typing
MLVA	Multiple loci VNTR (Variable-number tandem-repeat) analysis
OCT	Ornithine carbamoyltransférase
Pb	Paire de bases
PCR	Polymerase chain reaction
PEG	Polyéthylène glycol
QRDR	Quinolone-resistance determining region
RT-PCR	Reverse Transcriptase-PCR

TAL	Transcription activator-like
Th17	Lymphocyte T auxiliaire
TLR	Toll-like receptors
TNF	Facteur de nécrose tumorale
UFC	Unité formant colonie
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS.....	2
LISTE DES ABREVIATIONS	5
TABLE DES MATIERES	8
LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES.....	11
INTRODUCTION ET OBJECTIFS.....	14
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....	18
1 Les mycoplasmes et <i>M. hominis</i>	19
1.1 Les mycoplasmes	19
1.2 <i>Mycoplasma hominis</i>	23
1.2.1 Métabolisme de <i>M. hominis</i>	23
1.2.2 Physiopathologie et diagnostic clinique des infections à <i>M. hominis</i>	25
1.2.2.1 Présence à l'état commensal	25
1.2.2.2 Diagnostic clinique.....	25
1.2.2.3 Physiopathologie et facteurs de virulence	26
1.2.3 Diagnostic bactériologique des infections à <i>M. hominis</i>	29
1.2.3.1 Par culture	29
1.2.3.2 Par biologie moléculaire.....	31
1.2.4 Etude de la résistance aux antibiotiques.....	31
1.2.4.1 Méthodes d'étude de la résistance aux antibiotiques	31
1.2.4.2 Résistances naturelles.....	34
1.2.4.3 Les classes d'antibiotiques actifs sur <i>M. hominis</i>	34
1.2.4.4 Résistances acquises.....	35
1.2.4.4.1 Tétracyclines.....	35
1.2.4.4.2 Macrolides et apparentés	37
1.2.4.4.3 Fluoroquinolones	38
1.2.4.5 Evolution de la résistance aux antibiotique.....	40
1.2.4.6 Traitement des infections à <i>M. hominis</i>	40
2 Les éléments génétiques mobiles chez les mycoplasmes.....	41

2.1	Historique du transfert horizontal de gènes (HGT) chez les bactéries.....	41
2.2	Les mécanismes de transfert horizontal de gènes	42
2.3	Les éléments génétiques mobiles retrouvés chez les mycoplasmes.....	43
2.3.1	Les séquences d'insertion.....	43
2.3.2	Les plasmides	45
2.3.3	Les phages	47
2.3.4	Les ICEs	49
2.3.4.1	Généralités et mécanisme de transfert.....	49
2.3.4.2	Une organisation modulaire	51
2.3.4.3	Les ICEs chez les mycoplasmes.....	55
2.3.4.3.1	Découverte des ICEs chez les mycoplasmes et mise en évidence de leur transfert horizontal	55
2.3.4.3.2	Fonctions des gènes codés par les CDSs portés par l'ICE	56
2.3.4.3.3	Un squelette minimum commun chez les ICEs de mycoplasmes	58
2.3.4.3.4	Intégration et excision des ICEs du chromosome hôte	59
2.3.4.3.5	Transfert chromosomique médié par les ICEs	61
<i>CHAPITRE 1. RESISTANCE A LA TETRACYCLINE ET AUX FLUOROQUINOLONES DANS DES ISOLATS CLINIQUES DE UREAPLASMA SPP. ET MYCOPLASMA HOMINIS ISOLES EN FRANCE ENTRE 2010 ET 2015</i>		<i>64</i>
CONTEXTE.....		65
<i>CHAPITRE 2. FORTE PREVALENCE DES ELEMENTS INTEGRATIFS ET CONJUGATIFS CODANTS DES REPETITIONS HOMOLOGUES A UN EFFECTEUR DE TYPE ACTIVATEUR DE TRANSCRIPTION CHEZ MYCOPLASMA HOMINIS.....</i>		<i>76</i>
CONTEXTE.....		77
CONCLUSION ET DISCUSSION.....		129
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES		144

LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES

LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES

Liste des tableaux

Tableau 1. Critères d'interprétation des concentrations minimales inhibitrices par microdilution en bouillon ou en agar pour *M. hominis*.

Tableau 2. Amorces utilisées pour détecter *M. agalactiae* 5632, *M. hominis* 74 et le gène *tet(M)*.

Tableau 3. Récapitulatif des résultats obtenus lors des expériences de conjugaison au sein de l'espèce *M. hominis* (intra-espèce) et entre *M. agalactiae* et *M. hominis* (inter-espèce).

Liste des figures

Figure 1. Arbre phylogénétique des mollicutes.

Figure 2. Culture de *M. hominis* sur gélose Hayflick.

Figure 3. Comparaison du métabolisme de l'arginine et du glucose chez *M. hominis* PG21.

Figure 4. Différentes trousse commerciales permettant la détection, la numération et/ou l'étude de la sensibilité aux antibiotiques de *Ureaplasma* spp. et *M. hominis*.

Figure 5. Mécanisme d'action de la protéine Tet(M).

Figure 6. Mutations de l'ARNr 16S associées à une augmentation de la résistance à la tétracycline obtenue in vitro.

Figure 7. Positions des mutations associées à la résistance aux macrolides au sein du centre peptidyltransférase du domaine V de l'ARNr 23S de *M. hominis* chez deux isolats cliniques.

Figure 8. Structure d'une séquence d'insertion.

Figure 9. Structure d'un transposon conjugatif.

Figure 10. Modèle général de transfert des ICEs.

Figure 11. Les différents modules de l'ICE.

Figure 12. Modèle représentant le T4SS du plasmide pIP501 de *Streptococcus agalactiae*.

Figure 13. Organisation génomique et comparaison des ICEs isolés chez les mycoplasmes.

Figure 14. Représentation schématique du transfert d'ICE chez *M. agalactiae*.

Figure 15. Organisation schématique actuelle et fonctionnalité des CDSs des ICEs de la souche *M. agalactiae* 5632.

Figure 16. Transposon conjugatif comportant le gène *tet(M)* chez *M. hominis* et *S. agalactiae*.

Figure 17. Formes intégrées et excisées des ICEs.

Figure 18. Transfert horizontal de gène (HGT) médié par ICEA chez *M. agalactiae*.

Figure 19 . Expérience de transfert conjugatif idéale au sein de l'espèce *M. hominis*.

Figure 20. Expériences de transfert conjugatif entre différentes espèces proches phylogénétiquement (*M. hominis* et *M. agalactiae*).

Figure 21. Expériences de transfert conjugatif réalisables au sein de l'espèce *M. hominis*.

Figure 22. Protocole de conjugaison mis en place au laboratoire.

Figure 23. Principe de la numération en milieu liquide et solide.

Figure 24. Représentation du vecteur pMT86-Tet.

INTRODUCTION ET OBJECTIFS

INTRODUCTION ET OBJECTIFS

Microorganismes ubiquitaires, les mycoplasmes appartiennent à la classe des *Mollicutes*¹. Ce sont les plus petits procaryotes capables de réplication autonome, dont fait partie l'espèce *Mycoplasma genitalium*, connue pour avoir le plus petit génome bactérien (580 kpb). Leur génome réduit et leur absence de paroi sont à l'origine de leur mode de vie parasitaire et de leur résistance à certaines familles d'antibiotiques. Des preuves de transfert de gènes horizontal (HGT) au sein et entre les espèces ont fourni un nouveau cadre pour comprendre l'adaptation réussie de ces bactéries minimales à un large éventail d'hôtes². La récente découverte d'éléments conjugatifs intégratifs (ICEs) chez certaines espèces de mollicutes appartenant au groupe phylogénétique Hominis comme *M. fermentans*³ ainsi que chez des mycoplasmes de ruminants comme *M. agalactiae*⁴, *M. capricolum* subsp. *capricolum*, *M. bovis* et *M. mycoides* subsp. *capri*⁵ soulève de nombreuses interrogations quand à l'intérêt de ces transferts pour les mycoplasmes alors que jusqu'à présent, la réduction génétique était considérée comme la seule force régissant leur évolution.

Les ICEs sont des éléments génétiques mobiles auto-transférables, qui codent les systèmes nécessaires pour leur excision, leur transfert conjugatif et leur intégration dans la cellule receveuse, où ils se répliquent ensuite dans le chromosome⁶. Ces ICEs peuvent être présents en copie unique ou multiple dans les génomes. Une étude chez 166 souches de terrain de mycoplasmes de ruminants, *M. agalactiae*, *M. bovis*, *M. mycoides* subsp. *capri* et *M. capricolum* subsp. *capricolum* a montré qu'une structure minimale commune de quatre CDSs était présente dans les ICEs de ces espèces, CDS1 de fonction inconnue, CDS5 et CDS17 codant deux protéines transmembranaires avec des domaines ATPase intervenant dans la formation du pore de conjugaison et CDS22 codant une transposase de type DDE.

Mycoplasma hominis est un microorganisme commensal du tractus urogénital mais peut être responsable d'infections urogénitales^{7,8}. C'est un agent d'endométrite et de salpingite chez les femmes. Il peut également être impliqué dans des infections néonatales et des infections extra-génitales, plus fréquentes chez les patients immunodéprimés⁹.

A ce jour, la présence d'ICEs chez *M. hominis* n'a jamais été décrite. Cependant, la présence d'autres éléments génétiques mobiles comme un prophage rapporté chez la souche *M. hominis* LBD-4¹⁰ ou un transposon non identifié contenant un transposon tronqué de la famille Tn916 chez *M. hominis* Sprott¹¹ laisse supposer que d'autres éléments génétiques mobiles tels que les ICEs pourraient exister chez cette espèce également.

L'objectif principal de mon doctorat a été la recherche et l'étude des ICEs dans l'espèce *M. hominis*. Au début de ma thèse, une souche de référence et 11 isolats cliniques de *M. hominis* avaient déjà été entièrement séquencés par technologie Illumina et se trouvaient sous forme de contigs insérés dans Molligen¹², base de données dédiée aux génomes de Mollicutes.

La première partie de mon travail a consisté en la recherche et l'analyse descriptive des ICEs avec la détermination de leur nombre et de leur structure chez les 12 souches de *M. hominis* entièrement séquencés ainsi que la recherche d'une structure commune. La recherche de la présence d'ICEs au sein des contigs s'est basée sur la structure commune des ICEs présents chez les mycoplasmes de ruminants qui présentent tous les CDS1, CDS5, CDS17 et CDS22. Les similarités de séquence nous ont permis de détecter les contigs porteurs de fragments d'ICE que nous avons par la suite assemblés par PCR et séquençage. Afin d'établir le nombre de copies d'ICEs présents chez chacune des souches de *M. hominis*, nous avons réalisé des southern blots avec des sondes d'ADN spécifiques des CDS1 et CDS22. L'intégrité des ICEs a aussi été recherchée par détection de leur forme circulaire par PCR en utilisant des amorces spécifiques des extrémités de l'ICE. Nous avons par la suite effectué des comparaisons génomiques de ces ICEs avec ceux existants chez les ruminants afin de mettre en évidence des spécificités liées à l'espèce. Une analyse de la structure secondaire des protéines codées par l'ICE par bio-informatique a également été réalisée.

Le deuxième axe de ma thèse visait à déterminer la prévalence des ICEs au sein d'une population de souches cliniques de *M. hominis* et à établir leur implication potentielle dans la dissémination de la résistance aux antibiotiques, plus particulièrement à la tétracycline qui est le traitement habituel des infections liées à ce pathogène. Afin de disposer d'un nombre suffisant d'isolats cliniques pour effectuer cette étude de prévalence et de sélectionner des souches de *M. hominis* présentant un intérêt pour de futures expériences fonctionnelles de conjugaison (sur la base du profil de résistance aux antibiotiques), une étude rétrospective a été

menée sur une période de six ans, de 2010 à 2015. La sensibilité aux fluoroquinolones et à la tétracycline de 183 isolats cliniques de *M. hominis* et 831 isolats d'*Ureaplasma* spp. collectés au CHU de Bordeaux a été évaluée par détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) en milieu liquide. Le gène *tet(M)* responsable de la résistance à la tétracycline et les mutations associées à la résistance aux fluoroquinolones ont été recherchées par PCR et séquençage.

Cette étude rétrospective a fait l'objet d'un poster présenté à la journée annuelle de la Fédération de Recherche Transbiomed de l'Université de Bordeaux en 2017, d'une présentation orale en décembre 2017 à la 37^{ème} Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie anti-infectieuse (RICAI) à Paris, d'une communication orale au 22^{ème} congrès de l'International Organization for Mycoplasmaology (IOM) à Portsmouth, New Hampshire, USA en juillet 2018, et d'une publication dans le journal Journal of Antimicrobial Chemotherapy présenté dans le **chapitre 1** de ce document.

A partir de la collection de souches cliniques de *M. hominis* obtenue, la prévalence des ICEs dans l'espèce *M. hominis* a été déterminée sur 120 de ces isolats, comprenant des souches résistantes à la tétracycline et aux fluoroquinolones. Nous avons utilisé des amorces consensus dessinées sur la base des ICEs précédemment caractérisés chez les souches entièrement séquencées de *M. hominis* pour rechercher les CDS1, CDS5, CDS17, CDS22 et un module spécifique des ICEs de *M. hominis*.

L'étude descriptive des ICEs associée à l'étude de prévalence des ICEs chez *M. hominis* a fait l'objet d'un poster présenté au 22^{ème} congrès de l'IOM à Portsmouth, New Hampshire, USA en juillet 2018, d'un poster présenté à 38^{ème} RICA, Paris en décembre 2018 et d'une publication en révision (minor revisions) dans Frontiers in Microbiology (Research topic : Mollicutes : From evolution to pathogenesis) présentée dans le **chapitre 2** de ce document.

La suite logique de ce projet est une étape fonctionnelle pour déterminer si les ICEs détectés *in silico* sont des éléments mobiles fonctionnels capables de transfert d'une cellule donneuse à une cellule receveuse. Ainsi, des expériences de conjugaison entre deux souches de *M. hominis* ou entre une souche de *M. hominis* et une souche d'une autre espèce de mycoplasme du même groupe phylogénétique ont été débutées mais n'ont pas été fructueuses. Ces expériences seront détaillées dans la partie perspectives de ce manuscrit.

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Mon projet a été de rechercher et caractériser les éléments conjugatifs et intégratifs chez *Mycoplasma hominis*, c'est pourquoi je développerai deux axes dans mon étude bibliographique : les mycoplasmes dont plus particulièrement *M. hominis*, et les éléments génétiques mobiles chez les mycoplasmes.

1 Les mycoplasmes et *M. hominis*

1.1 Les mycoplasmes

Micro-organismes ubiquitaires, les mycoplasmes sont connus dans le règne animal depuis la fin du XIX^e siècle. L'histoire des mycoplasmes débute en 1898 quand E. Nocard de l'école vétérinaire nationale d'Alfort et ses collègues de l'Institut Pasteur réussirent à faire croître l'agent de la pneumonie bovine en utilisant de petits sacs de collodion insérés dans le péritoine de lapins. Malheureusement, ce micro-organisme en culture fut longtemps considéré comme un virus du fait de sa filtrabilité. La confusion entre les vrais virus et les mycoplasmes a longtemps persisté et a d'ailleurs retardé le développement du concept moderne de virus jusqu'aux années 1940. Ce micro-organisme ne sera dénommé *Mycoplasma mycoides* qu'en 1956¹³. En 1923, Bridré et Donatien cultivent pour la première fois avec succès le « microbe » de l'agalactie contagieuse des ovins et caprins. Dans sa forme bénigne, la maladie est localisée dans le pis de la femelle et interfère avec la production de lait. Dans sa forme maligne, on peut observer un gonflement des articulations ainsi qu'une inflammation des yeux pouvant entraîner une cécité. Ce pathogène, qui avait en tout point les mêmes caractéristiques que *M. mycoides* sera dénommé *M. agalactiae*. Ces deux mycoplasmes restèrent les seuls connus pendant 10 ans. Le premier cas d'infection humaine, abcès de la glande de Bartholin, a été décrit en 1937 par Diènes et Edsall. Depuis cette époque, près de 15 variétés de mycoplasmes ont été isolées de prélèvements humains, principalement au niveau du tractus respiratoire et génital. Beaucoup sont de simples commensaux, d'autres peuvent avoir un pouvoir pathogène. Les mycoplasmes sont alors passés de l'obscurité au centre de l'attention.

Les Mycoplasmes appartiennent à la classe des *Mollicutes* (du latin *mollis* « souple » et *cutis* « peau ») qui regroupe des bactéries sans paroi. Cette classe appartient au phylum des Tenericutes. Elle comprend actuellement quatre ordres, Les Mycoplasmatales, les

Entomoplasmatales, les Acholeplasmatales et les Anaeroplasmatales. Cette classification a été établie sur la base d'études phylogénétiques et phénotypiques¹⁴. 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*, comprenant les genres *Mycoplasma* et *Ureaplasma*. Les mycoplasmes sont des eubactéries, descendant d'ancêtres communs avec ceux des bactéries à Gram positif à faible pourcentage en guanine plus cytosine (G+C%), tels que certains *Clostridia*, *C. innocum* et *C. ramosum*^{15,16}. Ils auraient évolué par perte d'une partie de leur génome dont la capacité de synthétiser leur paroi. L'étude des séquences d'ADNr 16S a permis de séparer les Mollicutes en cinq groupes phylogénétiques, le groupe Anaeroplasma (appelé sous-groupe AAP pour Acholeplasma, Anaeroplasma et Phytoplasma), le groupe Spiroplasma, le groupe Hominis, le groupe Pneumoniae et le groupe Asteroleplasma¹⁷ (**Figure 1**).

M. hominis appartient au groupe phylogénétique Hominis tandis que les autres principaux mycoplasmes pathogènes humains appartiennent au groupe Pneumoniae. 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, excepté pour les groupes Acholeplasma et Phytoplasma¹⁸.

Largement répandus dans la nature, les mycoplasmes colonisent chez l'homme les muqueuses respiratoires et génitales. Seules certaines espèces sont pathogènes pour l'homme. Au niveau respiratoire, seul *M. pneumoniae* a un pouvoir pathogène certain et n'appartient pas à la flore commensale des voies respiratoires. Le plus souvent responsable de trachéobronchites, *M. pneumoniae* est retrouvé avec une haute prévalence chez les enfants entre 5 et 14 ans. Il est la 2^{ème} cause de pneumonies communautaires derrière *Streptococcus pneumoniae*¹⁹⁻²¹.

Quatre espèces de mycoplasmes sont impliquées dans les infections humaines génitales, *M. genitalium*, *M. hominis*, *U. parvum* et *U. urealyticum*. *Ureaplasma urealyticum* et *U. parvum* seront regroupés dans ce mémoire sous le terme *Ureaplasma* spp. *M. genitalium* est sans équivoque associé aux urétrites non gonococcique (UNG) chez l'homme. C'est le 2^{ème} agent d'UNG derrière *Chlamydia trachomatis*. Chez la femme, il est responsable de cervicites et de maladies inflammatoires pelviennes. Il a également été associé à des accouchements prématurés et des avortements spontanés mais sa prévalence chez les femmes enceintes en Europe est faible. Sa transmission par contact direct des muqueuses génitales a été établie²². Il

peut également provoquer des arthrites réactionnelles²³. Même s'il peut être retrouvé dans les voies génitales de patients asymptomatiques, son caractère commensal n'est pas établi. La fréquence de colonisation par *Ureaplasma* spp. des voies génitales basses peut atteindre de 30 à 50%. Ils peuvent être responsable d'UNG, d'arthrites réactionnelles ainsi que de troubles de la reproduction, d'infections du post-partum et de prématurité²⁴. Comme cette thèse porte principalement sur *M. hominis*, sa pathogénicité ainsi que son diagnostic clinique seront abordés dans le chapitre I.2.2.

De très petite taille, 300-850 nm, les mycoplasmes rencontrés chez l'homme sont polymorphes, coccoïdes ou filamenteux et ne sont pas colorables par le Gram. Sur gélose, ils donnent de petites colonies visibles à la loupe binoculaire (entre 0.3 et 0.8 µm de diamètre), prenant pour certain l'aspect d'œuf au plat en raison de la pénétration des mycoplasmes dans la gélose (**Figure 2**). Les séquences du génome sont connues pour toutes les espèces de mycoplasme pathogènes pour l'homme. Avec des génomes de moins de 1 Mbp, la plupart des espèces de Mollicutes conservent la capacité de se répliquer et de se développer de manière autonome. La taille des génomes est variable, non seulement dans un même genre mais également entre des souches de la même espèce. Cette variabilité a été attribuée initialement d'une part à la présence fréquente dans le génome des mollicutes d'éléments répétitifs et d'autre part à la présence de séquences d'insertion (IS)²⁵. Les mycoplasmes sont décrits comme les organismes les plus petits capables d'auto-réplication. *M. genitalium* étant le plus petit génome séquencé (580 kpb), son génome devrait être proche du set minimal de gènes nécessaire au maintien de la vie bactérienne. Ainsi, 382 gènes ont été caractérisés comme essentiels lors d'expériences de mutagénèse par transposition²⁶. On comprend alors aisément l'engouement actuel pour ces génomes réduits constituant des modèles pour appréhender le concept de cellule minimale.

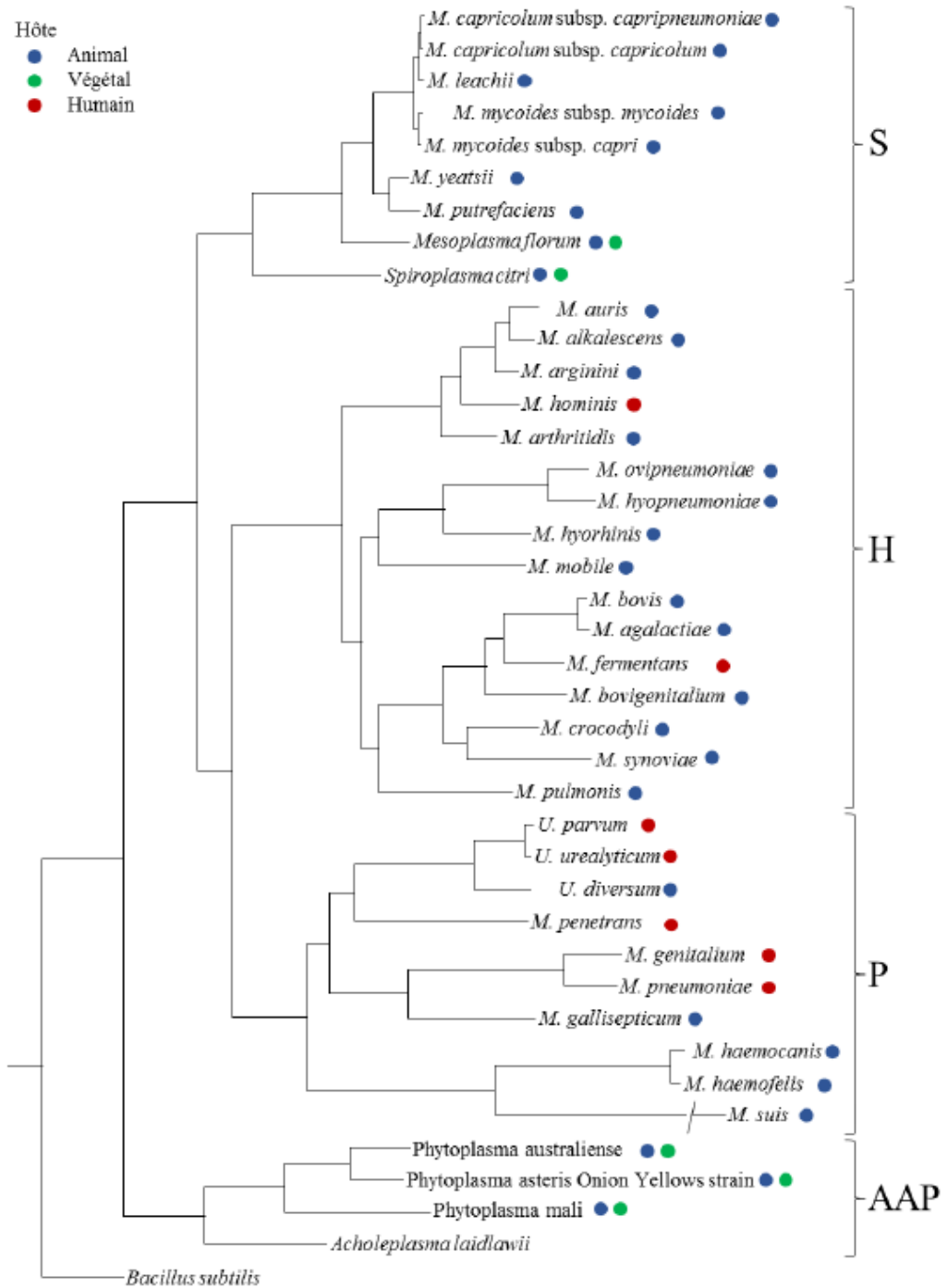


Figure 1 : Arbre phylogénétique des mollicutes (adapté de Grosjean *et al.* 2014). L'arbre phylogénétique a été réalisé par la méthode du maximum de vraisemblance à partir des alignements multiples concaténés de 79 protéines codées par des gènes présents en une copie dans chaque génome. Les principaux groupes phylogénétiques sont les suivants : S, Spiroplasma ; H, Hominis ; P, Pneumoniae ; AAP, Acholeplasma/Phytoplasma.

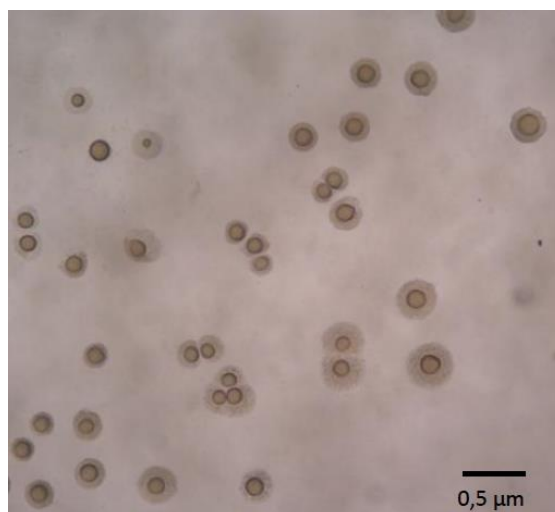


Figure 2 : Culture de *M. hominis* sur gélose Hayflick.

Les colonies ont un aspect typique d'œuf sur le plat (Photographie de H. Renaudin)

1.2 *Mycoplasma hominis*

1.2.1 Métabolisme de *M. hominis*

M. hominis fait partie des mycoplasmes non fermentants, incapable de métaboliser le glucose. En effet, chez *M. hominis*, tous les gènes codants pour les enzymes de la voie d'Embden-Meyerhoff-Parnas qui permet la production d'énergie à partir du glucose sont présentes sauf la 6-phosphofructokinase. Le set de gènes codants pour les enzymes dans la voie des pentoses phosphates, qui est une autre voie métabolique du glucose est incomplète avec l'absence des gènes qui codent pour la glucose-6-phosphate deshydrogénase et la 6-phosphogluconate deshydrogénase. Les gènes codant pour les autres enzymes impliquées dans le métabolisme des glucides sont présents à l'exception de la 1-phosphofructokinase qui est impliquée dans le métabolisme du fructose et du complexe pyruvate dehydrogenase²⁷ (Figure 3).

M. hominis produit son énergie par hydrolyse de l'arginine, qui est considéré comme son nutriment essentiel²⁸. Cette propriété est d'ailleurs utilisée pour l'identification de l'espèce *M. hominis*. Les enzymes de la voie de l'arginine, arginine déiminase, ornithine carbamoyl transferase et carbamate kinase, transforment l'arginine en CO₂ et NH₃ avec production d'ATP. L'inhibition de l'arginine déiminase par la canavanine, inhibiteur compétitif, inhibe la multiplication de *M. hominis* en milieu de culture liquide²⁷. Le séquençage de la souche *M. hominis* PG21 a permis d'identifier un transporteur potentiel de l'arginine permettant

l'import de cet acide aminé dans le mycoplasme²⁷. Enfin, le gène de la N-diméthylarginine diméthylaminohydrolase a été identifié dans le génome. Cette enzyme pourrait compléter cette voie énergétique en permettant l'utilisation d'un deuxième substrat, la diméthylarginine (Figure 3).

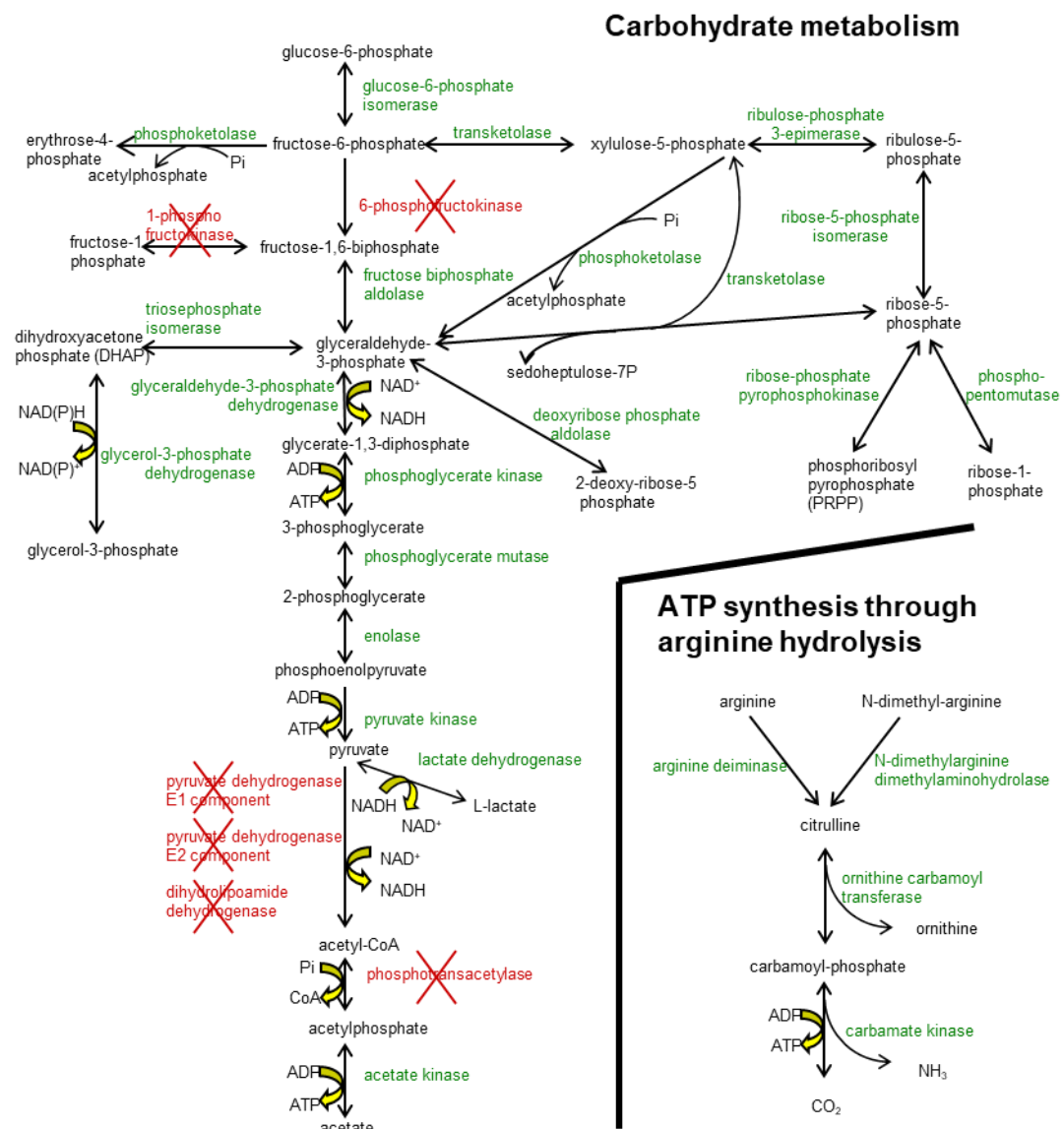


Figure 3 : Comparaison du métabolisme de l'arginine et du glucose chez *M. hominis* PG21 (adapté de Pereyre *at al.* 2009²⁷). Les produits métaboliques apparaissent en noir, les protéines potentielles de *M. hominis* sont en vert et celles absentes en rouge.

1.2.2 Physiopathologie et diagnostic clinique des infections à *M. hominis*

1.2.2.1 Présence à l'état commensal

M. hominis appartient à la flore génitale, sa présence à l'état commensal rend sa responsabilité en cas d'infection délicate à affirmer. Les femmes sont plus souvent colonisées que les hommes. La fréquence de colonisation varie selon des facteurs individuels liés à l'hôte tels que l'âge, l'état hormonal (menstruations, ménopause et contraception), la grossesse, la race, le niveau socioéconomique et l'activité sexuelle^{8,29}. Pour *M. hominis*, le taux de colonisation des femmes au niveau vaginal reste faible, généralement de l'ordre de 10 %³⁰, bien inférieur à celui des *Ureaplasma* spp. qui peut s'élever à 50%. L'enfant est colonisé au moment de l'accouchement par contact avec les muqueuses génitales de sa mère, au niveau du nez, de la gorge et des voies génitales. Les mycoplasmes disparaissent par la suite pour réapparaître après la puberté.

1.2.2.2 Diagnostic clinique

M. hominis est le plus souvent mis en cause dans les infections féminines. Bien que n'étant pas l'agent de la vaginose bactérienne, il y est fortement associé³¹. Il fait partie des bactéries qui prolifèrent au cours de ce tableau clinique caractérisé par un déséquilibre de la flore vaginale³². *M. hominis* est un agent d'endométrites, de salpingites mais, dans ce cas, il est généralement considéré comme un agent de surinfection plutôt qu'un agent pathogène primaire. Puisqu'il colonise le tractus génital, *M. hominis* peut être associé aux infections durant la grossesse tels que des chorioamniotites⁹, des fièvres post-partum ou post-abortion dont le point de départ serait 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 travail³³. Chez le nouveau-né, *M. hominis* est un agent de méningite en particulier chez les nouveau-nés très prématurés et fortement hypotrophiques⁹. *M. hominis* y est aussi responsable de pneumonies³².

Chez l'homme, la présence de *M. hominis* au niveau du tractus urogénital est seulement le reflet d'une colonisation. En revanche, dans une étude chinoise, la prévalence de *M. hominis* dans le sperme de patients infertiles était significativement supérieure à celle retrouvée dans le sperme des témoins (3,16% versus 0,89%)³⁴.

Enfin, les mycoplasmes génitaux peuvent provoquer des infections extragénitales essentiellement chez des sujets immunodéprimés. Néanmoins, *M. hominis* serait responsable d'un petit nombre de cas de pyélonéphrites aiguës chez des sujets immunocompétents⁸. Une obstruction ou un geste invasif au niveau du tractus urinaire pouvant être un facteur favorisant. Les infections extragénitales à *M. hominis* incluent bactériémies, ostéomyélites, abcès rétropéritonéaux et péritonites, surinfections d'hématome, infections vasculaires et sur cathéter, surinfections de plaies sternales avec médiastinite après chirurgie thoracique, pneumonies, endocardites, péricardites et abcès du cerveau, habituellement par extension hématogène^{8,35}. De rares cas de méningites ont été décrits souvent suivant des manipulations de neurochirurgie^{36,37}. Des cas d'arthrites septique ont également été décrits le plus souvent après pose de prothèse³⁸⁻⁴⁰. L'ensemble de ces infections surviennent le plus souvent mais non exclusivement^{41,42} chez des sujets immunodéprimés, transplantés ou présentant des ruptures majeures des barrières anatomiques. Récemment des cas d'infections dues à des greffons de différentes natures (pulmonaire, cardio-pulmonaire ou amniotique) contaminés par *M. hominis* ont aussi été rapportés⁴³⁻⁴⁵. Dans certains cas, la relation entre infection du receveur et du donneur a pu être établie par technique de séquençage du génome entier de *M. hominis*^{43,45}. *M. hominis* a également été impliqué dans des hyperammoniémies chez des patients immunodéprimés après greffe d'organe⁴⁶. Enfin, une étude récente suggère que plusieurs taxons bactériens dont *M. hominis* peuvent influencer les concentrations de cytokines et chimiokines comme le TNF- α et l'interleukine-1 β par voie vaginale. Cette production en augmentant l'inflammation vaginale pourrait influencer la susceptibilité au VIH⁴⁷.

1.2.2.3 Physiopathologie et facteurs de virulence

La définition des gènes de virulence concerne généralement les gènes qui codent pour des produits induisant un effet pathogène direct sur les tissus de l'hôte. Cette définition est problématique dans les pathogènes comme les mycoplasmes qui n'exercent pas d'effet pathogène direct sur les tissus de leur hôte et apparaissent comme des pathogènes adaptés à l'hôte. Les effets pathogènes des mycoplasmes résultent pour la plupart de la réponse de l'hôte à l'infection. Pour ces raisons, dans plusieurs cas, les gènes de virulence ont été regardés comme des gènes non essentiels pour la croissance mais essentiels pour une colonisation optimale, la persistance au sein de l'hôte ou l'effet pathogène sur l'hôte.

Chez *M. hominis*, les facteurs de virulence sont peu connus, cependant, il est clair que l'adhésion du mycoplasme aux cellules de l'hôte est un pré-requis pour la colonisation et l'infection. Les mycoplasmes ont développés des stratégies pour être capables de modifier leur attachement aux tissus de l'hôte tels que des variations antigéniques⁴⁸ et des variations de taille des protéines exposées à leur surface qui souvent ont des fonctions de cytoadhésines⁴⁹ permettant de moduler l'adhésion, la formation de biofilm et leur conférant une protection contre le complément et la phagocytose⁵⁰. Plusieurs lipoprotéines de surface de *M. hominis* telles que l'adhésine Vaa⁵¹, les Lmp⁵² et la P120⁵³ sont décrites dans la littérature pour leur variabilité. Dans la famille Lmp, le séquençage de la souche *M. hominis* PG21 a permis d'identifier huit protéines, présentant jusqu'à 15 fois un même motif répété de 57 acides aminés^{27,54}. Le lipoprotéome de surface de *M. hominis* a récemment été caractérisé⁵⁴. Un total de 148 protéines avec un poids moléculaire compris entre 14 et 319 kDa a pu être détecté, notamment 36 lipoprotéines parmi les 48 prédites *in silico* pendant l'annotation du génome. Neuf lipoprotéines étaient spécifiques de *M. hominis* et une quinzaine étaient des protéines hypothétiques conservées parmi les espèces de mycoplasmes⁵⁴. Les gènes de lipoprotéines différentiellement exprimés lors du contact avec des cellules dendritiques ont aussi été étudiés. Ainsi, 21 gènes du lipoprotéome de *M. hominis* étaient surexprimés lors du contact avec les cellules dendritiques. Parmi ces 21 gènes, huit codaient pour des protéines hypothétiques de fonction inconnue, sept codaient des protéines hypothétiques spécifiques de *M. hominis* sans domaines fonctionnels identifiés et six codaient des protéines avec des fonctions hypothétiques toutes associées avec l'adhésion ou une augmentation de la capture de nutriments⁵⁴.

Après contact de *M. hominis* avec sa cellule hôte, celui-ci entraîne une sécrétion d'IL-10 et de TNF- α mais pas d'IL-12 par les monocytes humains et les cellules dendritiques⁵⁵. Il a également une forte capacité à induire la sécrétion d'IL-23 de manière dépendante des toll-like récepteurs de type 2 (TLR2). En effet, un blocage avec des anticorps anti-TLR2 inhibe la production d'IL-23 par *M. hominis*⁵⁵. La sécrétion d'IL-23 favorise le développement de lymphocytes TCD4⁺ helper producteurs de l'IL-17 et polarise la réponse adaptative vers l'axe IL-23/Th-17⁵⁵. Un total de 24 lipoprotéines de *M. hominis* pourraient être à l'origine de cette sécrétion d'IL-23, cinq avec une faible masse moléculaire <35kDa et 19 avec une masse moléculaire >40kDa⁵⁶. *M. hominis* induit aussi une réponse immunitaire innée avec sécrétion d'IL-1 β par ces cellules dendritiques et l'activation de leur inflammasome⁵⁶.

L'hydrolyse de l'arginine, voie métabolique principale, peut aussi avoir un rôle dans la physiopathologie de ce mycoplasme en raison de l'ammoniaque produit. Ce composé basique est aussi produit lors de l'hydrolyse de l'urée par *Ureaplasma* spp. Ces deux espèces étant retrouvées dans des voies génitales de la femme à l'environnement naturellement acide, il est probable que l'alcalinisation générée soit un élément de pathogénicité, notamment lors du développement de vaginoses volontiers associées à la présence de *M. hominis*⁵⁷.

De plus, une étude a potentiellement identifié des gènes de virulence. Le séquençage de deux isolats issus de liquide amniotique et leur comparaison avec le génome précédemment séquencé de *M. hominis* PG21 a permis d'identifier des gènes spécifiques des isolats issus du liquide amniotique. Ainsi, trois gènes spécifiques absents de *M. hominis* PG21 ont été étudiés. Le gène *alr* qui code pour une alanine racémase permettant de convertir L-alanine en D-alanine, un composant du peptidoglycane. La fonction de cette enzyme chez les mycoplasmes est inconnue étant donné qu'ils ont perdu leur peptidoglycane. Le gène *goiB* qui code pour une protéine possédant un peptide signal, dont la localisation subcellulaire et la sécrétion ont été prédits par bioinformatique. Ce gène pourrait coder pour une protéase sécrétée. Le troisième gène nommé *goiC* contient de multiples répétitions. Il a été trouvé une association statistiquement significative uniquement entre la présence de *goiC* dans des échantillons vaginaux et les naissances prématurées. Il a été suggéré que *goiC* aurait une fonction de fitness compétitif dans cette niche⁵⁸. Cependant, il n'a pas été trouvé d'association statistiquement significative entre la charge bactérienne de *M. hominis* dans le vagin et la présence de *goiC* suggérant que ce gène ne joue pas de rôle dans la survie et le fitness du mycoplasme dans le vagin. Il est plus probable que ce gène soit impliqué dans la survie bactérienne ou sa croissance dans le placenta et la cavité amniotique plutôt que d'être requis pour l'ascension ou l'invasion.

M. hominis est une bactérie extracellulaire qui adhère à la surface des cellules hôtes. Il a cependant été montré qu'on pouvait le retrouver en position intracellulaire, dans des lignées cellulaires de type HeLa infectées de manière chronique⁵⁹. La singularité de *M. hominis* est certainement le fait d'avoir été détecté en localisation intracellulaire et de pouvoir se répliquer au sein d'un autre pathogène vénérien *Trichomonas vaginalis*^{60,61}. *M. hominis* peut être transféré d'un trichomonas infecté à un autre non infecté ainsi qu'à des cellules humaines⁶². Cette localisation intracellulaire est une niche privilégiée où le mycoplasme est « invisible » vis-à-vis des mécanismes de reconnaissance du système immunitaire de l'hôte et est potentiellement protégé de l'effet cytotoxique de nombreux anticorps. Même si le mécanisme

de cette symbiose n'est à ce jour toujours pas élucidé, les observations effectuées par Vancini *et al.* suggèrent que la présence de *M. hominis* en symbiose avec *T. vaginalis* pourrait jouer un rôle dans l'augmentation de la virulence du parasite *in vitro*⁶³. En effet, les auteurs ont montré que *T. vaginalis* infecté par *M. hominis* induisait plus de dommages cellulaires aux cellules épithéliales vaginales en culture en comparaison avec des Trichomonas de contrôle non infectés. *T. vaginalis* déplete rapidement l'arginine du milieu de culture obtenant jusqu'à 10% de ses besoins en énergie grâce à la voie de l'ADH (arginine dihydrolase) dans des conditions de culture anaérobie. De plus, cette voie devient particulièrement importante pour la survie du protozoaire dans des conditions de restriction en glucose où l'OCT (ornithine carbamoyltransferase) et la CK (carbamate kinase) sont régulés à la hausse pendant la phase de croissance. Chez *M. hominis*, la voie de l'ADH est la source majeure d'énergie. Ainsi, l'association *T. vaginalis*-*M. hominis* présente deux voies de l'arginine en compétition pour le même substrat (arginine) et une consommation accrue d'arginine, concomitante avec une augmentation de la production d'ornithine et de putrescine, respectivement 16 fois et 3 fois plus élevées par rapport aux trichomonas sans mycoplasmes⁶⁴. De plus, la régulation de la disponibilité de l'arginine est une stratégie commune utilisée par plusieurs agents pathogènes, y compris *M. hominis*, pour échapper à la production d'oxyde nitrique (NO) antimicrobien par les macrophages humains⁶⁵. En effet, l'arginine est le substrat exclusif pour la synthèse de NO. En outre, *T. vaginalis* infecté par *M. hominis* a montré une augmentation de son activité hémolytique *in vitro*, suggérant une contribution supplémentaire de la symbiose⁶⁶. *T. vaginalis* se multiplie plus rapidement, atteint des densités plus fortes en phase stationnaire et produit plus d'ATP lorsqu'il est infecté par *M. hominis*⁶⁵. Enfin, la possible corrélation entre la résistance au métronidazole et la présence de *M. hominis* associé à *T. vaginalis* est toujours débattue, les études présentes dans la littérature étant contradictoires^{67,68}.

1.2.3 Diagnostic bactériologique des infections à *M. hominis*

1.2.3.1 Par culture

Quelque soit la méthode, le prélèvement doit ramener des cellules auxquelles les mycoplasmes adhèrent et doit être adapté à la localisation de l'infection. Les mycoplasmes étant très sensibles à la dessiccation, il faut utiliser des milieux de transport adaptés. Le milieu saccharose-phosphate (2SP) enrichi de 5% de sérum de veau fœtal, sans antibiotique ou le

milieu de transport universel UTM (Copan) peuvent être utilisés pour la mise en culture et les PCR⁶⁹. Les échantillons peuvent être conservés à +4°C pendant 48h au plus et, au-delà, à -80°C.

M. hominis croît sur milieu de Hayflick modifié contenant 20% de sérum de poulain poulain ou sur le milieu commercialisé SP-4, plus complexe, renfermant du sérum de veau fœtal^{69,70}. Les milieux liquides, à pH 7,0-7,2, renferment de l'arginine et un indicateur coloré, le rouge de phénol. Il existe aussi des kits de culture commercialisés, permettant une numération des bactéries. *M. hominis* peut occasionnellement se développer sur des géloses au sang, donnant de très petites colonies dont les bactéries ne sont pas colorables au Gram. Il pousse aussi sur les milieux plus acides utilisés pour *Ureaplasma* spp. tel que le milieu de Shépard contenant de l'urée⁷⁰. En milieu liquide, la détection de la croissance se fait en 24 à 48 h par virage de l'indicateur coloré sous l'effet de l'alcalinisation du milieu par l'hydrolyse de l'arginine. Elle s'exprime en unité de changement de couleur (UCC) par ml. Sur milieu gélosé, la croissance de *M. hominis* est facilitée par une atmosphère enrichie en CO₂. L'apparition de colonies de petite taille (50 à 300 µm de diamètre), d'aspect caractéristique en « œuf sur le plat » avec un centre pénétrant la gélose doit être recherchée à la loupe binoculaire après 2 à 5 jours. L'identification d'espèce se fait par la capacité à hydrolyser l'arginine et à alcaliniser le milieu ainsi que par l'aspect des colonies sur les milieux solides. La technique de spectrométrie de masse de type MALDI-TOF permet aussi d'identifier *M. hominis* à partir d'un milieu de culture⁷¹.

L'interprétation de la culture est aisée pour les prélèvements normalement 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 convient de distinguer colonisation et infection. La présence de *M. hominis* chez l'homme est le reflet d'une colonisation, tout comme sa présence au niveau vaginal chez la femme. Ainsi, la recherche de *M. hominis* dans des prélèvements vaginaux n'est pas recommandée^{69,72}. La présence de *M. hominis* en forte quantité ($\geq 10^4$ UCC/ml) dans un prélèvement vaginal est fréquemment observée dans les cas de vaginoses bactériennes⁷² 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 simple contamination. L'isolement de *M. hominis* à partir d'un prélèvement endo-trachéal ou d'un liquide gastrique en quantité élevée (10^4 UCC/ml) dans un tableau clinique évocateur revêt une signification plus grande⁵⁷.

1.2.3.2 Par biologie moléculaire

Les techniques de PCR sont particulièrement indiquées pour détecter *M. hominis* dans les échantillons où la culture manque de sensibilité comme les liquides amniotiques, les échantillons génitaux hauts et extra-génitaux. Plusieurs techniques de PCR maison conventionnelles puis en temps réel ont été décrites. Elles ciblent principalement l'ARNr 16S⁷³⁻⁷⁵ et le gène *gap* (glyceraldehyde-3-phosphate deshydrogenase)⁷⁶ mais des variabilités de séquences de ces gènes entre les souches limitent la sensibilité de ces techniques. Une PCR en temps réel ciblant le gène conservé *yidC*, codant pour une translocase membranaire, a aussi été développée⁷⁷. Cette PCR, plus sensible que la technique de culture conventionnelle, est corrélée avec elle pour la détermination des quantités de *M. hominis* dans les prélèvements urogénitaux. Des kits de PCR en temps réel multiplex commercialisés incluent aussi la détection de *M. hominis*, généralement avec la détection d'autres pathogènes urogénitaux^{57,78}.

Bien que *M. hominis* soit une espèce hétérogène, quelques méthodes de typage moléculaire sont applicables, par Multi-Locus Variable-Number Tandem-Repeat Analysis (MLVA)⁷⁹, Multi-Locus Sequence Typing (MLST)⁸⁰ voire séquençage du génome entier^{43,45}. Elles restent cependant du domaine de la recherche.

1.2.4 Etude de la résistance aux antibiotiques

1.2.4.1 Méthodes d'étude de la résistance aux antibiotiques

Les exigences nutritionnelles et les conditions de culture des mycoplasmes, bactéries à localisation extra- et intra-cellulaire, sont très différentes des conditions standards recommandées pour les bactéries classiques. Un sous comité du Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) a été constitué dans le but d'établir des protocoles standardisés pour l'étude de l'activité *in vitro* des antibiotiques vis à vis de *M. hominis*⁸¹ (**Tableau 1**). Ces recommandations incluent les souches de référence contrôles à utiliser et les CMI attendues pour ces dernières ainsi que les concentrations critiques nécessaires à la catégorisation des principaux antibiotiques actifs sur *M. hominis*. Les méthodes de dilution en milieu liquide sont les plus fréquemment utilisées. La CMI est définie comme la plus faible concentration d'antibiotique

inhibant le changement de couleur de l'indicateur de pH quand le témoin de croissance sans antibiotique a changé de couleur.

Des troussees adaptées à *Ureaplasma* spp. et *M. hominis* sont disponibles dans le commerce, seules ou au sein de troussees 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 troussees les plus anciennes ou recommandées par le CLSI pour les troussees les plus récentes^{69,70,78} (**Figure 4**). Elles peuvent être réalisées après culture primaire de l'échantillon ou directement à partir du prélèvement. Dans ce dernier cas, les résultats peuvent pêcher par le manque de standardisation de l'inoculum de départ. Parmi les différents kits présents sur le marché, le kit MYCOFAST RevolutioN (Elitech) permet la détection, la numération et l'identification de *Ureaplasma urealyticum/Ureaplasma parvum* et de *M. hominis* dans des échantillons cliniques variés et l'étude de leur sensibilité à certains agents antimicrobiens en accord avec les recommandations du CLSI^{57,81}. Il en est de même pour le kit Myco well D One AST (Servibio). Les kits Sir MYCOPLASMA (Bio-Rad), IST2 (Biomérieux), Mycoplasma IES (Autobio) et Mycoview Quantum (Biosynex) qui permettent le même type de détection, mais ne tiennent pas compte des recommandations du CLSI. De nouvelles galeries sont en développement visant à inclure les concentrations critiques déterminées par le CLSI ou encore à séparer les antibiogrammes des ureaplasmes et des mycoplasmes.

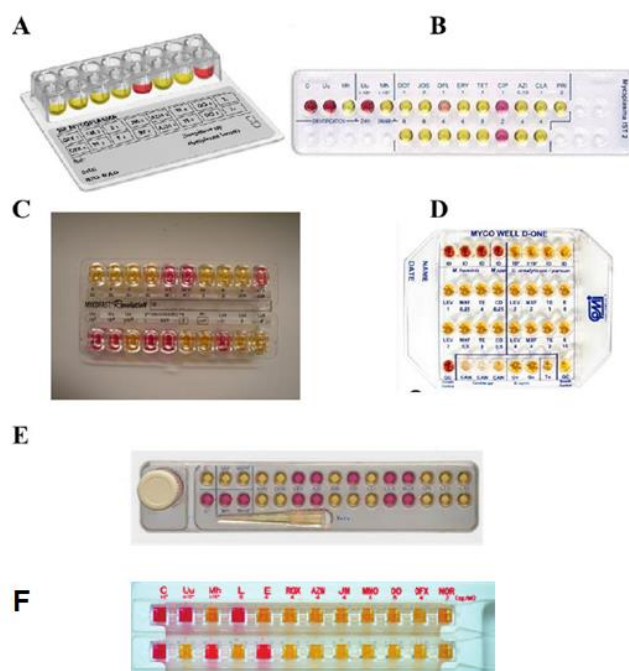


Figure 4 : Différentes trousse commerciales permettant la détection, la numération et/ou l'étude de la sensibilité aux antibiotiques de *Ureaplasma* spp. et *M. hominis*. (A) Sir MYCOPLASMA, Bio-Rad. (B) IST2, Biomérieux. (C) MYCOFAST-RévolutioN, Elitech. (D) Myco well D-One, CPM, SAS. (E) Mycoplasma IES, Autobio. (F) Mycoview Quantum, Biosynex.

La méthode de dilution en milieu solide est plus lourde à réaliser^{70,81}. La CMI est définie comme la plus faible concentration d'antibiotique qui inhibe la formation de colonies quand le témoin de croissance a poussé.

Enfin, la méthode des E-tests créant un gradient de diffusion en gélose donne pour *M. hominis* des résultats correspondant à ceux des méthodes de dilution^{70,82}.

Tableau 1 : Critères d'interprétation des concentrations minimales inhibitrices par microdilution en bouillon ou en agar pour *M. hominis*. (CLSI 2011⁸¹)

Antimicrobial Class	Antimicrobial Agent	MIC (µg/mL) Interpretive Criteria			Comments
		S*	I*	R*	
Quinolones					
	Levofloxacin	≤1	–	≥2	
	Moxifloxacin	≤0.25	–	≥0.5	
Tetracyclines					
	Tetracycline	≤4	–	≥8	Organisms susceptible to tetracycline will also be susceptible to doxycycline.
Lincosamides					
	Clindamycin	≤0.25	–	≥0.5	

* Abbreviations: S, susceptible; I, intermediate; R, resistant.

1.2.4.2 Résistances naturelles

Deux sortes de résistance naturelle sont observées chez les mycoplasmes, l'une commune à toutes les espèces appartenant à la classe des *Mollicutes*, l'autre spécifique à certaines espèces. Ces propriétés ont été utilisées pour isoler les mycoplasmes d'échantillons contaminés par d'autres bactéries ou pour différencier les espèces de mycoplasmes au sein du même échantillon.

Du fait de leur absence de paroi, tous les organismes de la classe des *Mollicutes* résistent aux inhibiteurs de la synthèse de la paroi comme les β -lactamines, les glycopeptides et la fosfomycine. Les mycoplasmes résistent également aux polymyxines, sulfamides, triméthoprim, acide nalidixique et rifampicine^{83,84}. En effet, les mycoplasmes ont perdu la voie de synthèse de l'acide folique sur laquelle agissent les sulfamides. Comme ils n'ont pas de paroi, il ne possèdent pas de LPS, cible des polymyxines. Le mécanisme moléculaire de la résistance à la rifampicine consiste en une mutation naturelle du gène *rpoB* codant pour la sous-unité β de l'ARN polymérase, cible de la rifampicine, empêchant la fixation de l'antibiotique à sa cible.

Les résistances naturelles liées à l'espèce concernent le groupe macrolides-lincosamides-streptogramines et kétolides (MLSK). Les antibiotiques du groupe MLSK entraînent une inhibition de la synthèse des protéines bactériennes en se fixant sur la sous-unité 50S du ribosome. *M. hominis* résiste aux macrolides ayant un cycle à 14 (érythromycine, roxithromycine, clarithromycine, dirithromycine) et 15 chaînons (azithromycine). Il est sensible à certains macrolides à 16 chaînons tel que la josamycine mais pas à la spiramycine. *M. hominis* est sensible à la clindamycine (famille des lincosamides) mais résiste à la télithromycine (famille des kétolides). La résistance intrinsèque de *M. hominis* à l'érythromycine serait liée à une transition G→A en position 2057 (numérotation *Escherichia coli*) de la boucle peptidyltransférase du domaine V de l'ARNr 23S entraînant une diminution de la fixation de l'érythromycine aux ribosomes⁸⁵. Cette transition présente au niveau des deux opérons ribosomiques de *M. hominis* a été associée à une résistance aux macrolides chez d'autres bactéries.

1.2.4.3 Les classes d'antibiotiques actifs sur *M. hominis*

Les antibiotiques potentiellement actifs sur *M. hominis* et utilisés en thérapeutique sont les tétracyclines, les antibiotiques du groupe des MLSK et les fluoroquinolones^{83,84} qui

présentent des niveaux d'activité variés. 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 via le gène *tet(M)*⁸⁴. Les aminosides et le chloramphénicol peuvent être actifs sur les mycoplasmes mais ne sont qu'exceptionnellement utilisés⁸⁶.

1.2.4.4 Résistances acquises

Des résistances acquises aux trois grandes classes d'antibiotiques utilisées en thérapeutique ont été rapportées pour *M. hominis*^{83,84}. Le support génétique de la résistance peut être soit des mutations de la cible, les mycoplasmes se caractérisant par des fréquences de mutation élevées, soit un transfert de gène par transposon. Un mécanisme d'efflux actif a également été démontré *in vitro*^{87,88}.

1.2.4.4.1 Tétracyclines

Les tétracyclines inhibent la synthèse des protéines en empêchant la fixation de l'aminocyl-ARNt entrant dans le site A du ribosome. Une résistance de haut niveau aux tétracyclines (CMI ≥ 8 $\mu\text{g/ml}$) est associée à la présence du gène *tet(M)* qui confère une résistance croisée à toutes les tétracyclines. Ce gène, situé sur le transposon conjugatif Tn916 code pour la protéine Tet(M) qui protège le ribosome et plus particulièrement la sous unité 30S du ribosome de l'action des tétracyclines. Tet(M) est homologue aux facteurs d'élongation EF-Tu et EF-G et sa fixation sur le ribosome entraînant un changement de conformation de celui-ci, empêcherait la fixation de la tétracycline sans altérer la synthèse protéique (**Figure 5**). De telles souches sont facilement détectées à l'antibiogramme et sont rendues résistantes à la tétracycline, doxycycline et minocycline. La détection génotypique peut se faire par amplification du gène *tet(M)*⁸⁹. Les glycylicyclines comme la tigécycline conservent une certaine activité vis-à-vis des souches de *M. hominis* hébergeant le gène *tet(M)*⁸².

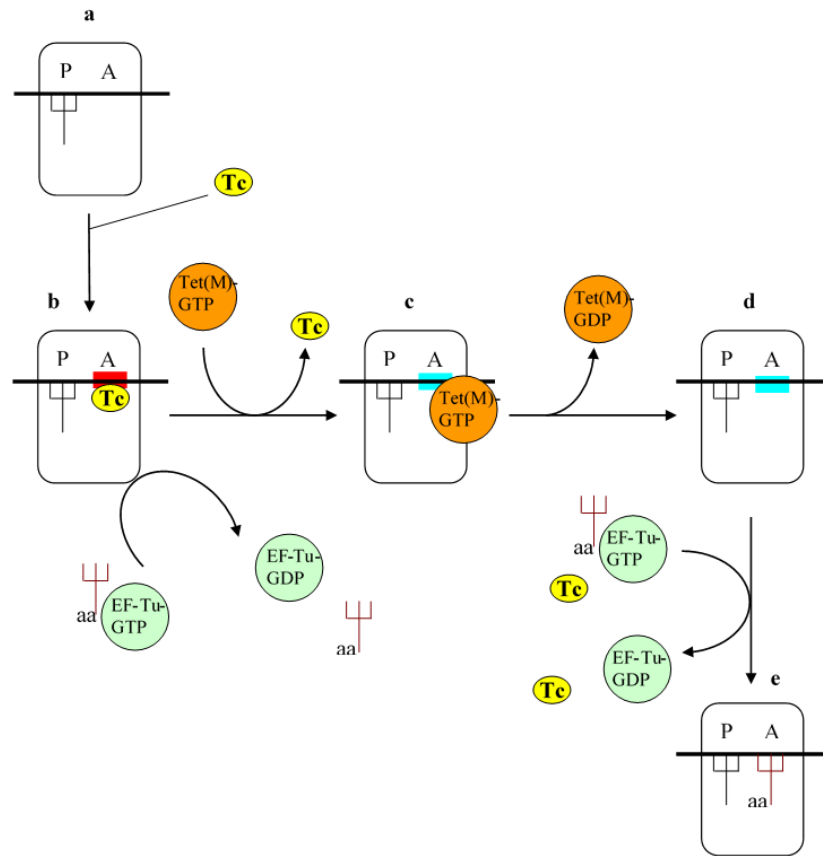


Figure 5. Mécanisme d'action de la protéine Tet(M) (adapté de Connell *et al.* EMBO, 2003⁹⁰).
a. Ribosome bactérien avec les sites A et P. **b.** Fixation des tétracyclines (Tc) sur le ribosome. Le site A change de conformation (rouge), bloquant la fixation du complexe EF-Tu-GTP-aa-ARNt. **c.** La protéine Tet(M) se fixe sur le ribosome chassant la Tc. Un changement de conformation du site A se produit (bleu). **d.** Tet(M) est libéré après hydrolyse du GTP. **e.** Fixation du complexe EF-Tu-GTP-aa-ARNt, en compétition avec Tc.

Par ailleurs, des souches de sensibilité diminuée aux tétracyclines ont été obtenues *in vitro* en présence de concentrations croissantes de tétracyclines⁹¹. La diminution de sensibilité était associée à des mutations de l'ARNr 16S dans la poche de fixation des tétracyclines au niveau des hélices 31 et 34 (**Figure 6**). Ainsi, chez *M. hominis*, des mutations uniques G966T, C1054T et A967T de l'ARNr 16S ont été observées, mais également des doubles mutants G346A et A965T et des triples mutants G346A, A965T, G966T, tous associés à des CMI augmentées à la tétracycline après des passages successifs de la souche initiale *M. hominis* PG21 avec des concentrations sub-inhibitrices de doxycycline. Il est à noter que la mutation G346A ne serait pas associée à la résistance car elle n'est pas située dans une zone de fixation des tétracyclines⁹¹.

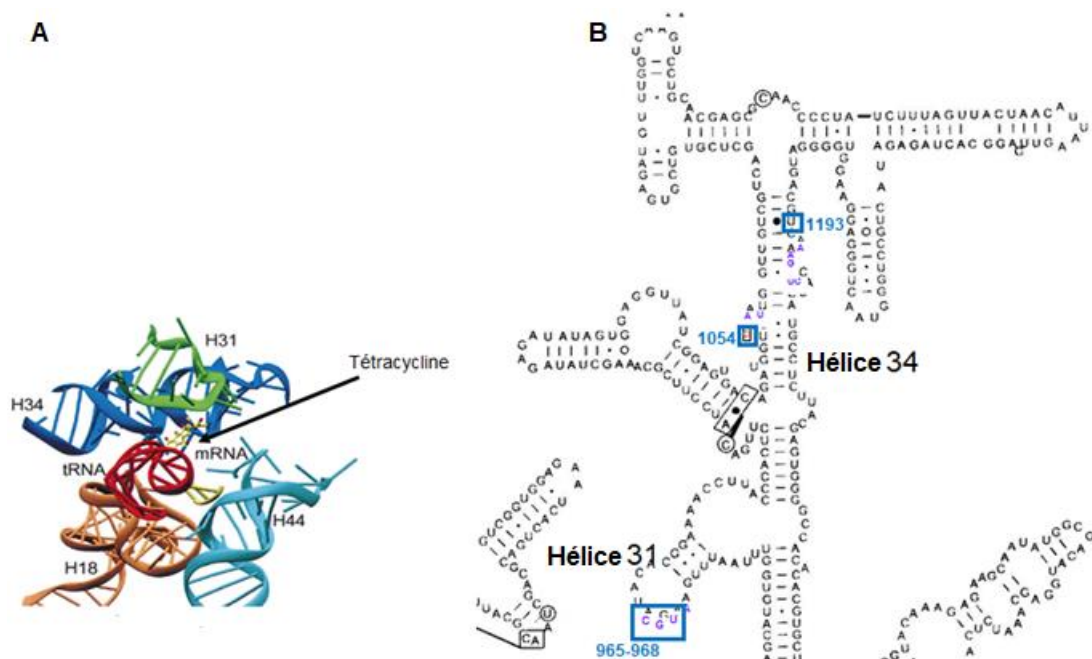


Figure 6 : Mutations de l'ARNr 16S associées à une augmentation de la résistance à la tétracycline obtenue in vitro. A. Aperçu du site de liaison primaire de la tétracycline indiquant les composants de l'ARN proches du site et l'interaction avec l'ARNt au site A, hélice 34 (en bleu), hélice 31 (vert), hélice 18 (orange) et hélice 44 (cyan). Le modèle de l'ARNt du site A (rouge) et de l'ARNm (jaune) est présenté (Brodersen *et al.*, Cell, 2000⁹²). B. Structure secondaire de l'hélice 34 et 31 de l'ARNr 16S où ont été détecté les mutations responsables d'une augmentation de la résistance à la tétracycline. Les sites où ont été détectées des mutations associées à cette augmentation de résistance et la numérotation des ces positions apparaissent en bleu.

1.2.4.4.2 Macrolides et apparentés

De rares résistances acquises aux MLSK ont été décrites chez *M. hominis*. Deux souches cliniques multirésistantes présentant une résistance aux macrolides à 16 chaîons et aux lincosamides ont été rapportées dans des prélèvements respiratoires chez un patient présentant une bronchopneumopathie chronique obstructive soumis à des traitements antibiotiques multiples. La résistance était liée à la présence de deux transitions A2059G et C2611U dans le domaine V de l'un des deux opérons ribosomiques pour une souche, tandis que l'autre portait seulement la mutation en position 2059 sur le même opéron⁸⁵ (Figure 7).

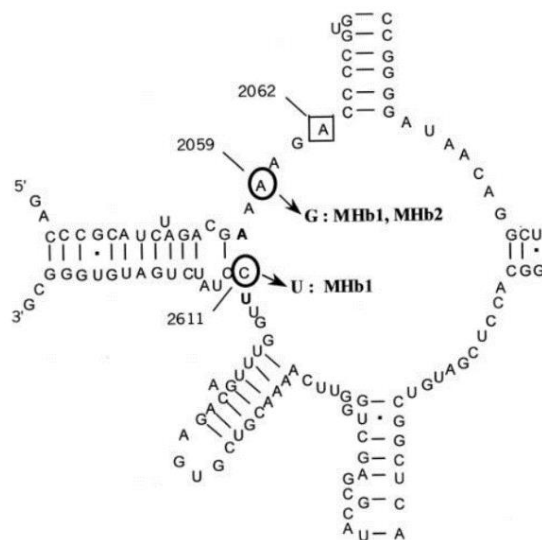


Figure 7 : Positions des mutations associées à la résistance aux macrolides au sein du centre peptidyltransférase du domaine V de l'ARNr 23S de *M. hominis* chez deux isolats cliniques (Pereyre *et al.* 2002⁸⁵). Les nucléotides sont numérotés sur la base de la séquence de *E. coli*. Les mutations G2057A et C2610U, naturellement présentes dans la séquence de l'ARNr 23S de *M. hominis*, sont indiquées en caractères gras. Les nucléotides entourés indiquent les positions des mutations rencontrées dans les deux isolats cliniques (nommés MHB1 et MHB2) en position 2059 et 2611.

Ces descriptions cliniques ont été confirmées par des études de sélection *in vitro* de mutants résistants. Dans une première étude, deux mutants de *M. hominis* PG21, présentant une résistance aux macrolides à 16 chaînons, ont été obtenu par exposition *in vitro* à des doses croissantes de josamycine. Le gène de l'ARNr 23S portaient des mutations en position A2062 (numérotation *Escherichia coli*), qui étaient associées au phénotype acquis⁹³. Une étude plus complète a trouvé d'autres mutations de l'ARNr 23S notamment en position C2611 et des mutations des protéines ribosomiques L4 et L22 associées aux résistances aux MLSK⁹⁴. La fréquence de la résistance acquise aux macrolides chez les isolats cliniques de *M. hominis* est inconnue en France mais est probablement très basse.

1.2.4.4.3 Fluoroquinolones

Les fluoroquinolones inhibent la réplication bactérienne en inhibant l'ADN gyrase et la topoisomérase IV. Chez *M. hominis*, comme chez d'autres espèces de mycoplasmes, la résistance aux fluoroquinolones est liée à des mutations dans les régions déterminant la résistance aux fluoroquinolones (QRDRs) des gènes cibles *gyrA* et *gyrB* de l'ADN gyrase et des gènes *parC* et *parE* de la topoisomérase IV. De telles mutations associées à la résistance aux fluoroquinolones ont été obtenues par sélection *in vitro* de mutants résistants en présence de différentes

fluoroquinolones^{95,96} et sont présentes chez les souches cliniques résistantes. Des souches résistantes aux fluoroquinolones ont aussi été isolées de cultures cellulaires infectées par les mycoplasmes après traitement par ces antibiotiques⁸⁴. La résistance est croisée à l'ensemble des fluoroquinolones, le niveau de résistance dépendant du nombre de mutations et des positions altérées. Ainsi, une seule mutation dans ParC peut entraîner une résistance à l'ofloxacin et à la lévofloxacin, mais un haut niveau de résistance à la moxifloxacin chez *M. hominis* est généralement associé à des mutations dans deux protéines, la sous-unité GyrA de l'ADN gyrase et la sous-unité ParC de la topo-isomérase⁹⁷. Suite à de multiples études, les hot spots les plus fréquemment associés à une résistance aux fluoroquinolones sont dans GyrA, la position 83^{97,98} et 87^{99,100} (numération de *E. coli*), dans ParC, les positions 80¹⁰¹, 81⁹⁹ et 84⁹⁹ et dans ParE la position 420⁹⁹. La moxifloxacin garde la meilleure activité vis-à-vis des mutants mais perd son activité bactéricide *in vitro*¹⁰². Les facteurs de risque d'acquisition d'une souche résistante aux fluoroquinolones sont un traitement antérieur par fluoroquinolones et une immunodépression⁸⁴.

Une résistance à la ciprofloxacine par surexpression d'un système d'efflux actif de type « ATP binding cassette (ABC)-transporter » a également été rapportée chez plusieurs souches de *M. hominis* sélectionnées *in vitro*. Elles présentaient un phénotype multi-résistant avec augmentation des CMI de la ciprofloxacine et du bromure d'éthidium¹⁰³. Deux gènes, *md1* et *md2*, codant pour des transporteurs de type ABC étaient surexprimés chez les souches résistantes¹⁰⁴.

Récemment, l'effet du transfert conjugatif chromosomique horizontal sur la dissémination des résistances aux fluoroquinolones a été étudié¹⁰⁵. En effet, des expériences de conjugaison ont été réalisées entre des souches de *M. agalactiae* résistantes à l'enrofloxacin par mutation des gènes cibles et des souches sensibles présentant un élément intégratif et conjugatif (ICE, cf paragraphe II.3.4). Certains des transconjugants présentaient l'accumulation de trois mutations de résistance présentes chez la souche donneuse situées dans des loci distants *parE-parC* et *gyrA*¹⁰⁵ entraînant des CMI plus élevées à l'enrofloxacin (16 à 32 µg/ml) pour la souche receveuse présentant une CMI initiale <0.5 µg/ml⁻¹. Ce nouveau mécanisme de transfert horizontal de gènes chromosomique serait dépendant de la présence d'ICEs qui codent pour un pore de conjugaison (cf : paragraphe 2.3.4). Ces données montrent que plusieurs allèles responsables de la résistance à l'enrofloxacin peuvent être transférés en une seule étape de conjugaison de cellules résistantes aux mycoplasmes sensibles à l'enrofloxacin alors que pour obtenir le même résultat sous pression de sélection, l'échelle de temps nécessaire pour accumuler

les mutations responsables d'un niveau élevé de résistance à l'enrofloxacin est beaucoup plus longue.

1.2.4.5 Evolution de la résistance aux antibiotique

En utilisant le kit SIR Mycoplasma en accord avec les recommandations du CLSI, il a été montré que le pourcentage des isolats de *M. hominis* résistants à la tétracycline a augmenté de manière significative de 2,8% en 1992¹⁰⁶ à 18,75% entre 1999 et 2002¹⁰⁷ en France. Une étude plus ancienne, en Allemagne avait montré une résistance de *M. hominis* aux tétracyclines de 10-13%¹⁰⁸. Des études menées avant 1990 aux USA avaient reporté des pourcentage de résistance aux tétracyclines à Boston, New York et Seattle de 17 à plus de 30%^{109,110}.

La fréquence de résistance acquise aux macrolides chez les isolats cliniques de *M. hominis* est inconnue en France mais demeure vraisemblablement très basse. Aucune résistance n'a été retrouvée en Allemagne pendant 20 ans¹⁰⁸.

La prévalence de la résistance aux fluoroquinolones chez *M. hominis* en France n'avait pas été étudiée avant cette thèse. Des études ont été menées à l'étranger mais elles utilisaient le kit Mycoplasma IST2 (bioMérieux) dont les concentrations critiques ne sont pas celles fixées par les recommandations du CLSI. Ainsi, les fortes prévalences de la résistance aux fluoroquinolones rapportées en Chine ne sont pas interprétables et comparables^{7,111,112}. Il faut garder en mémoire qu'une limitation de ces études de prévalence reste l'utilisation de différents kits commerciaux qui ne permettent pas toujours d'obtenir des prévalences de résistance comparables entre elles¹¹³.

1.2.4.6 Traitement des infections à *M. hominis*

Les tétracyclines sont le traitement de première intention des infections urogénitales à *M. hominis* de l'adulte^{84,114}. La clindamycine est un traitement de deuxième intention, efficace sur les souches résistantes à la tétracycline. Cependant, malgré une apparente sensibilité *in vitro* à ces antibiotiques, ils n'arrivent pas toujours à éradiquer les mycoplasmes génitaux. Enfin les fluoroquinolones, seuls antibiotiques bactéricides *in vitro* vis-à-vis de *M. hominis*, peuvent constituer une alternative intéressante. Bien que déconseillées chez l'enfant avant huit ans, plusieurs publications reportent l'efficacité de la doxycycline dans le traitement des infections

du système nerveux central chez le nouveau né ou de la clindamycine et du chloramphénicol en raison de leur bonne diffusion dans le LCR¹¹⁴. De même dans les infections systémiques chez l'immunodéprimé, les fluoroquinolones (lévofloxacin et moxifloxacin) représentent une bonne alternative. Des associations de deux antibiotiques parmi clindamycine, doxycycline et fluoroquinolones peuvent être envisagées dans les cas difficiles ou en cas de suspicion de souche résistante aux antibiotiques.

2 Les éléments génétiques mobiles chez les mycoplasmes

2.1 Historique du transfert horizontal de gènes (HGT) chez les bactéries

Au début du XIX^{ème} siècle, Lamarck propose la première formulation scientifique de la théorie de l'évolution. Concept qui ne s'est imposé qu'avec Charles Darwin et son ouvrage *De l'origine des espèces*. Ce livre présente deux idées fondamentales : l'unité et la diversité du vivant s'expliquent par l'évolution, et le moteur de l'évolution est la sélection naturelle. Les travaux de Mendel sur la génétique depuis la seconde moitié du XIX^{ème} siècle ont fait évoluer la théorie de l'évolution. Selon cette théorie, l'évolution serait causée, d'une part, par le mécanisme de la sélection naturelle qui implique l'augmentation de la fréquence, d'une génération à l'autre, des allèles qui favorisent la survie et la reproduction de l'organisme qui les porte. D'autre part, par un mécanisme de dérive génétique qui correspond à la modification aléatoire de la fréquence d'un allèle au sein d'une population. Un autre mécanisme jouant un rôle important dans l'évolution des espèces est le brassage génétique qui correspond au réassortiment des allèles existant au sein d'une population. Ce phénomène permet l'apparition de nouvelles combinaisons d'allèles au fil des générations. Au début du XX^{ème} siècle, des travaux menés chez *Streptococcus pneumoniae* ont décrit les premiers échanges de gènes entre bactéries¹¹⁵. Ceci a conduit au développement du **concept de transfert horizontal**. Ce concept décrit tout processus dans lequel un organisme intègre du matériel génétique provenant d'un autre organisme sans en être le descendant.

A partir des années 1980, le transfert horizontal est progressivement apparu comme un mécanisme majeur de l'évolution des bactéries. Ainsi, la comparaison des génomes de 17 souches d'*E. coli* a montré que seulement 44 % des 5000 gènes qui composent en moyenne un génome sont communs à toutes les souches¹¹⁶. L'absence ou la présence des autres gènes, dits

variables, s'explique par des événements de perte par délétion ou d'acquisition par transfert horizontal. Pour qu'un événement de transfert horizontal soit détectable, il faut que l'ADN nouvellement acquis se maintienne dans la descendance de la cellule réceptrice. Cette acquisition nécessite tout d'abord que l'ADN entrant ne soit pas dégradé et qu'ensuite il soit transmis aux cellules filles lors de la division.

2.2 Les mécanismes de transfert horizontal de gènes

Il y a trois types de HGT bien connu chez les bactéries^{117,118} : (a) la transformation, capacité naturelle des bactéries à intégrer de l'ADN exogène à partir de leur environnement ; (b) la transduction, transfert d'ADN d'une cellule à l'autre via un bactériophage ; et (c) la conjugaison, transfert unidirectionnel d'ADN d'un donneur vers un receveur via un appareil de conjugaison exprimé par le donneur décrit pour la première fois en 1946¹¹⁹. Transduction et conjugaison sont toutes les deux médiées par des éléments génétiques mobiles.

Le mécanisme d'acquisition de l'information génétique par conjugaison est considéré comme majeur dans la dynamique du génome bactérien obtenue par transfert horizontal, en assurant une meilleure efficacité d'acquisition de l'ADN que la transformation et un spectre d'hôte plus important que la transduction. En effet, la probabilité de dégradation de l'ADN nu exogène par des DNases ou des métaux lourds dans l'environnement naturel n'étant pas négligeable, l'efficacité de son acquisition lors de la transformation naturelle peut être lourdement impactée. *A contrario*, lors de la transduction, l'ADN est encapsidé, ce qui le protège des facteurs de risques rencontrés dans l'environnement, augmentant alors l'efficacité de l'ADN exogène à entrer dans une nouvelle cellule hôte. Cependant, la plupart des phages décrits présentent un spectre de spécificité d'hôtes limité. La conjugaison, quant à elle, protège l'ADN étranger du milieu environnant, en plus de présenter un spectre d'hôtes recouvrant une large distance taxonomique¹²⁰. Celle-ci peut concerner des organismes de différents domaines du vivant proches géographiquement, tel que décrit pour le transfert de plasmides conjuguatifs de procaryote à eucaryote^{121,122}. De ce fait, la conjugaison contribue grandement au réservoir de gènes disponibles au sein d'une communauté microbienne en plus de permettre l'acquisition de fragments de tailles plus importantes. Pour exemple, le transfert par conjugaison d'une région de 334 kb et d'un plasmide conjuguatif a été décrit chez *Streptococcus agalactiae*¹²³. Parmi les éléments mobiles soumis au flux, nombreux sont ceux conférant un avantage sélectif à l'organisme porteur. Ainsi, le transfert d'éléments génétiques mobiles conférant des

résistances aux antibiotiques a été observé dans différents écosystèmes : transfert entre bactéries au sein d'hôtes eucaryotes, dans le sol, dans des environnements aquatiques, et vers des bactéries liées à l'industrie alimentaire, ou vers des bactéries pathogènes¹²⁴. Le transfert conjugatif de ces éléments contribue donc significativement à la dissémination des résistances aux antibiotiques et constitue de ce fait un enjeu majeur de santé publique. Ceci est également vrai pour le transfert de gènes de pathogénicité¹²⁵.

Quatre types d'éléments génétiques mobiles ont été décrits : les phages, les éléments transposables, les plasmides et les îlots génomiques. Nous allons seulement nous intéresser aux éléments génétiques mobiles retrouvés chez les mycoplasmes, **en particulier les mycoplasmes humains**.

2.3 Les éléments génétiques mobiles retrouvés chez les mycoplasmes

Chez les mycoplasmes, les éléments génétiques mobiles décrits sont à ce jour les séquences d'insertion (IS), les plasmides, les phages et les éléments intégratifs et conjugatifs (ICEs). Nous nous attacherons essentiellement à décrire ceux présents chez les mycoplasmes humains.

2.3.1 Les séquences d'insertion

Les IS (« *insertion sequence* ») sont les éléments transposables les plus simples. Elles ne contiennent que les informations génétiques nécessaires à leur transposition et codent le plus souvent pour une transposase. De petite taille (généralement inférieure à 2 500 pb), elles sont le plus souvent bordées par des séquences IR (inversement répétées) de 20 à 40 pb qui sont reconnues par la machinerie de transposition (Figure 8).

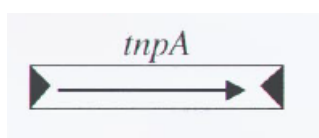


Figure 8 : Structure d'une séquence d'insertion (C. Merlin et A. Toussaint, Société française de génétique, 1999). Les triangles noirs représentent les séquences terminales en répétition inversée (IR). Il s'agit ici d'une forme simple d'IS portant uniquement le gène de la transposase (*tnpA*).

Deux IS suffisamment proches l'une de l'autre peuvent agir de concert et mobiliser le segment d'ADN qu'elles encadrent. Ces structures sont appelées transposons composites

(**Figure 9**). Très souvent, seule l'une des deux IS du transposon code pour une transposase fonctionnelle, l'autre codant souvent pour un régulateur de la transposition. Le segment d'ADN encadré par les IS n'intervient pas dans la transposition et peut coder pour n'importe quelle fonction.

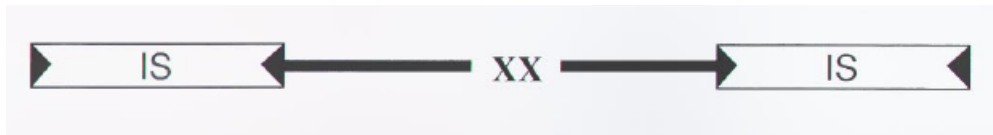


Figure 9 : Structure d'un transposon composite (C. Merlin et A. Toussaint. Société française de génétique, 1999). Les triangles noirs représentent les séquences terminales en répétition inversée (IR). La séquence interne (notée XX) des transposons composites, contenant des gènes de résistance aux antibiotiques ou aux métaux lourds, ou des gènes cataboliques, est localisée entre deux IS.

L'implication remarquable des IS dans l'évolution et la plasticité des génomes a fait l'objet de plusieurs études dans la littérature. Les IS peuvent s'insérer en amont d'un gène et activer son expression selon deux manières principales : soit via des promoteurs contenus entièrement dans l'IS ou par formation de promoteurs hybrides suite à l'insertion¹²⁶.

Les IS sont trouvées chez de nombreuses bactéries incluant les mollicutes. Plus de 500 CDSs dans le génome complet de 33 mollicutes réfèrent à la production d'une transposase, cependant il ne s'agit que d'une estimation du nombre d'IS chez les mycoplasmes puisque des IS supplémentaires ont été annotées comme des pseudogènes¹²⁷. De nombreuses familles d'IS ont été trouvées dans le génome des mollicutes, dans tous les groupes phylogénétiques, incluant les familles IS3, IS4, IS30, IS150, IS256, IS481 et IS1634¹²⁷.

Chez *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* PG1, agent de la pleuro-pneumonie bovine, les IS représentent plus de 13% de la taille du génome¹²⁸. L'abondance des séquences d'insertion dans le génome de certaines espèces de mycoplasmes comme *M. agalactiae* (ISMag1)¹²⁹ ou *M. bovis* (ISMbov2 et ISMbov3)¹³⁰ a d'ailleurs trouvé une application à but épidémiologique dans le sous-typage génétique fin de certains sérotypes. En effet, le répertoire et le nombre d'IS peut varier au sein d'une même espèce, par exemple chez *M. agalactiae*, la souche 5632 contient 12 copies d'ISMag1¹²⁹ et 3 copies d'ISMag2 qui ne sont pas retrouvées dans la souche de *M. agalactiae* PG2¹³¹. Les IS ont également un impact considérable sur l'organisation génomique et les capacités de codage des mycoplasmes. En effet, les IS ont été associées à des réarrangements géniques rapides accompagnés d'une excision ou insertion d'un

nouvel élément de type IS dans une étude de sous-clones de *M. fermentans*¹³². Dans le même esprit, chez *M. bovis*, une haute prévalence de diverses séquences d'insertion a récemment été mise en évidence au sein de loci *rrn* qui codent pour l'ARN ribosomique¹³³. Même si l'étude de l'impact de ces insertions sur l'expression du gène *rrs* qui code pour l'ARN 16S et sur les taux de croissance de *M. bovis* n'a pas montré de différences significatives, la forte prévalence des IS dans cette région semblerait indiquer que ces éléments génétiques mobiles auraient un rôle important dans la régulation de la synthèse des ribosomes et de leur fonction¹³³.

Chez les mycoplasmes humains, certaines espèces comme *M. genitalium* et *M. pneumoniae* ne possèdent pas de séquences d'insertion dans leur génome. En revanche, pour *M. penetrans*, *M. hominis*, *M. orale* et *M. fermentans*, des IS ont été trouvées dans leur génome. Le séquençage du génome de *M. penetrans* HF-2 a mis en évidence la présence de 21 transposases potentielles d'IS et cinq copies de l'IS232¹³⁴. Leurs types se distinguaient les uns des autres et étaient classés en quatre groupes différents, à savoir: orthologues de la transposase pour (i) IS1202 (1556 pb), (ii) IS232 (1412 pb), (iii) IS1630 (1016 pb) et (iv) les autres IS comprenant les formes tronquées. Au total, environ 24 591 pb de séquence correspondant à 1,8% du génome ont été identifiés comme transposases pour les IS. L'inactivation de familles de gènes paralogues par insertion d'IS a également été constatée chez *M. penetrans*¹³⁴. Chez *M. orale*, un élément ressemblant à une IS retrouvée chez *M. fermentans* a pu être détecté¹³⁵. Chez *M. fermentans*, une étude a été menée en utilisant une PCR ciblant une partie conservée de l'IS1550 sur un panel de 30 souches potentielles de *M. fermentans*. Cette PCR a permis de vérifier l'identification de souches de *M. fermentans*. En effet, tous les *M. fermentans* possédaient l'IS1550 appartenant à la famille des IS3 ce qui a pu s'avérer utile pour la détection de *M. fermentans* dans du matériel clinique¹³⁶. Chez *M. fermentans* PG18, il a été trouvé un IS1630 qui appartient à la famille des IS30¹³⁷. Enfin, chez *M. hominis* PG21, une région fragmentée de l'IS1138 qui appartient à la famille des IS3 a pu être mise en évidence²⁷. De plus, dans une souche clinique de *M. hominis*, une nouvelle IS, homologue aux transposases de la famille IS30, a été trouvée¹⁰⁷.

2.3.2 Les plasmides

Les plasmides sont composés d'ADN double brin extrachromosomique et se répliquent de manière autonome grâce à la machinerie de réplication de leur cellule hôte qui reconnaît leur origine de réplication (*oriC*). Ils sont présents chez pratiquement toutes les espèces bactériennes. Les plasmides peuvent être très variables de par leur taille, le nombre de copies

ou encore les gènes pour lesquels ils codent. Généralement ils confèrent un avantage sélectif à la bactérie. Les plasmides se répliquent selon deux mécanismes : théta ou en cercle-roulant. La réplication en théta démarre par la séparation des deux brins au niveau de l'oriC, puis s'ensuit une réplication qui peut être uni ou bidirectionnelle¹³⁸. La réplication en cercle roulant est initiée par une coupure simple brin puis l'ADN est synthétisé en tournant autour du brin non coupé de manière unidirectionnelle¹³⁹. Certains plasmides ne peuvent pas coexister au sein d'une même cellule, ils font partis du même groupe « d'incompatibilité ». L'incompatibilité se produit entre des plasmides partageant les mêmes déterminants impliqués dans leur réplication entraînant alors des interférences et a été utilisée pour la classification des plasmides bactériens¹⁴⁰. On distingue les plasmides dit conjugatifs des plasmides dit « mobilisables ». Les plasmides conjugatifs peuvent transférer d'une cellule à une autre via un mécanisme de conjugaison. Ces plasmides codent les éléments nécessaires à leur propre transfert. Les plasmides dits « mobilisables » ne possèdent qu'une partie des gènes nécessaires à leur transfert et sont donc dépendants de l'établissement de la machinerie conjugative d'autres éléments conjugatifs.

La présence de plasmides dans plusieurs souches de spiroplasmes a été décrite dès le début des années 1980¹⁴¹. Depuis 2005, plusieurs séquences complètes de plasmides de spiroplasmes ont été déposées dans les banques de données parmi lesquelles celles de plasmides de la famille pSci de *S. citri* GII3 qui seraient impliqués dans la transmissibilité de cette bactérie par son vecteur¹⁴². Des plasmides ont également été identifiés dans de nombreuses souches de phytoplasmes. Ils portent en moyenne 2 à 10 gènes dont l'essentiel codent des protéines de fonctions inconnues¹⁴³.

Les rares plasmides isolés de mycoplasmes proviennent de souches appartenant au groupe mycoides. Quatre d'entre eux ont été séquencés : pADB201 (1.7 kpb)¹⁴⁴, pBG7AU (1kpb)¹⁴⁵, pKMK1 (3.3kpb)¹⁴⁶ et pMyBK1 (3.3 kpb)¹⁴⁷. Les plasmides pADB201, pBG7AU et pKMK1 ne codent que pour deux protéines : une Rep, proche des protéines de réplication des plasmides à cercle roulant de type pMV158/pLS1 et une protéine régulatrice du nombre de copies CopG. Le plasmide pMyBK1, isolé de *M. yeatsii*, porte également deux CDSs, mais aucun n'a d'homologie avec des gènes codant des protéines de réplication plasmidique. L'ORF1 du plasmide pMyBK1 code une protéine ayant des similarités de séquence avec des protéines de mobilisation (relaxases) de plasmides de firmicutes, classant le pMyBK1 dans la famille MOBf des systèmes conjugatifs dont le prototype est le plasmide pMV158¹⁴⁸. Le produit de l'ORF2 ne possède pas de domaines caractéristiques mais présente des similarités

de séquences avec les régions N-terminales de protéines hypothétiques de *M. capricolum* qui elles-mêmes possèdent un domaine de type hélicase. Une analyse, menée sur 194 souches de mycoplasmes pathogènes de ruminants des groupes Hominis et Spiroplasma a permis d'identifier 37 souches appartenant au cluster *mycoides* et porteuses de plasmides¹⁴⁹. Vingt et un de ces plasmides ont été séquencés et comparés les uns aux autres ainsi qu'aux cinq plasmides de mycoplasmes disponibles à l'époque dans la banque de donnée GenBank.: pBG7AU de *M. leachii*, pADB201, pKMK1, pMmc95010 et pMyBK1 de *M. yeastsii*. Ceci a permis d'identifier neuf nouveaux plasmides. Des séquences de plasmides ont aussi été isolées chez des espèces de mycoplasmes proches ou inclus dans le cluster *Mycoides*, il s'agit de *M. mycoides* subsp. *capri*, *M. capricolum* subsp. *capricolum*, *M. cottewii*, *M. leachii* et *M. yeastii*¹⁴⁹. Toutes les souches ne portaient qu'un seul plasmide à l'exception de *M. yeastii* qui en portait deux. Aucune corrélation entre la présence de plasmides et l'histoire des souches en terme d'année, de localisation ou encore de type d'hôte n'a pu être établie. Tous les plasmides montraient une organisation génétique similaire à pMmc-95010¹⁵⁰ et pMV158 isolé pour la première fois chez *S. agalactiae*¹⁵¹ à l'exception de pMyBK1 de *M. yeastii* qui n'a pas la même organisation et donc ne fait pas partie de la même famille. Si des plasmides ont été retrouvés dans le cluster *Mycoides*, aucun n'a été retrouvé dans le groupe phylogénétique Hominis, notamment aucun dans les espèces *M. bovis* et *M. agalactiae*¹⁴⁹.

Chez les mycoplasmes aucun gène additionnel pouvant conférer un avantage sélectif n'a été identifié sur plasmide, cependant, l'alignement du plasmide de *M. mycoides* subsp. *capri* (Mmc 95010)¹⁵⁰ avec les séquences des ICEs a montré que ces éléments ont pu échanger des séquences. Ceci suggère que ces deux types d'éléments génétiques mobiles peuvent interagir au sein du mycoplasme et peut-être coopérer dans la transmission de cellule à cellule. Enfin, **chez les mycoplasmes humains**, il n'a jamais été trouvé à notre connaissance de plasmides.

2.3.3 Les phages

Les phages sont des virus n'infectant que les bactéries. Ils sont composés d'un acide nucléique, ADN ou ARN, encapsidé dans une structure protéique. Ils peuvent suivre un cycle lytique ou lysogénique. Lorsque le phage infecte une cellule bactérienne et suit un cycle lytique, la cellule infectée est lysée suite à la réplication du phage, après que celui-ci ait détourné la machinerie de réplication bactérienne. En revanche, certains phages dits tempérés suivent un cycle lysogénique au sein de la bactérie hôte et demeurent intégrés dans le chromosome

bactérien sous la forme de prophages. Dans ce cas de figure, le phage est répliqué avec le reste de l'ADN résident, assurant alors son maintien au cours des générations. Lorsque l'hôte rencontre une détérioration des conditions de vie suite à un stress comme lors de privations en nutriments, le prophage sort de son état de dormance et déclenche un cycle lytique. Cela se traduit par la lyse cellulaire et la dissémination du phage dans le milieu environnant¹⁵². L'analyse de 115 génomes séquencés de procaryotes a montré une prévalence élevée (190/115) de prophages dans les chromosomes de bactéries pathogènes¹⁵³. Ces observations sont liées au fait que les prophages sont souvent porteurs de facteurs de virulence, tel que démontré pour la première fois en 1951 pour le phage- β de *Corynebacterium diphtheriae* codant pour la toxine diphtérique¹⁵⁴. Des cas similaires ont par la suite été décrits, notamment pour la transmission de l'agent du choléra via le phage CTX Φ de *Vibrio cholerae*¹⁵⁵, ou des entérotoxines P et A codées respectivement par les phages Φ N315 et Φ 13 de *Staphylococcus aureus*^{156,157}.

Peu de phages ont été décrits chez les mollicutes, la description la plus précoce de virus concerne MLV1,-2,-3 chez *Acholeplasma laidlawii*¹⁵⁸ et d'un phage ressemblant au phage lambda dans les espèces de *Spiroplasma*¹⁵⁹. Chez *S. citri*, un phage circulaire, simple brin de 8 kb dont la plupart des ORF sont de fonction inconnue a été trouvé¹⁶⁰. Des phages ont été décrits chez *M. bovirhinis*¹⁶¹, *M. pulmonis*¹⁶², *M. arthritidis*¹⁶³ et **chez les mycoplasmes humains, *M. hominis*¹⁶⁴ et *M. fermentans*¹⁶⁵.**

Chez *M. fermentans* PG18, un prophage de 16 kb phiMFV1 a été décrit. Parmi les 18 cadres de lecture ouverts codés par phiMFV1, alors que la plupart pouvaient être attribués à des fonctions liées à la biologie des phages (excisionnase/intégrase), il a été trouvé que l'un codait une protéine de surface membranaire Mem¹⁶⁵. La comparaison de ce prophage avec phiMAV1, un prophage décrit chez *M. arthritidis*¹⁶³, a montré de nombreuses homologues. Ces deux espèces de mycoplasmes appartiennent d'ailleurs au même groupe phylogénétique Hominis¹⁵. La protéine Mem unique exprimée à partir de phiMFV1 et les lipoprotéines de surface hypothétiques uniques codées par phiMAV1, suggèrent que les gènes associés à un prophage peuvent fournir des traits phénotypiques spécifiques et sélectionnables lors de la co-évolution d'espèces de mycoplasmes avec leurs hôtes mammifères respectif. Le prophage MAV1 induirait une augmentation de virulence de *M. arthritidis* lors de l'infection de rats¹⁶⁶, la lipoprotéine de surface Vir étant le facteur de virulence candidat¹⁶⁷. Cependant, la transformation d'une souche non lysogène par un vecteur permettant l'expression de *vir* seul ne s'accompagne pas d'une augmentation de la virulence¹⁶⁸. Cette fonction est de plus controversée car d'autres études ont

montré que cette même protéine Vir est impliquée dans la résistance à l'infection par d'autres phages¹⁶⁹.

Chez *M. hominis*, quelques phages ont été rapportés. Chez *M. hominis* LBD-4 (ATCC 27545), le prophage MhoV1¹⁰ de 15,9 kb comprenant 14 ORF orientés de manière similaire a montré une homologie avec phiMFV1 et phiMAV1 renforçant l'idée d'une nouvelle famille de prophage. Un prophage de 15,2 kb a également été détecté dans la souche *M. hominis* AF1, issue d'un liquide amniotique. Ce phage a lui aussi montré des similitudes avec le prophage phiMFV1⁵⁸.

Même si la fonction des phages n'est à ce jour pas encore clairement élucidée, la rétention de ces éléments de prophage labile dans des organismes ayant une taille de génome réduite de manière drastique implique certainement un rôle important dans l'adaptation et la survie¹⁶⁵.

2.3.4 Les ICEs

2.3.4.1 Généralités et mécanisme de transfert

Les ICEs aussi connus sous le nom de transposons conjugatifs sont des éléments génétiques mobiles dont la taille varie de 18 kb (par exemple le Tn916) à plus de 500 kb pour l'ICE retrouvé chez *Mesorhizobium loti* souche R7A (ICEMISym^{R7A})¹⁷⁰. Les ICEs ont la capacité de s'exciser du chromosome de l'organisme donneur, de se circulariser, de se répliquer, et de se transférer vers une cellule réceptrice par conjugaison avant de s'intégrer au chromosome de la cellule réceptrice afin d'assurer leur maintien à la descendance^{171,172}. L'intégration et l'excision des ICEs est due à une recombinase codée par l'ICE souvent homologue à une intégrase de phage. De nombreux ICEs s'insèrent à un site spécifique dans le chromosome bactérien appelé *attB* (**Figure 10**). Le site d'attachement sur l'ICE est dénommé *attP* ou *attICE*. L'intégration aboutit à la formation de deux répétitions directes d'ADN, bordant chacune les extrémités de l'élément : site *attL* à l'extrémité gauche, et site *attR* à l'extrémité droite.

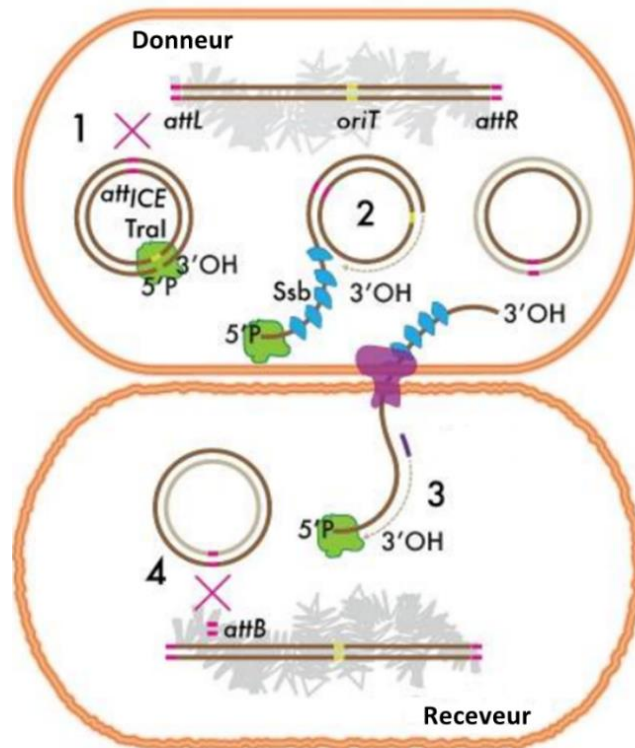


Figure 10 : Modèle général de transfert des ICEs (Delavat *et al.*, 2017¹⁷³). L'ICE intégré dans le chromosome hôte s'excise par recombinaison site-spécifique (croix roses) entre les sites d'attachements *attL* et *attR*. L'ICE excisé (1) est clivé sous forme simple brin au niveau de l'origine de transfert *oriT*, puis est reconstitué par réplication par cercle roulant suite à l'action de la relaxase (2) (vert). Une copie unique du simple brin est conduite à travers le pore de conjugaison de type IV par la protéine Ssb (Single-strand DNA binding protein) vers la bactérie réceptrice. La molécule double brin d'ADN est reconstituée (3) et se recombine de façon site-spécifique avec le site *attB* du chromosome bactérien pour être réintégrée (4).

L'ICE est initialement intégré dans le chromosome hôte. Quand l'expression des gènes de l'ICE est induite, l'ICE s'excise du chromosome de l'hôte et forme un plasmide circulaire d'ADN double brin. Les protéines codées par l'ICE sont produites et certaines s'assemblent pour former un pore de conjugaison. L'ICE code pour une relaxase qui va entailler un brin de l'ADN double brin de l'ICE et s'attacher de manière covalente à l'extrémité 5' de l'ADN entaillé formant l'ADN de transfert (**Figure 10**). Si un receveur approprié est disponible, la machinerie de conjugaison transporte l'ADN de transfert dans la cellule receveuse. Dans la cellule receveuse, la relaxase lie les extrémités 5' et 3' de l'ADN pour former un cercle d'ADN simple brin fermé de manière covalente. Le brin complémentaire d'ADN est synthétisé pour générer un cercle d'ADN double brin, substrat pour l'intégration dans le chromosome de la cellule receveuse. Chez le donneur, le brin d'ADN restant sert de modèle pour une réplication en cercle roulant permettant de générer un cercle d'ADN double brin qui peut être réintégré dans le chromosome

de l'hôte. Sans cette synthèse et réintégration, l'ICE peut être perdu de la cellule de laquelle il a été excisé.

La différence fondamentale entre les plasmides et les ICEs réside dans leur mode de maintenance dans la cellule bactérienne. Les plasmides conjugatifs se répliquent de façon autonome pour persister à long terme dans les populations cellulaires, tandis que les ICEs s'intègrent et se répliquent avec le chromosome¹⁷⁴. Cependant cette définition est elle-même controversée, puisqu'il a été démontré que l'ICE Bs1, trouvé chez *Bacillus subtilis*, était capable de réplication autonome¹⁷⁵.

2.3.4.2 Une organisation modulaire

D'un point de vue structural, les ICEs sont organisés en plusieurs modules (**Figure 11**) assurant leur maintien, leur dissémination et leur régulation⁶:

- Un module de recombinaison, codant pour l'intégrase et d'autres protéines permettant l'excision et l'intégration,
- Un module de conjugaison, où se trouve l'origine de transfert (oriT) et les protéines du pore conjugatif, souvent homologue au système de sécrétion de type IV,
- Un module de régulation, permettant de contrôler le processus de recombinaison et de conjugaison en fonction des conditions cellulaires.
- Un module d'adaptation, qui peut comprendre un nombre considérable de gènes connus pour augmenter la compétitivité de l'hôte par rapport à d'autres bactéries se trouvant dans le même écosystème.

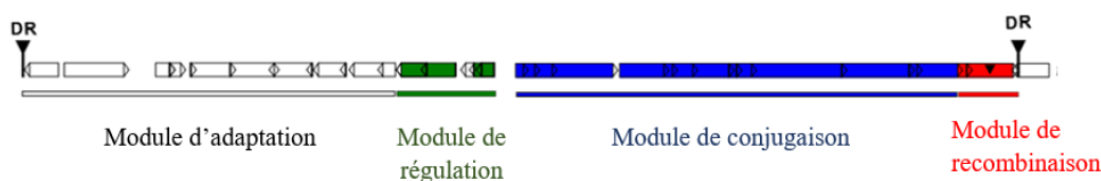


Figure 11 : Les différents modules de l'ICE. Les ICE sont composés par différents modules indiqués chacun par une couleur (d'après Dahmane, 2018¹⁷⁶).

Le module d'excision/intégration code généralement une recombinase, souvent une tyrosine recombinase mais qui peut aussi être une sérine recombinase ou une recombinase DDE, chacune de ces familles d'enzymes étant capable de reconnaître les différences séquences répétées directes ou inverses d'ADN bordant un élément donné.

Les recombinaises à tyrosine correspondent à la famille d'intégrase la plus représentée parmi les ICEs décrits à l'heure actuelle et montrent une interaction spécifique de site, de la même manière que les sérine recombinaises même si ces dernières sont moins communes. Les transposases DDE montrent une faible spécificité d'intégration et n'assurent la mobilité que de quelques ICEs restreints au phylum des Firmicutes. Les transposases DDE ont une architecture du domaine catalytique avec une triade d'acides aminés essentiels conservés (Asp, Asp et Glu). Ce domaine catalytique est associé avec une région liant l'ADN généralement localisée dans la partie N-terminale de la partie de la protéine responsable de la reconnaissance des répétitions inverses (IRs) terminales¹⁷⁷.

Le module de conjugaison code généralement pour les protéines entrant dans la formation du pore conjugatif, souvent homologue avec un système de sécrétion de type IV (T4SS). En effet, le transfert de l'ADN simple brin se fait à travers ce T4SS qui est une structure trans-enveloppe remplissant des fonctions de translocations diverses. Ce système a d'abord été connu pour la translocation d'ADN et de macromolécules à travers la paroi de bactéries à Gram négatif, notamment chez *Agrobacterium tumefaciens* pour le transfert d'ADN oncogène à l'origine de la galle du collet chez les plantes¹⁷⁸. Le T4SS a par la suite été défini comme le mécanisme essentiel au transfert conjugatif d'une majorité d'ADN mobile de type plasmide ou ICE dépendant du contact de la bactérie donatrice de l'élément avec la bactérie réceptrice.

Le T4SS d' *A. tumefaciens* est le mieux décrit¹⁷⁹. Il est composé de 11 protéines VirB (VirB1 à VirB11) synthétisées par l'opéron virB codant l'ensemble des composés formant le pore de conjugaison. La protéine VirB4 possède une activité ATPase et représente ainsi une source d'énergie nécessaire à l'activité de translocation du T4SS. Une autre protéine relativement conservée du T4SS est la protéine VirB6, qui forme le pore de conjugaison au niveau de la membrane interne. La protéine VirB1 constitue quant à elle l'hydrolase du peptidoglycane nécessaire à l'assemblage du pore protéique de conjugaison. Un second opéron, l'opéron virD, complète le dispositif. Il comprend quatre gènes (VirD1 à VirD4) dont un codant la relaxase (VirD2) et la protéine de couplage (VirD4). La protéine VirD4 (aussi connue sous le nom de protéine de couplage ou T4CP) est une ATPase responsable du recrutement des substrats du T4SS. La relaxase VirD2 clive l'ADN simple brin et forme un complexe nucléoprotéique reconnu par T4CP, qui dirige l'ensemble vers le T4SS. Des homologues du système VirB/VirD sont retrouvés dans d'autres systèmes conjugatifs de bactéries ; des différences peuvent néanmoins concerner la composition et le nombre des

différentes sous-unités du système VirB/VirD selon la nature du substrat transféré¹⁸⁰⁻¹⁸³. La conjugaison à travers le T4SS nécessite parfois la mise en place d'un pilus assemblé par le T4SS lui-même. Le pilus se forme suite à la polymérisation de sous-unités de pilines qui lui permettent d'entrer en contact avec la paroi de la cellule réceptrice afin de l'attirer vers la cellule donatrice. Le T4SS des bactéries à Gram positif est moins décrit (**Figure 12**). Néanmoins celui-ci présente de nombreuses similarités avec le T4SS des bactéries à Gram négatif, notamment au niveau des premières étapes mettant en jeu la coupure de l'extrémité 5' de l'ADN ciblé par la relaxase et son transfert au pore protéique de conjugaison.

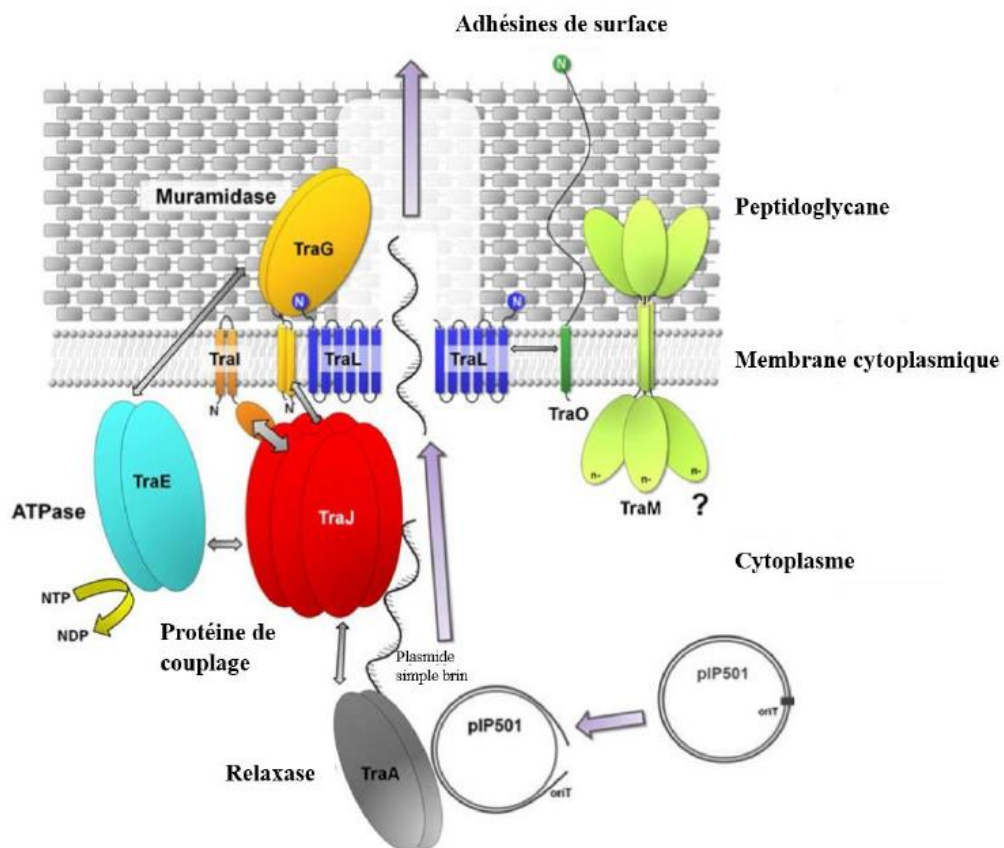


Figure 12: Modèle représentant le T4SS du plasmide pIP501 de *Streptococcus agalactiae* (d'après Goessweiner-Mohr *et al.*, 2014¹⁸⁴). La relaxase TraA se lie à la séquence oriTpIP501 et clive la molécule d'ADN. Le plasmide simple brin est ensuite transféré au pore de conjugaison par le biais des protéines de couplages putatives TraJ. (N) correspond à l'extrémité N-terminale des protéines du T4SS. Les flèches indiquent une interaction entre deux acteurs protéiques, et la largeur de la flèche est proportionnelle à la force de l'interaction. TraA, homologue de VirD2 ; TraE, homologue de VirB4 ; TraJ, homologue de VirD4 ; TraL, homologue de VirB6 ; TraG, homologue de VirB1 ; TraM, homologue de VirB8.

En revanche, l'étape de translocation de l'ADN à travers le T4SS montre des différences considérables entre les deux types de bactéries, probablement dues aux différences d'organisation de leurs parois respectives. De ce fait, aucun homologue des protéines

VirB7-9-10 rentrant dans la composition du pore de conjugaison n'a encore été identifié dans les T4SS des bactéries à Gram positif. En revanche, des homologues de VirB1, VirB4, VirB6, VirB8, et VirD4 sont retrouvés dans les T4SS des bactéries à Gram positif¹⁸⁴. De plus, tandis que le T4SS des bactéries à Gram négatif met en place la synthèse de pili, aucune structure similaire n'a été décrite pour le transfert conjugal des plasmides et ICEs des bactéries à Gram positif. Le transfert serait par conséquent dépendant de la capacité des cellules à entrer directement en contact. Ainsi, le T4SS de ces bactéries code parfois des adhésines de surface facilitant l'interaction avec la paroi du deuxième partenaire¹⁷⁶.

Le transfert des ICEs est gouverné par un **module de régulation** complexe pouvant être activé et réprimé en réponse à des stimuli environnementaux. Ces signaux vont influencer l'expression et l'activité de l'ICE modulant ainsi l'expression des gènes nécessaires à l'excision et au transfert de l'élément. Des études ont montré que l'expression constitutive des gènes de conjugaison des ICEs pouvait être nocive pour la cellule hôte et pour le maintien de l'élément¹⁸⁵, mettant ainsi en exergue la nécessité d'une régulation fine de l'expression des gènes de transfert de l'élément. L'ICE peut sous certaines conditions être induit, ce qui aboutit à la dérégulation de l'expression des gènes de l'élément et à l'excision de ce dernier, assurant ainsi sa disponibilité pour un éventuel transfert. Cependant, même sous ces conditions d'induction, l'ICE ne sera excisé que chez une faible proportion de la population, ce qui témoigne d'une régulation stricte de ces éléments^{176,186}.

Enfin, **les ICE portent un module d'adaptation** qui peut comprendre un nombre considérable de gènes pouvant conférer un avantage sélectif à l'organisme hôte tel que la résistance aux antibiotiques, aux métaux lourds et aux phages, des gènes de pathogénicité, la capacité à effectuer des symbioses, ainsi que de nouvelles voies métaboliques¹⁸⁷⁻¹⁸⁹. Cette stratégie adaptée par les ICEs contribue à leur maintien au sein de la population et à leur succès évolutif¹⁷⁴. Les ICEs évoluent par l'échange ou l'acquisition de gènes appartenant au module d'adaptation à partir d'autres éléments génétiques mobiles tels que des ICEs, des plasmides ou des prophages, mais aussi par la perte de ces gènes¹⁷³.

2.3.4.3 Les ICEs chez les mycoplasmes

2.3.4.3.1 Découverte des ICEs chez les mycoplasmes et mise en évidence de leur transfert horizontal

Le premier ICE décrit chez les mycoplasmes est celui de *M. fermentans* PG18³, nommé ICEF. Il est présent en 4 copies de 23 kb qui se composent de 20 CDSs et représentent 8% du génome de *M. fermentans* PG18. Quatre ans après cette découverte, un ICE de 27 kb et 23 CDS fut à son tour identifié, présent en trois copies identiques chez *M. agalactiae* 5632⁴, nommé ICEA et présentant 12 CDS homologues à ICEF (**Figure 13**).

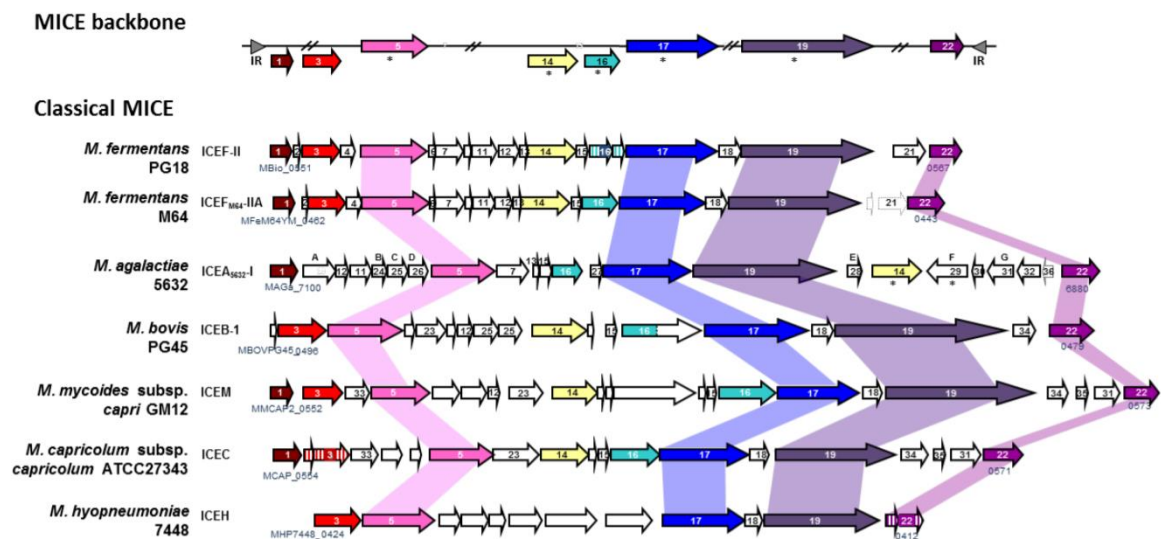


Figure 13: Organisation génomique et comparaison des ICEs isolés chez les mycoplasmes. Les CDS hautement conservés du squelette minimal apparaissent sur la première ligne. Ceux parfois absents ou tronqués figurent au dessous. Les CDS contenant des domaines transmembranaires sont indiqués par une étoile. La couleur de chaque CDS est conservée pour les différents ICEs homologues. Les CDS hachurés représentent les pseudogènes (adapté de C. Citti *et al.* 2018¹⁹⁰).

En 2013, la capacité de *M. agalactiae* 5632 à conjuguer grâce à la présence d'ICEA a été mise en évidence, ainsi que la capacité pour des souches initialement sans ICE qui reçoivent un ICEA par transfert horizontal, d'acquérir la nouvelle capacité à conjuguer² (**Figure 14**). Les taux de fréquence des transconjugants varient de $2.7 \cdot 10^{-11}$ à $7.2 \cdot 10^{-8}$ selon la combinaison de souches utilisées pour les expériences de conjugaison¹⁰⁵.

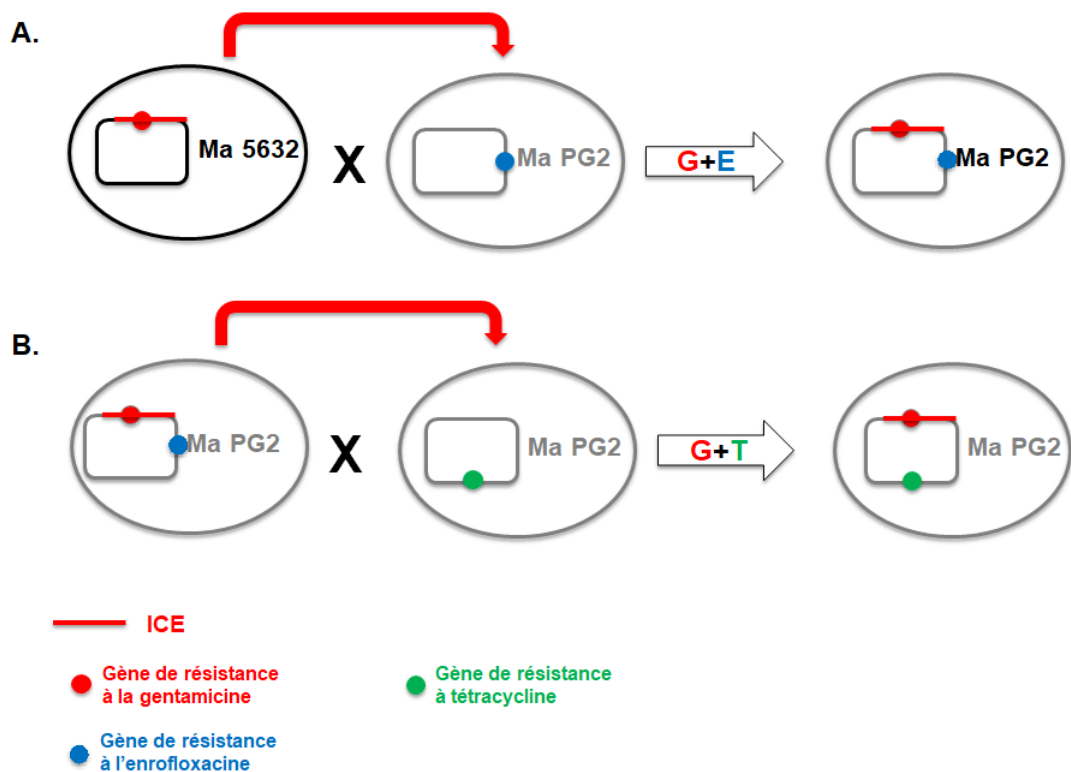


Figure 14 : Représentation schématique du transfert horizontal d'ICE chez *M. agalactiae* (adapté d'après Dordet-frisoni *et al.*, 2013²). **A.** Transfert de l'ICE présent chez la souche de *M. agalactiae* 5632 donneuse vers une souche de *M. agalactiae* PG2 receveuse, initialement dépourvue d'ICE. **B.** La cellule réceptrice (transconjuguant) ayant acquis l'ICE devient capable de le transférer à son tour.

2.3.4.3.2 Fonctions des gènes codés par les CDSs portés par l'ICE

Chez *M. agalactiae*, l'analyse de mutants déficients dans le transfert horizontal d'ICES a indiqué que ce processus nécessitait une lipoprotéine, CDS14, codée par ICEA et de fonction inconnue². Son inactivation peut être complétée par un vecteur contenant le gène sauvage qu'il soit chez la cellule donneuse ou receveuse. Son rôle supposé est d'établir un contact entre les cellules afin d'initier le processus de transfert. De plus, lorsque plusieurs copies d'ICE sont présentes, un phénomène de transcomplémentation entre les différentes copies d'ICE a lieu pour le CDS14¹⁹¹. La lipoprotéine CDS14 serait requise pour l'initiation de la première étape du transfert et serait impliquée dans le contact cellulaire de par sa localisation à la surface de la cellule¹⁹⁰. Sur la vingtaine de CDSs portés par ICEA de *M. agalactiae* et ICEF de *M. fermentans*, seulement trois gènes (CDS5, CDS12 et CDS17) ont été identifiés comme affichant des similarités significatives avec des produits de gènes ayant une fonction dans la mobilité de l'ADN¹⁹⁰. Ceux-ci correspondent respectivement à un homologue de TraG/VirD4 qui, chez les autres bactéries, couple le relaxosome au pore

de conjugaison, une protéine SSB de liaison à l'ADN simple brin qui le protège des nucléases et un homologue de TraE/VirB4 habituellement impliqué dans le transport de l'ADN. Par ailleurs, la formation de l'intermédiaire extrachromosomique circulaire et son intégration ultérieure implique le CDS22, qui code pour une recombinase DDE. Dans ICEA, les candidats pour la formation du pore de conjugaison incluent sept produits de gènes avec des domaines transmembranaires nommés : CDS5, 7, 13, 15, 16, 17 et 19 (Figure 15).

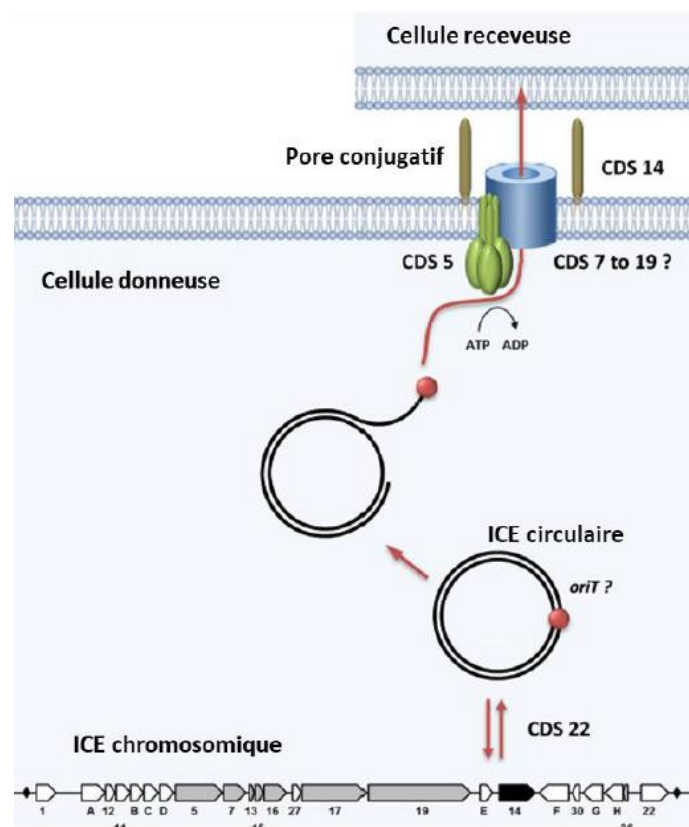


Figure 15 :Organisation schématique actuelle et fonctionnalité des CDSs des ICEs de la souche *M. agalactiae* 5632 (Baranowski *et al.* 2018¹⁹¹).

Des fonctions supplémentaires portées par les ICEs de mycoplasmes n'ont pas été identifiées pour le moment, à l'exception d'un transposon conjugal chez *M. hominis* associé à un gène de résistance aux antibiotiques. Ce dernier a été décrit homologue à un ICE de *S. agalactiae* et est différent de ceux retrouvés chez les autres mycoplasmes¹⁹². La particularité de ce transposon conjugal retrouvé chez la souche Sprott de *M. hominis* est de contenir un transposon Tn916 porteur du gène de résistance aux tétracyclines, *tet(M)* (Figure 16).

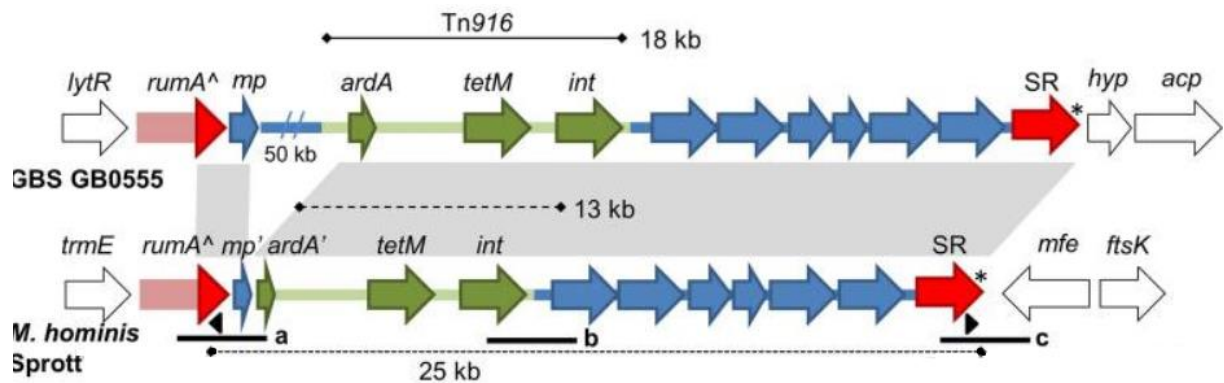


Figure 16: Transposon conjugatif comportant le gène *tet(M)* chez *M. hominis* et *S. agalactiae*. Les flèches vertes correspondent à la région du Tn916, les flèches bleues et rouges indiquent la région du transposon conjugatif (ou ICE) chez *M. hominis* Sprott et chez *S. agalactiae* GBS GB0555. Les portions grises montrent les régions homologues entre les deux souches (Calcutt et Foecking 2015¹⁹²).

Des expériences de génomique fonctionnelle combinées à des expériences de conjugaison ont été réalisées pour déterminer les fonctions des CDSs de ICEA chez *M. agalactiae*. Les résultats observés ont montré que le transfert de l'ICEA peut être aboli ou fortement affecté par dysfonction des gènes codants pour les CDS suivants: CDS1, CDSA, CDSC, CDS5, CDS7, CDS15, CDS16, CDS17, CDS19, CDS30, CDSG et CDS22¹⁹¹. Lorsque plusieurs copies d'ICEA étaient présentes, il a pu être observé un phénomène de trans-complémentation entre les différentes copies d'ICEA pour le CDS14. Ce phénomène n'a cependant pas pu être observé pour d'autres CDSs essentiels au transfert comme les CDS5 et CDS22.

2.3.4.3.3 Un squelette minimum commun chez les ICEs de mycoplasmes

Suite à la découverte d'ICEs chez *M. agalactiae* et *M. fermentans*, la présence d'ICEs a été rapportée chez plusieurs mycoplasmes de ruminants grâce au séquençage de génomes, notamment chez *M. bovis* et chez deux sous-espèces du cluster *M. mycoides* : *M. mycoides* subsp. *capri* et *M. capricolum* subsp. *capricolum*^{150,193,194} (**Figure 13**). Ces ICEs peuvent être présents en une ou plusieurs copies et sous des formes dégénérées vestigiales (vICE). Des formes vestigiales d'ICEs sont des ICEs de taille réduite englobant un grand nombre de pseudogènes et pour lesquelles il a été montré qu'elles étaient incapables de se transférer d'une cellule à l'autre².

D'une façon générale, les ICEs de mycoplasmes sont composés d'environ 20 gènes. Des analyses comparatives de génomes ont mis en évidence une organisation similaire des gènes des ICEs de mycoplasmes ainsi que l'existence d'un squelette minimum commun comprenant les CDS1, CDS5, CDS17 et CDS22⁵. Ces quatre CDSs couvrent l'ICE entier, CDS1 et CDS22 à chaque extrémité tandis que les CDS5 et CDS17 sont plus centraux. Même si le rôle de CDS1 n'est pas encore élucidé, ces quatre CDSs ont été utilisés pour déterminer une prévalence des ICEs chez les mycoplasmes de ruminants. Ainsi, sur un panel de 166 souches de quatre espèces (42 *M. bovis* ; 41 *M. agalactiae* ; 42 *M. capricolum* subsp. *capricolum* and 41 *M. mycoides* subsp. *capri*), le squelette minimal de l'ICE a été détecté dans 47% (78/166) des souches, 18% des souches ne portaient qu'un, deux ou trois des quatre CDSs tandis que 35% étaient dépourvues des quatre CDSs⁵. Aucune corrélation n'a pu être établie entre l'histoire des souches et la détection du squelette particulier de l'ICE. Le squelette minimum de l'ICE a été redéfini en 2018, avec 4 CDS présents chez tous les mycoplasmes, CDS5, CDS17, CDS19 et CDS22. D'autres CDSs sont également très conservés. Il s'agit des CDS1, CDS3, CDS14 et CDS16¹⁹⁰ (**Figure 13**).

2.3.4.3.4 Intégration et excision des ICEs du chromosome hôte

Chez *M. agalactiae*, des ICEs sous formes libre extrachromosomique ont été mis en évidence, rapprochant les CDS1 et CDS22 à la suite de l'excision et la circularisation de l'ICE intégré dans le chromosome⁵. Dans le but de détecter des ICEs sous forme circulaire, des produits de PCR, générés en utilisant des amorces tournées vers l'extérieur des CDS1 et CDS22 et couvrant les jonctions de l'ICE sous forme circulaire (cICE) ont été analysés par séquençage. Un amplicon ne devant être produit qu'en présence de cICE. Comme représenté sur la **Figure 17**, ces séquences englobaient, en aval de CDS22, de 5' à 3', (i) une région non codante (longueur de 123 à 404 nucléotides), (ii) des répétitions inversées imparfaites (IR) et une séquence de couplage de 6 pb résultant de la juxtaposition des répétitions directes (DR) qui encadraient initialement chaque extrémité de l'ICE sous forme chromosomique intégrée, et (iii) une région non codante (98 à 236 nt de long) situé en amont de CDS1. Cette région cICE a ensuite été désignée sous le nom de «cirbox». La comparaison des séquences des «cirbox» provenant de *M. agalactiae*, *M. bovis*, *M. capricolum* subsp. *capricolum* et *M. mycoides* subsp. *capri* a montré qu'elles étaient plus conservées entre les souches de *M. agalactiae* et de *M. bovis* (identité de 84% à 87%) par

rapport à ceux de *M. capricolum* subsp. *capricolum* et *M. mycoides* subsp. *capri* (identité de 52% à 55%).

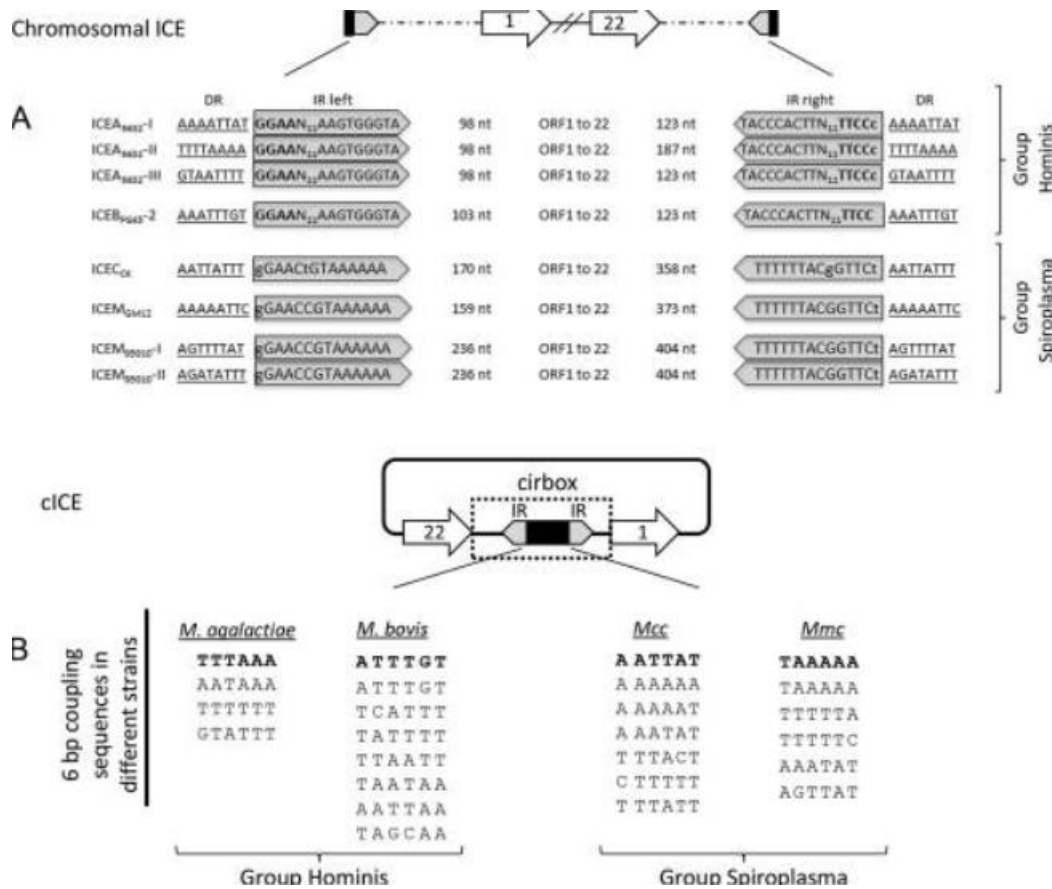


Figure 17: Formes intégrées et excisées des ICEs. (A) Représentations schématiques des locus chromosomiques contenant des ICE dans des souches séquencées de *M. agalactiae*, *M. bovis*, *M. capricolum* subsp. *capricolum* et *M. mycoides* subsp. *capri* et (B) des ICE circulaires extrachromosomiques avec les détails des séquences de couplage à 6 pb dans différentes souches. La région de couplage de 6 pb correspond à une juxtaposition des répétitions directes (DR) qui encadrent l'ICE. Elle est indiquée en gras pour la souche type de chaque espèce. ORF, cadre de lecture ouvert (extrait de F. Tardy *et al.* 2015⁵).

Les extrémités de l'ICE, telles que définies par les IR, apparaissent conservées dans les groupes phylogénétiques Hominis et Spiroplasma. Sur la base de leur contenu en gènes et de leurs séquences, les ICEs des mycoplasmes de ruminants ont été subdivisés en deux types, les types Hominis et le type Spiroplasma, avec les prototypes respectifs ICEA5632 de *M. agalactiae* 5632 et ICEMGM12 de *M. capricolum* subsp. *capri* GM12. Cette subdivision est particulièrement valable pour la transposase CDS22, différente entre les types Hominis et Spiroplasma mais hautement conservée au sein de chaque type. En conséquence, les IR ciblés par la transposase lors de l'excision ou de l'intégration sont identiques au sein d'un même groupe, mais différent entre les deux groupes, suggérant une

spécificité pour l'interaction CDS22 transposase-IR. On ignore cependant si le CDS22 du type Hominis serait capable d'agir sur l'ICE du type Spiroplasma et vice-versa⁵. Les DRs générées par l'insertion de l'ICE dans le chromosome diffèrent non seulement entre les espèces, mais également au sein d'une même espèce et entre des copies d'ICEs. Ceci suggère comme précédemment décrit que l'intégration de l'ICE dans le génome de l'hôte survient de manière aléatoire, plutôt que dans un site particulier.

2.3.4.3.5 Transfert chromosomique médié par les ICEs

A ce jour l'existence du transfert horizontal d'ICE, c'est-à-dire le passage de l'ICE avec les gènes qu'il contient d'une cellule donneuse à une cellule receveuse n'a été exploré qu'au sein de l'espèce *M. agalactiae*² (**Figure 18.A.**). En plus de ce transfert horizontal d'ICE, il a été mis en évidence l'existence de transferts chromosomiques de souches de *M. agalactiae* ICE négatives à ICE positives (**Figure 18. B.**). Ces transferts chromosomiques se produisent indépendamment du mouvement de l'ICE, tout en tirant partie du mécanisme de conjugaison de l'ICE¹⁹⁵. Ce phénomène est hautement dépendant de l'identité des séquences qui doit être suffisante entre les partenaires de conjugaison pour permettre le processus de recombinaison. Toutes les parties du génome se sont révélées transmissibles de cette façon¹⁹⁵. En effet, des expériences de conjugaison ont généré des descendance avec des génomes chimériques constitués du chromosome donneur *M. agalactiae* 5632 dans lequel des séquences du receveur *M. agalactiae* PG2^{E10} résistant à l'enrofloxacin ont été transférées et recombinées au niveau des locus homologues. Sous la pression sélective antimicrobienne, tous les transconjugants présentaient l'opéron parE-parC muté ou / et le gyrA muté du donneur, mais la résistance en tant que telle n'a été atteinte que lorsque les deux loci mutés ont été co-transférés.

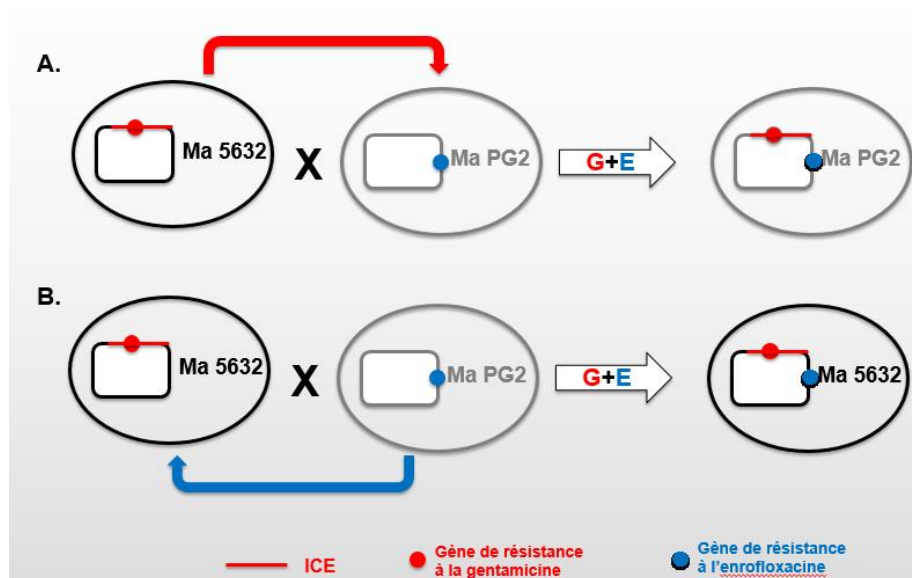


Figure 18 : Transfert horizontal de gène (HGT) médié par ICEA chez *M. agalactiae*. Illustration schématique des deux mécanismes d'échange de gènes survenant dans les expériences de conjugaison impliquant la souche 5632 comme donneuse d'ICE et la souche PG2 comme souche receveuse d'ICE. A. Transfert de l'ICE de la cellule donneuse 5632 vers la cellule receveuse PG2 B. La dissémination de ICEA est associée à un second mécanisme d'échange de gènes qui survient dans le sens inverse, du receveur vers le donneur, et qui implique des mouvements de grands fragments d'ADN chromosomiques (adapté de Dordet-frisoni *et al.* 2013.²)

Afin d'étudier les événements de recombinaison indépendamment des étapes de conjugaison et de transfert, des expériences de fusion membranaires à l'aide de polyéthylène glycol (PEG) ont été réalisées. L'ajout de PEG a permis de mettre en évidence la possibilité d'un transfert d'ADN entre deux souches de *M. agalactiae* qui ne portaient pas d'ICEs. Ceci remet en question le principe selon lequel des souches sans ICEs seraient incapables d'incorporer de l'ADN chromosomique. Le rôle des ICEs pourrait être seulement d'établir un contact cellulaire pour initier le transfert¹⁹⁵.

CHAPITRE 1

**CHAPITRE 1. RESISTANCE A LA TETRACYCLINE ET AUX
FLUOROQUINOLONES DANS DES ISOLATS CLINIQUES DE
UREAPLASMA SPP. ET *MYCOPLASMA HOMINIS* ISOLEES EN
FRANCE ENTRE 2010 ET 2015**

Tetracycline and fluoroquinolone resistance in clinical *Ureaplasma* spp. and *Mycoplasma hominis* isolates in France between 2010 and 2015.

Alexandra Meygret, Chloé Le Roy, Hélène Renaudin, Cécile Bébéar et Sabine Pereyre.

Article accepté en Octobre 2018 dans Journal of Antimicrobial Chemotherapy (Impact factor 2018 : 5,113).

Ces travaux ont fait l'objet d'un poster présenté à la journée annuelle de la Fédération de Recherche Transbiomed de l'Université de Bordeaux en 2017, d'une présentation orale en décembre 2017 à la 37^{ème} Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie anti-infectieuse (RICAI) à Paris et d'une communication orale au 22^{ème} congrès de l'International Organization for Mycoplasmaology (IOM) à Portsmouth, New Hampshire, USA en juillet 2018.

CONTEXTE

L'objectif principal de ma thèse est la caractérisation d'ICEs chez *M. hominis* ainsi que la détermination de la prévalence de ces éléments dans une collection de souches cliniques.

Dans ce premier chapitre, nous nous sommes concentrés sur l'établissement d'une collection de souches cliniques suffisamment importante et diversifiée pour établir une prévalence des ICEs chez *M. hominis* la plus représentative possible. La finalité de nos recherches étant de démontrer la fonctionnalité de ces ICEs, des expériences de conjugaison ont également été envisagées au sein de l'espèce *M. hominis*. Nous devons donc aussi détenir des souches cliniques bien caractérisées en terme de résistance aux antibiotiques. En effet, ces résistances serviront de marqueur pour identifier et récupérer les transconjuguants potentiels lors des expériences de conjugaison.

M. hominis est une bactérie opportuniste responsable d'infections génitales, néonatales et extra-génitales chez les patients immunodéprimés. Trois familles d'antibiotique, les tétracyclines, les fluoroquinolones et les macrolides et apparentés ont une activité potentielle contre ces bactéries. Néanmoins, des résistances acquises peuvent émerger. En particulier, un haut niveau de résistance à la tétracycline est lié à la protection du ribosome par acquisition du gène *tet(M)* et une résistance aux fluoroquinolones est associée à des mutations dans les hot spots (Quinolone-Resistance Determining Regions, QRDR) des gènes *gyrA* et *gyrB* codant pour l'ADN gyrase et des gènes *parC* et *parE* codant pour la topoisomérase IV.

Pour constituer notre collection et élargir les données de résistance qui étaient peu nombreuses en France au démarrage de ma thèse, nous avons mené une étude rétrospective sur 1014 souches cliniques de *M. hominis* et d' *Ureaplasma* spp. isolées entre 2010 et 2015 au laboratoire de Bactériologie du CHU de Bordeaux. La sensibilité des souches aux antibiotiques a été évaluée entre 2010 et 2012 en utilisant le kit SIR Mycoplasma (Bio-Rad) puis le kit MYCOFAST RévolutionN (ELITech group) entre 2012 et 2015. Les concentrations minimales inhibitrices de la tétracycline, lévofloxacine et moxifloxacine ont été déterminées par microdilution en milieu liquide pour tous les isolats trouvés résistants avec les kits. De plus, le gène *tet(M)* et les mutations associées aux résistances aux fluoroquinolones ont été recherchés par PCR et séquençage.

Un total de 183 souches de *M. hominis* et 831 souches *d'Ureaplasma* spp. ont été collectées. Parmi les 183 isolats de *M. hominis*, les taux de résistance observés étaient respectivement de 14,8%, 2,7% et 1,6% pour la tétracycline, la lévofloxacine et la moxifloxacine. Les 27 isolats présentant une résistance à la tétracycline portaient tous le gène *tet(M)*. Les cinq isolats résistants à la lévofloxacine présentaient des mutations dans les QRDR des gènes *parC* ou *parE*, et parmi eux, les trois isolats résistants à la moxifloxacine présentaient aussi une mutation dans le gène *gyrA*. Au sein des 831 isolats *d'Ureaplasma* spp. les taux de résistance à la tétracycline, à la lévofloxacine et à la moxifloxacine étaient respectivement de 7,5%, 1,2% et 0,1%.

Dans cette étude, nous avons montré que la résistance aux tétracyclines et aux fluoroquinolones de *M. hominis* et *Ureaplasma* spp. est relativement limitée et s'est montrée stable en France entre 2010 et 2015. Cependant, en comparaison à une précédente étude menée entre 1999 et 2002, une augmentation significative de la résistance aux tétracyclines des *Ureaplasma* spp. a été observée. Une surveillance de la sensibilité aux antibiotiques de ces mycoplasmes urogénitaux semble donc nécessaire.

Tetracycline and fluoroquinolone resistance in clinical *Ureaplasma* spp. and *Mycoplasma hominis* isolates in France between 2010 and 2015

A. Meygret^{1–3}, C. Le Roy^{1,2}, H. Renaudin³, C. Bébéar^{1–3} and S. Pereyre ^{1–3*}

¹Univ. Bordeaux, USC-EA 3671 Mycoplasmal and Chlamydial Infections in Humans, Bordeaux, France; ²INRA, USC-EA 3671 Mycoplasmal and Chlamydial Infections in Humans, Bordeaux, France; ³CHU Bordeaux, Bacteriology Department, French National Reference Centre for Bacterial STI, Bordeaux, France

*Corresponding author. USC EA 3671 Mycoplasmal and Chlamydial Infections in Humans, Univ. Bordeaux, Campus Bordeaux Carrière, 146 rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux Cedex, France. Tel: +33 5 57 57 16 25; Fax: +33 5 56 93 29 40; E-mail: sabine.pereyre@u-bordeaux.fr
 orcid.org/0000-0003-1757-4206

Received 5 January 2018; returned 3 March 2018; revised 7 May 2018; accepted 25 May 2018

Objectives: As information on *Ureaplasma* spp. and *Mycoplasma hominis* resistance is currently limited, the aim of this study was to investigate the susceptibility of *Ureaplasma* spp. and *M. hominis* to tetracyclines and fluoroquinolones in France.

Methods: The susceptibility of 1014 clinical isolates obtained in Bordeaux University Hospital (Bordeaux, France) between 2010 and 2015 was evaluated using two commercial kits, S.I.R. Mycoplasma (Bio-Rad) from 1 January 2010 to 5 October 2012 and MYCOFAST Revolution kit (ELITech Group) from 6 October 2012 to 31 December 2015. The MICs of isolates designated as resistant were determined using the broth microdilution assay. Additionally, the *tet(M)* gene and fluoroquinolone resistance-associated mutations were identified.

Results: Among 831 *Ureaplasma* spp. isolates, the tetracycline, levofloxacin and moxifloxacin resistance rates were 7.5%, 1.2% and 0.1%, respectively. Among 183 *M. hominis* isolates, the resistance rates were 14.8%, 2.7% and 1.6% for tetracycline, levofloxacin and moxifloxacin, respectively. Over the 6 year period, no significant change in resistance to tetracycline or fluoroquinolones was observed. The *tet(M)* gene was found in all tetracycline-resistant isolates. All levofloxacin-resistant isolates harboured a mutation in the *parC* or *parE* genes. Isolates that were also resistant to moxifloxacin harboured an additional mutation in the *gyrA* gene. The MYCOFAST Revolution kit significantly overestimated levofloxacin and moxifloxacin resistance in *Ureaplasma* spp. isolates.

Conclusions: Resistance to tetracycline and fluoroquinolones is limited in France in mycoplasmas but compared with a previous report in 1999–2002, a significant increase in tetracycline resistance among *Ureaplasma* spp. was observed. Ongoing monitoring of the antibiotic susceptibility of these urogenital mycoplasmas remains necessary.

Introduction

Ureaplasma urealyticum, *Ureaplasma parvum* and *Mycoplasma hominis* are microorganisms that reside, as commensals, in the lower urogenital tract but can be responsible for urogenital infections. Three antibiotic families, tetracyclines, fluoroquinolones, and macrolides and related antibiotics, have potent activity against these bacteria but acquired high-level resistance to tetracyclines is associated with the presence of the *tet(M)* gene, whereas acquired resistance to fluoroquinolones is associated with mutations in the QRDR of the *gyrA*, *gyrB*, *parC* and *parE* genes.¹

An increasing prevalence of tetracycline and fluoroquinolone resistance has recently been suggested in *Ureaplasma* spp. in Europe² whereas the prevalence of resistance in *M. hominis* has

sparsely been reported worldwide. In France, information on resistance rates is limited. In a previous study, we reported that the percentage of tetracycline-resistant *M. hominis* isolates increased significantly from 2.8% in 1992 to 18.75% between 1999 and 2002.³ In contrast, there was no increase in the tetracycline resistance rate of *Ureaplasma* spp., with a stable rate of 2%–3% between 1992 and 2002.³ The prevalence of fluoroquinolone resistance has not been studied in *M. hominis* in France, and only one study reported a prevalence of 0.9% for ofloxacin-resistant *Ureaplasma* spp. strains between 1989 and 1999.⁴

To fill this gap, the aim of this study was to assess the susceptibility of *Ureaplasma* spp. and *M. hominis* to tetracyclines and fluoroquinolones in France using commercial kits and the broth

microdilution assay. The mechanisms of resistance of resistant isolates were also investigated.

Materials and methods

Clinical samples

Between 1 January 2010 and 31 December 2015, all patient specimens received at the Bordeaux University Hospital (Bordeaux, France) for *Ureaplasma* spp. or *M. hominis* detection were cultured at 37°C in Shepard broth medium and Hayflick broth medium supplemented with arginine, respectively.⁵ A total of 1014 clinical isolates (831 *Ureaplasma* spp. and 183 *M. hominis*) were recovered and stored at -80°C. The source of the samples was diverse and included 776 (76.5%) urogenital, 155 (15.3%) placental, 26 (2.6%) lower respiratory, 21 (2.1%) upper respiratory, 8 (0.8%) diverse fluid and 28 (2.8%) samples of unknown origin.

Antibiotic susceptibility testing

Susceptibility to antibiotics of *Ureaplasma* spp. and *M. hominis* isolates was initially evaluated using a calibrated 10⁴–10⁵ colour changing units/mL inoculum of each clinical isolate and commercial kits, the S.I.R. Mycoplasma (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) from 1 January 2010 to 5 October 2012 and the MYCOFAST Revolution kit (ELITechGroup, Puteaux, France), which includes the CLSI breakpoints defined for mycoplasmas,⁵ from 6 October 2012 to 31 December 2015. Antibiotic susceptibility testing results were interpreted according to the manufacturer's instructions. For the S.I.R. Mycoplasma kit, which does not include the CLSI breakpoints, resistance was determined by growth in the well containing the highest concentration of antibiotic, i.e. 8 mg/L for tetracycline and 4 mg/L for ofloxacin. When resistance to fluoroquinolones and/or tetracyclines was detected, MICs were systematically determined for tetracycline, ofloxacin, levofloxacin and moxifloxacin by broth microdilution performed in 96-well microtitre plates according to the CLSI guidelines.⁵ Accordingly, a total of 157 isolates (141 *Ureaplasma* spp. and 16 *M. hominis*) with tetracycline-susceptible results using commercial kits and 50 isolates (41 *Ureaplasma* spp. and 9 *M. hominis*) with fluoroquinolone-susceptible results were also evaluated by MIC determination. A range of antimicrobial concentrations from 0.015 to 32 mg/L was used. Antibiotics were purchased from Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA).

Identification of *U. parvum* and *U. urealyticum*

Identification of *U. parvum* and *U. urealyticum* species was performed by real-time PCR, as previously described, using primers UU-1623F and UU-1524R and two species-specific TaqMan probes, UU-parvo and UU-T960.⁶

Characterization of tetracycline- and fluoroquinolone-resistant isolates

Bacterial DNA extraction from broth culture of resistant isolates was performed using the NucleoSpin® Tissue kit (Macherey-Nagel, Hoerd, France). Amplification and sequencing of the QRDR of *gyrA*, *gyrB*, *parC* and *parE* genes were performed as previously described^{7–9} using primers MHA1, MH4, MH6, MH7, MHC1, MHC2, MH27, MH28, MHE1 and MHE2, respectively, for *M. hominis*, and primers *gyrA*-1, *gyrA*-2, *gyrB*-3, *gyrB*-4, *parC*-5, *parC*-6, *parE*-7 and *parE*-8 for *U. parvum*. Regarding *U. urealyticum*, primers *gyrA*-1, *gyrA*-2, *parC*-5, *parC*-6, *parE*-7 and *parE*-8 were also used to amplify *gyrA*, *parC* and *parE* QRDR, but a 52°C hybridization step was used for the amplification of *parC* and *parE* QRDR. Primers *gyrB*-F-UuUp (5'-TAGTGAAG TTCGCTCTATG-3') and *gyrB*-R-UuUp (5'-GGATCCATTGTTGTTCTCA-3') were designed to amplify *U. urealyticum gyrB* QRDR using a 52°C hybridization step. QRDR amplicons were sent to Eurofins genomics® for DNA sequencing using the same primers. The sequences were analysed using the BioEdit, 7.2.5 software, Clustal Omega ([http://www.ebi.ac.uk/Tools/](http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/)

[msa/clustalo/](http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/)) and bioinformatics.org (<http://www.bioinformatics.org/sms/index.html>) web sites. Nucleotide sequences were compared with those of the reference strains *M. hominis* PG21 (ATCC 23114),¹⁰ *U. parvum* serotype 3 (ATCC 27815) and *U. urealyticum* serotype 8 (ATCC 27618) (GenBank accession numbers FP236530, AF085730 and AF085724, respectively).

The presence of the *tet(M)* gene was determined by PCR using primers *tet1* and *tet2*, as previously described.¹¹

Statistical analysis

The χ^2 test and Fisher's exact test were used to compare the occurrence of resistant isolates that were identified using commercial kits with the occurrence of resistant isolates identified using MICs and to compare the prevalence of resistance over time. $P < 0.05$ was considered significant.

Results

Evaluation of resistance in *Ureaplasma* spp. and *M. hominis* using commercial kits

Of the 831 *Ureaplasma* spp. isolates tested, 6.3% tetracycline-resistant and 4.2% ofloxacin-resistant isolates were found among the 287 isolates tested by the S.I.R. Mycoplasma kit, and 10.8% tetracycline-resistant, 9.9% levofloxacin-resistant and 3.3% moxifloxacin-resistant isolates were found among the 544 isolates tested by the MYCOFAST Revolution kit (Figure 1a). Of the 183 *M. hominis* isolates tested, 20.7% tetracycline-resistant and 2.2% ofloxacin-resistant isolates were found among the 92 isolates tested by the S.I.R. Mycoplasma kit, and 9.9% tetracycline-resistant, 3.3% levofloxacin-resistant and 2.2% moxifloxacin-resistant isolates were found among the 91 isolates tested by the MYCOFAST Revolution kit (Figure 1b).

MIC determinations

MICs were determined by broth microdilution for all isolates that were found to be resistant to tetracycline and/or fluoroquinolones using commercial kits. For isolates initially found to be resistant using the S.I.R. Mycoplasma kit between 1 January 2010 and 5 October 2012, 5.9% *Ureaplasma* spp. and 20.7% *M. hominis* isolates were resistant to tetracycline and 1.4% *Ureaplasma* spp. and 2.2% *M. hominis* isolates were resistant to levofloxacin (Table 1). For isolates initially found to be resistant using the MYCOFAST Revolution kit between 6 October 2012 and 31 December 2015, tetracycline resistance was found in 8.3% of *Ureaplasma* spp. and in 8.8% of *M. hominis* isolates and levofloxacin resistance in 1.1% *Ureaplasma* spp. and 3.3% *M. hominis* isolates (Table 2). Additionally, the 207 tetracycline- and/or fluoroquinolone-susceptible results from the commercial kits that were checked by MIC determination were all confirmed to be susceptible, except one *U. urealyticum* isolate for which the tetracycline MIC was 2 mg/L, i.e. only one dilution above the CLSI breakpoint.

Inconsistent results were recorded between the broth microdilution assay used as reference and the MYCOFAST Revolution kit for levofloxacin and moxifloxacin resistance detection in *Ureaplasma* spp. ($P < 0.01$) (Figure 1). The MYCOFAST Revolution kit overestimated fluoroquinolone resistance in *Ureaplasma* spp., as 8.8% (48 of 544) and 3.1% (17 of 544) false cases of levofloxacin and moxifloxacin resistance were identified, respectively. Tetracycline resistance also seemed overestimated in *Ureaplasma* spp. as 14 (2.6%) false cases of resistance were obtained but the

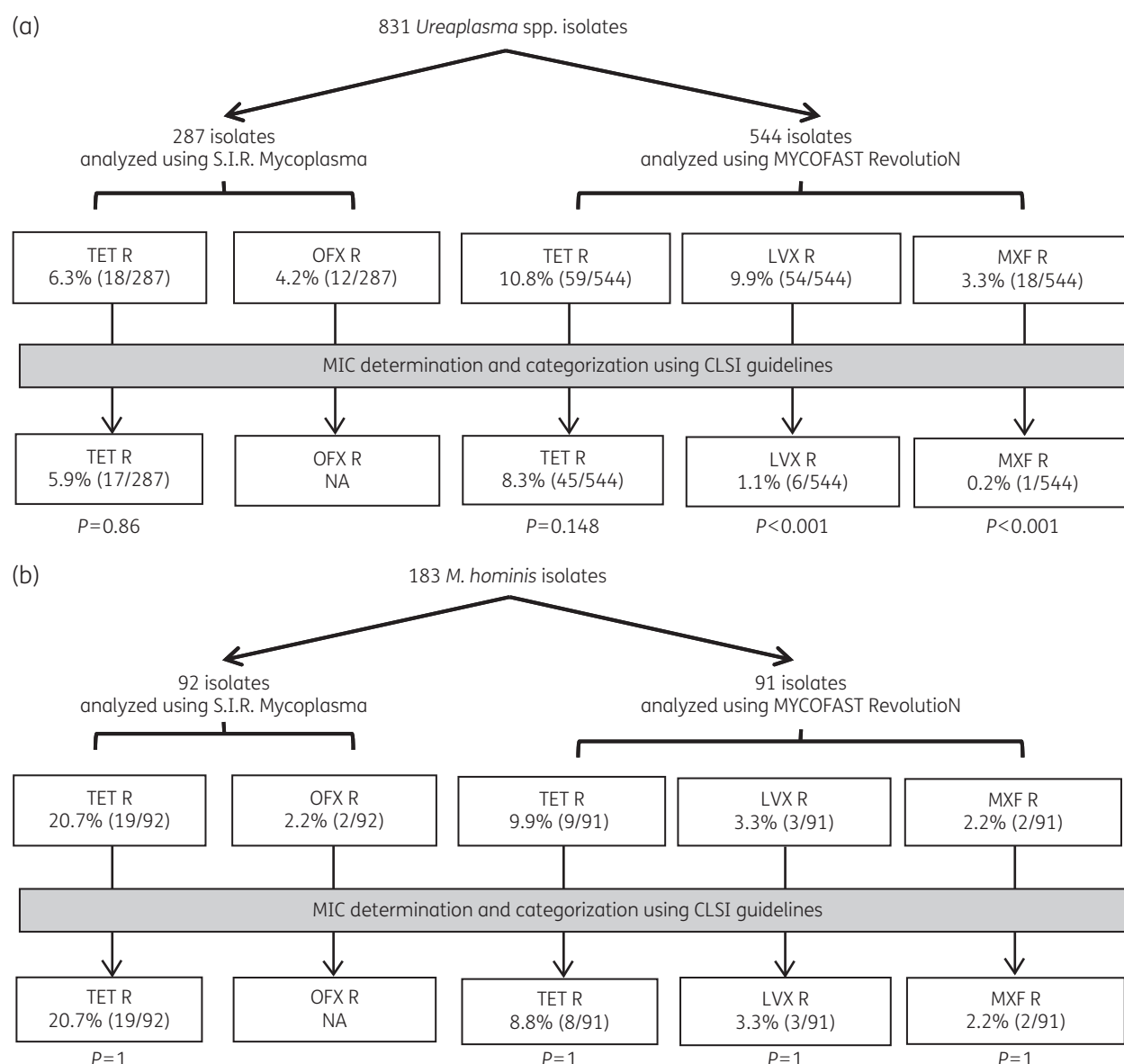


Figure 1. Susceptibility distribution of 831 *Ureaplasma* spp. (a) and 183 *M. hominis* (b) isolates analysed using S.I.R. Mycoplasma and MYCOFAST RevolutionN kits and using liquid broth MIC determination and CLSI breakpoints. When available, the P value of the comparison between the resistance rate obtained using commercial kits and the resistance rate obtained using MIC determination is shown. TET, tetracycline; R, resistance; OFX, ofloxacin; LVX, levofloxacin; MXF, moxifloxacin; NA, not applicable (no CLSI breakpoints).

difference was not statistically significant. No significant difference was found for tetracycline- and fluoroquinolone-resistance detection in *M. hominis* (Figure 1).

Molecular characterization of resistant isolates

The 105 isolates (77 *Ureaplasma* spp. and 28 *M. hominis*) detected as tetracycline resistant using commercial kits were screened by PCR for the presence of the *tet(M)* gene. The *tet(M)* gene was detected in the 62 *Ureaplasma* spp. and the 27 *M. hominis* isolates that were categorized as resistant to tetracycline using MIC

determination. The *tet(M)* gene was not detected in isolates categorized as tetracycline susceptible using MIC determination.

Using MIC determination, a total of nine *U. parvum*, one *U. urealyticum* and five *M. hominis* isolates were categorized as resistant to fluoroquinolones (Table 3). Sequence comparison between the QRDR sequences of levofloxacin-resistant isolates and the QRDR sequences of reference strains revealed the presence of the same mutation, Ser83(80)Leu (*Ureaplasma* spp. numbering with *Escherichia coli* numbering in parentheses), in ParC in all the *Ureaplasma* spp. isolates except one. The Val417(410)Thr mutation in ParE was also found in four *U. parvum* isolates. The only moxifloxacin-resistant *U. parvum* isolate harboured an additional

Table 1. MIC distribution of *Ureaplasma* spp. and *M. hominis* isolates categorized as resistant using the S.I.R. Mycoplasma kit between 1 January 2010 and 5 October 2012

Species and antimicrobial agent	Isolates categorized as resistant, n/N (%)	Isolates with the indicated MIC (mg/L), n/N (%)									Resistant isolates according to MIC, n/N (%)
		<0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	>16	
<i>Ureaplasma</i> spp. (N = 287)											
TET	18/287 (6.3)	–			1/18 (5.5)	3/18 (16.7)	3/18 (16.7)	2/18 (11.1)	3/18 (16.7)	6/18 (33.3)	17/287 (5.9)
OFX	12/287 (4.2)			3/12 (25)	3/12 (25)	2/12 (16.7)	1/12 (8.3)	2/12 (16.7)	1/12 (8.3)		NA
LVX ^a			3/12 (25)	2/12 (16.7)	3/12 (25)		3/12 (25)	1/12 (8.3)			4/287 (1.4)
MXF ^a		4/12 (33.3)	4/12 (33.3)		4/12 (33.3)						0/287 (0)
<i>M. hominis</i> (N = 92)											
TET	19/92 (20.7)	–	–	–						19/19 (100)	19/92 (20.7)
OFX	2/92 (2.2)							1/2 (50)		1/2 (50)	NA
LVX ^a		–	–	–			1/2 (50)			1/2 (50)	2/92 (2.2)
MXF ^a		1/2 (50)	–	–				1/2 (50)			1/92 (1.1)

TET, tetracycline; LVX, levofloxacin; MXF, moxifloxacin; OFX, ofloxacin; NA, not applicable (no CLSI breakpoints).

^aBecause no CLSI breakpoints were defined for ofloxacin, MICs of levofloxacin and moxifloxacin were determined for the 12 *Ureaplasma* spp. and the 2 *M. hominis* isolates that were categorized as resistant to ofloxacin using the commercial kit.**Table 2.** MIC distribution of *Ureaplasma* spp. and *M. hominis* isolates categorized as resistant using the MYCOFAST Revolution kit between 6 October 2012 and 31 December 2015

Species and antimicrobial agent	Isolates categorized as resistant, n/N (%)	Isolates with the indicated MIC (mg/L), n/N (%)									Resistant isolates according to MIC, n/N (%)
		<0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	>16	
<i>Ureaplasma</i> spp. (N = 544)											
TET	59/544 (10.8)	-	-	5/59 (8.5)	9/59 (15.2)	19/59 (32.2)	7/59 (11.9)	3/59 (5.1)	4/59 (6.8)	12/59 (20.3)	45/544 (8.3)
LVX	54/544 (9.9)	1/54 (1.9)	11/54 (20.4)	11/54 (20.4)	14/54 (26.0)	11/54 (20.4)	4/54 (7.4)	1/54 (1.8)	1/54 (1.8)	-	6/544 (1.1)
MXF	18/544 (3.3)	9/18 (50)	2/18 (11.1)	5/18 (27.8)	1/18 (5.5)	-	1/18 (5.5)	-	-	-	1/544 (0.2)
<i>M. hominis</i> (N = 91)											
TET	9/91 (9.9)	-	-	-	1/9 (11.1)	-	-	-	-	8/9 (88.9)	8/91 (8.8)
LVX	3/91 (3.3)	-	-	-	-	1/3 (33.3)	-	-	2/3 (66.7)	-	3/91 (3.3)
MXF	2/91 (2.2)	-	-	-	-	2/2 (100)	-	-	-	-	2/91 (2.2)

TET, tetracycline; LVX, levofloxacin; MXF, moxifloxacin.

Table 3. Antibiotic phenotype and molecular characterization of fluoroquinolone-resistant *Ureaplasma* spp. and *M. hominis* isolates collected between 2010 and 2015

Species and isolate no.	Year of collection	Specimen source	Sex/age	MIC (mg/L)				QRDR ^a			
				TET	OFX	L VX	MXF	gyrA	gyrB	parC	parE
<i>U. parvum</i>											
5696	2010	sperm	M/35 years	0.25	4	4	1	WT	Glu502(487)→Gln	WT	Val417(410)→Thr Asp427(420)→Asn
6194	2012	sperm	M/29 years	0.5	8	4	1	WT	WT	Ser83(80)→Leu	WT
6240	2012	sperm	M/22 years	0.12	16	8	1	WT	WT	Ser83(80)→Leu	WT
6271	2012	urine	F/69 years	0.25	32	16	4	Gln104(87)→Lys	WT	Ser83(80)→Leu	Val417(410)→Thr
6540	2013	sperm	M/33 years	0.5	4	4	1	WT	WT	Ser83(80)→Leu	WT
6564	2013	sperm	M/37 years	1	8	8	1	WT	WT	Ser83(80)→Leu	WT
6673	2014	sperm	M/28 years	0.5	8	4	1	WT	WT	Ser83(80)→Leu	WT
6793	2014	endotracheal secretions	F/1 month	0.5	8	4	1	WT	WT	Ser83(80)→Leu	Val417(410)→Thr
7053	2015	pharynx	M/6 days	0.25	16	4	1	WT	WT	Ser83(80)→Leu	Val417(410)→Thr
<i>U. urealyticum</i>											
6175	2012	sperm	M/51 years	2	8	4	1	WT	WT	Ser83(80)→Leu	WT
<i>M. hominis</i>											
5700	2010	vaginal secretions	F/24 years	0.25	>32	32	8	Ser153(83)→Leu	WT	Ser91(80)→Ile Lys144(134)→Arg	WT
5778	2011	bronchial aspirate	F/17 years	0.25	8	4	0.06	WT	WT	WT	Arg23(22)→Ser
6390	2013	vaginal secretions	F/23 years	0.25	>32	16	4	Ser153(83)→Leu	WT	Ser91(80)→Ile Lys144(134)→Arg	Asp426(420)→Asn
6558	2013	vaginal secretions	F/32 years	0.25	4	2	0.03	WT	WT	Glu95(84)→Gly	WT
6774	2014	placenta	F/27 years	0.25	>32	16	4	Ser153(83)→Leu	WT	Ser91(80)→Ile	WT

TET, tetracycline; LVX, levofloxacin; MXF, moxifloxacin; OFX, ofloxacin.
^aGyrA, GyrB, ParC and ParE residues are numbered according to *M. hominis* or *Ureaplasma* spp. numbering with *Escherichia coli* numbering in parentheses. Mutations previously associated with fluoroquinolone resistance in the literature are indicated in bold.

Table 4. Prevalence of tetracycline and fluoroquinolone resistance among 1014 *Ureaplasma* spp. and *M. hominis* isolates collected between 1 January 2010 and 31 December 2015, according to CLSI breakpoints

Year ^b	Tetracycline ^a		Levofloxacin ^a		Moxifloxacin ^a	
	<i>Ureaplasma</i> spp.	<i>M. hominis</i>	<i>Ureaplasma</i> spp.	<i>M. hominis</i>	<i>Ureaplasma</i> spp.	<i>M. hominis</i>
2010	5.5% (7/127)	22.9% (11/48)	0.8% (1/127)	2.1% (1/48)	0% (0/127)	2.1% (1/48)
2011	4.4% (4/91)	16.7% (5/30)	0% (0/91)	3.3% (1/30)	0% (0/91)	0% (0/30)
2012	10.2% (11/108)	15.8% (3/19)	3.7% (4/108)	0% (0/19)	0.9% (1/108)	0% (0/19)
2013	10.6% (17/161)	12.1% (4/33)	1.2% (2/161)	6.1% (2/33)	0% (0/161)	3.0% (1/33)
2014	5.6% (12/215)	5.1% (2/39)	0.9% (2/215)	2.6% (1/39)	0% (0/215)	2.6% (1/39)
2015	8.5% (11/129)	14.3% (2/14)	0.8% (1/129)	0% (0/14)	0% (0/129)	0% (0/14)
Total ^b	7.5% (62/831)	14.8% (27/183)	1.2% (10/831)	2.7% (5/183)	0.1% (1/831)	1.6% (3/183)
95% CI	5.9%–9.5%	10.3%–20.6%	0.7%–2.2%	1.2%–6.2%	0.0%–0.7%	0.6%–4.7%

^aPercentage of resistance (number of resistant isolates/number of tested isolates).

^bResistant isolates were initially selected using the S.I.R. Mycoplasma kit from 1 January 2010 to 5 October 2012 and the MYCOFAST Revoltion kit from 6 October 2012 to 31 December 2015 before MIC determination according to CLSI guidelines.

Gln104(87)Lys mutation in the *gyrA* gene. In all of the five levofloxacin-resistant *M. hominis* isolates, ParC and/or ParE mutations were found, the most frequent being Ser91(80)Ile (*M. hominis* numbering with *E. coli* numbering in parenthesis) (Table 3). The three *M. hominis* isolates that were also resistant to moxifloxacin harboured the same additional Ser153(83)Leu mutation in *GyrA*. No mutation was detected in the *gyrB* gene for any *M. hominis* isolates.

Changes in resistance prevalence over 6 years

Between 2010 and 2015, no statistically significant changes were found in the prevalence of tetracycline and fluoroquinolone resistance in *Ureaplasma* spp. and *M. hominis* (Table 4). The overall tetracycline resistance prevalence of 7.5%–14.8% according to the species was higher than the fluoroquinolone resistance prevalence, which remained <1.2% for *Ureaplasma* spp. and <2.7% for *M. hominis*.

Discussion

Susceptibility testing methodology

The limited therapeutic options available to combat infections caused by urogenital mycoplasmas justify the importance of studying the prevalence and mechanisms of resistance. However, according to the methodology of detection, resistance data may not be comparable.² In the present study, as recommended in the recent literature,² antimicrobial susceptibility testing using commercial kits was performed using purified cultures of *Ureaplasma* spp. and *M. hominis* isolates. In addition, dilutions were previously performed to calibrate accurately the inoculum that was added to the test panel. In this study, we demonstrated that the MYCOFAST Revoltion kit overestimated fluoroquinolone resistance in *Ureaplasma* spp. isolates, suggesting that, when this kit is used in routine diagnosis, fluoroquinolone resistance should be confirmed in *Ureaplasma* spp. with broth microdilution assay according to CLSI guidelines.

A limitation of this study is that two different commercial kits were used to detect resistant isolates and that their performance may be different. Notably, the S.I.R. Mycoplasma kit does not include the CLSI breakpoints defined for tetracycline against mycoplasmas and includes ofloxacin as the only fluoroquinolone, for which no specific breakpoints were defined for mycoplasmas. Criteria for the definition of resistance in the S.I.R. Mycoplasma kit were chosen by the manufacturer by using the breakpoints defined by the French Society for Microbiology for classic bacteria at the time the kit was developed. In the present study, tetracycline, levofloxacin and moxifloxacin MICs for all isolates detected as resistant using both commercial kits were subsequently determined and interpreted according to the CLSI guidelines and breakpoints specifically defined for mycoplasmas,⁵ which ensure data homogeneity. Moreover, because ofloxacin is less potent than levofloxacin and moxifloxacin against *Ureaplasma* spp. and *M. hominis*,^{12,13} we believe that no levofloxacin or moxifloxacin-resistant isolates could have been missed using the S.I.R. Mycoplasma kit between 2010 and 2012. Additionally, >200 tetracycline- or fluoroquinolone-susceptible results obtained with both commercial kits were confirmed to be susceptible by MIC determination, suggesting that resistance was not under-reported in this study.

Resistance prevalence comparison

In *Ureaplasma* spp., we previously reported a rate of tetracycline resistance in France of 2.2% (6 of 276) between 1999 and 2002.³ This rate significantly increased in 2010–15 in France, with an overall resistance rate of 7.5% (62 of 831) ($P < 0.01$). The increase in *Ureaplasma* spp. tetracycline resistance in a decade is of concern because tetracycline is the first-line treatment for adult urogenital infections. Resistance rates were recently determined for *Ureaplasma* spp. in other countries using the MYCOFAST Revoltion or microdilution assay. Indeed, the 7.5% French rate was higher than in Switzerland in 2014 (0% of 103 isolates),¹⁴ in the USA in 2015–16 (0.4% of 250 isolates)¹⁵ and in England between 2007 and 2013 (2.3% of 130 isolates).¹⁶ Surprisingly, a

much higher rate of resistance of 73% (32 of 44) was reported in South Africa.¹⁷

In the present study, levels of levofloxacin and moxifloxacin resistance in *Ureaplasma* spp. were low at 1.2% and 0.1%, respectively. This rate is similar to that described for ofloxacin in France in the 1990s (0.9%).⁴ Considering only recent studies, which used the microdilution broth assay, this low rate of resistance is in accordance with the 6% (15 of 250) of levofloxacin-resistant *Ureaplasma* spp. isolates reported between 2015 and 2016 in the USA¹⁵ and the absence of levofloxacin-resistant isolates reported between 2007 and 2013 in England.¹⁶ In contrast, 57% (16 of 28) of levofloxacin-resistant *Ureaplasma* spp. isolates were reported in Japan.¹⁸

Regarding *M. hominis*, our study did not show any significant change in the tetracycline resistance rate, which was 18.75% (24 of 128) during 1999–2002³ and 14.8% (27 of 183) during 2010–15 ($P > 0.05$).

Molecular characterization of fluoroquinolone-resistant isolates

All levofloxacin-resistant *Ureaplasma* spp. isolates except one harboured the Ser83(80)Leu substitution in the *parC* gene, which was alone responsible for resistance in 60% of cases. This mutation has previously been reported as being the most frequent mutation responsible for fluoroquinolone resistance in *Ureaplasma* spp. worldwide.^{4,15,18–20} The previously reported Val417(410)Thr substitution in *ParE*^{19–21} was the second most frequent mutation. Resistance to moxifloxacin was associated with the additional Gln104(87)Lys mutation in the *gyrA* gene. This mutation was previously associated with an increased fluoroquinolone resistance level and is located within one of the GyrA hot spots for fluoroquinolone resistance.^{19,20,22}

In *M. hominis*, all levofloxacin-resistant isolates harboured a substitution previously associated with fluoroquinolone resistance in *ParC* or *ParE*.^{4,9,23,24} Resistance to moxifloxacin was associated with the additional Ser153(83)Leu mutation in *GyrA*; this mutation was previously associated with a high level of resistance to fluoroquinolones.⁷

Overall, all levofloxacin-resistant isolates characterized in this study harboured a previously reported mutation in the *parC* and *parE* genes, and in the *gyrA* gene in the case of moxifloxacin resistance.

In conclusion, this work extends previous knowledge regarding susceptibility to antimicrobial agents and resistance mechanisms in *Ureaplasma* spp. and *M. hominis* in France. Notably, compared with the previous report in 1999–2002 in France, a significant increase in tetracycline resistance up to 7.5% was observed in *Ureaplasma* spp. and a 14.8% tetracycline resistance rate was described in *M. hominis*. These findings confirm the necessity to monitor the antibiotic susceptibility of human urogenital mycoplasmas.

Acknowledgements

We thank Sophie Beucher for technical assistance.

Funding

This work was supported by internal funding.

Transparency declarations

None to declare.

References

- 1 Waites KB, Bébér CM. Chemotherapy of *Mycoplasma* and *Ureaplasma* infections. In: C Gahan, CH Nightingale, H Charles, eds. *Encyclopedia of Pharmaceutical Microbiology*. New York: Springer, 2013.
- 2 Beeton ML, Spiller OB. Antibiotic resistance among *Ureaplasma* spp. isolates: cause for concern? *J Antimicrob Chemother* 2017; **72**: 330–7.
- 3 Dégrange S, Renaudin H, Charron A et al. Tetracycline resistance in *Ureaplasma* spp. and *Mycoplasma hominis*: prevalence in Bordeaux, France, from 1999 to 2002 and description of two tet(M)-positive isolates of *M. hominis* susceptible to tetracyclines. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; **52**: 742–4.
- 4 Bébér CM, Renaudin H, Charron A et al. DNA gyrase and topoisomerase IV mutations in clinical isolates of *Ureaplasma* spp. and *Mycoplasma hominis* resistant to fluoroquinolones. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; **47**: 3323–5.
- 5 Clinical and Laboratory Standards Institute. *Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing for Human Mycoplasmas: Approved Guideline M43A*. CLSI, Wayne, PA, USA, 2011.
- 6 Yi J, Yoon BH, Kim EC. Detection and biovar discrimination of *Ureaplasma urealyticum* by real-time PCR. *Mol Cell Probes* 2005; **19**: 255–60.
- 7 Bébér CM, Bové JM, Bébér C et al. Characterization of *Mycoplasma hominis* mutations involved in resistance to fluoroquinolones. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; **41**: 269–73.
- 8 Gruson D, Pereyre S, Renaudin H et al. In vitro development of resistance to six and four fluoroquinolones in *Mycoplasma pneumoniae* and *Mycoplasma hominis*, respectively. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; **49**: 1190–3.
- 9 Bébér CM, Renaudin H, Charron A et al. In vitro activity of trovafloxacin compared to those of five antimicrobials against *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* fluoroquinolone-resistant isolates that have been genetically characterized. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; **44**: 2557–60.
- 10 Pereyre S, Sirand-Pugnet P, Beven L et al. Life on arginine for *Mycoplasma hominis*: clues from its minimal genome and comparison with other human urogenital mycoplasmas. *PLoS Genet* 2009; **5**: e1000677.
- 11 De Barbeyrac B, Dupon M, Rodriguez P et al. A Tn1545-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* 1996; **37**: 223–32.
- 12 Bébér CM, de Barbeyrac B, Pereyre S et al. Activity of moxifloxacin against the urogenital mycoplasmas *Ureaplasma* spp., *Mycoplasma hominis* and *Mycoplasma genitalium* and *Chlamydia trachomatis*. *Clin Microbiol Infect* 2008; **14**: 801–5.
- 13 Pereyre S, Renaudin H, Bébér C et al. In vitro activities of the newer quinolones garenoxacin, gatifloxacin, and gemifloxacin against human mycoplasmas. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; **48**: 3165–8.
- 14 Schneider SC, Tinguely R, Droz S et al. Antibiotic susceptibility and sequence type distribution of *Ureaplasma* species isolated from genital samples in Switzerland. *Antimicrob Agents Chemother* 2015; **59**: 6026–31.
- 15 Fernández J, Karau MJ, Cunningham SA et al. Antimicrobial susceptibility and clonality of clinical *Ureaplasma* isolates in the United States. *Antimicrob Agents Chemother* 2016; **60**: 4793–8.
- 16 Beeton ML, Chalker VJ, Jones LC et al. Antibiotic resistance among clinical *Ureaplasma* isolates recovered from neonates in England and Wales between 2007 and 2013. *Antimicrob Agents Chemother* 2015; **60**: 52–6.
- 17 Redelinghuys MJ, Ehlers MM, Dreyer AW et al. Antimicrobial susceptibility patterns of *Ureaplasma* species and *Mycoplasma hominis* in pregnant women. *BMC Infect Dis* 2014; **14**: 171.

- 18** Kawai Y, Nakura Y, Wakimoto T *et al.* In vitro activity of five quinolones and analysis of the quinolone resistance-determining regions of *gyrA*, *gyrB*, *parC*, and *parE* in *Ureaplasma parvum* and *Ureaplasma urealyticum* clinical isolates from perinatal patients in Japan. *Antimicrob Agents Chemother* 2015; **59**: 2358–64.
- 19** Beeton ML, Chalker VJ, Kotecha S *et al.* Comparison of full *gyrA*, *gyrB*, *parC* and *parE* gene sequences between all *Ureaplasma parvum* and *Ureaplasma urealyticum* serovars to separate true fluoroquinolone antibiotic resistance mutations from non-resistance polymorphism. *J Antimicrob Chemother* 2009; **64**: 529–38.
- 20** Duffy L, Glass J, Hall G *et al.* Fluoroquinolone resistance in *Ureaplasma parvum* in the United States. *J Clin Microbiol* 2006; **44**: 1590–1.
- 21** Xie X, Zhang J. Trends in the rates of resistance of *Ureaplasma urealyticum* to antibiotics and identification of the mutation site in the quinolone resistance-determining region in Chinese patients. *FEMS Microbiol Lett* 2006; **259**: 181–6.
- 22** Xiao L, Crabb DM, Duffy LB *et al.* Chromosomal mutations responsible for fluoroquinolone resistance in *Ureaplasma* species in the United States. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; **56**: 2780–3.
- 23** Bébéar CM, Renaudin J, Charron A *et al.* Mutations in the *gyrA*, *parC*, and *parE* genes associated with fluoroquinolone resistance in clinical isolates of *Mycoplasma hominis*. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; **43**: 954–6.
- 24** Meng DY, Sun CJ, Yu JB *et al.* Molecular mechanism of fluoroquinolones resistance in *Mycoplasma hominis* clinical isolates. *Braz J Microbiol* 2014; **45**: 239–42.

CHAPITRE 2

**CHAPITRE 2. FORTE PREVALENCE DES ELEMENTS
INTEGRATIFS ET CONJUGATIFS CODANTS DES REPETITIONS
HOMOLOGUES A UN EFFECTEUR DE TYPE ACTIVATEUR DE
TRANSCRIPTION CHEZ *MYCOPLASMA HOMINIS***

**High prevalence of integrative and conjugative elements encoding transcription
activator-like effector repeats in *Mycoplasma hominis*.**

Alexandra Meygret, Olivia Peuchant, Emilie Dordet-Frisoni, Pascal Sirand-Pugnet, Christine Citti, Cécile Bébéar, Laure Béven et Sabine Pereyre.

Article en révision (minor revisions) dans *Frontiers in Microbiology*, Research topic :
Mollicutes : From evolution to pathogenesis. (Impact factor 2018 : 4,259)

Ce travail a fait l'objet d'un poster présenté au 22^{ème} congrès de l'IOM à Portsmouth, New Hampshire, USA en juillet 2018 et d'un poster présenté à 38^{ème} RICAI, Paris en 2018.

CONTEXTE

Dans cette étude, nous nous sommes concentrés sur la recherche, la caractérisation et la comparaison des ICEs grâce à l'analyse des génomes d'une souche de référence et de 11 souches cliniques de *M. hominis* séquencées par technologie Illumina.

En se basant sur la structure commune des ICEs présents chez les mycoplasmes de ruminants qui présentent tous les CDS1, CDS5, CDS17 et CDS22, un ICE complet de 29,2 kpb présent sur un contig unique a pu être identifié et analysé dans l'isolat *M. hominis* 4788. Nous avons ensuite retrouvé les contigs porteurs de fragments d'ICE dans les autres isolats et les avons assemblés par PCR et séquençage. Ainsi, des ICEs de même structure de 27 à 30 kpb ont été identifiés chez sept souches de *M. hominis* parmi les 12 séquencées.

La réalisation de southern blot avec des sondes d'ADN spécifiques des CDS1 et CDS22 a mis en évidence la présence d'une copie d'ICE unique chez cinq souches et de deux copies chez deux souches. Une analyse de l'intégrité des ICEs par recherche de leur forme circulaire par PCR a mis en évidence la capacité de circularisation de cinq des sept ICEs détectés. Il s'avère que les deux souches ne présentant pas de forme circulaire ont des extrémités 5' ou 3' tronquées. Ceci suggère que les extrémités CDS1 et CDS22 de l'ICE doivent être intègres pour que l'ICE puisse être circularisé et fonctionnel.

De plus, la comparaison de ces ICEs avec ceux existants chez les mycoplasmes de ruminants a mis en évidence la présence d'un nouveau module de 4,0 à 5,1 kb comprenant cinq ou six CDS spécifiques de l'espèce *M. hominis* groupés dans la même région. L'analyse de la structure secondaire et tertiaire des protéines de ce module spécifique par bio-informatique a mis en évidence une homologie de deux protéines avec des activateurs de transcription (Transcription activator-like, TAL), impliqués dans la reconnaissance de polynucléotides et dans la transduction du signal. Ces effecteurs TAL sont connus pour être délivrés aux plantes par des bactéries pathogènes à travers un système de sécrétion de type III^{196,197}. Ils n'ont à ce jour jamais été décrits dans des éléments génétiques mobiles portés par des mycoplasmes. Cependant, ils ont toujours été décrits chez des bactéries capables de vivre en symbiose avec d'autres organismes. Il s'avère que *M. hominis* est capable de vivre en symbiose avec *T. vaginalis*, parasite urogénital humain responsable d'infections sexuellement transmissibles. Il est donc possible que les ICEs de *M. hominis* arborant ces effecteurs TAL puissent engendrer

des propriétés favorables à *M. hominis* et/ou à *T. vaginalis* pour permettre leur symbiose. Il a d'ailleurs été récemment montré que *M. hominis* avait un impact sur l'expression de certains gènes de *T. vaginalis*⁶⁸.

Dans cette étude, la prévalence des ICEs chez *M. hominis* a aussi été déterminée sur 120 isolats cliniques issus de la collection présentée dans le chapitre 1, comprenant notamment les 27 souches résistantes à la tétracycline et celles résistantes aux fluoroquinolones. Nous avons utilisé des amorces consensus dessinées sur la base des ICEs caractérisés chez les sept souches séquencées pour rechercher par PCR les CDS1, CDS5, CDS17, CDS22 ainsi que le module spécifique de *M. hominis*. Cette étude a montré une prévalence d'ICEs élevée chez *M. hominis* (45%) et l'absence de prédominance d'ICEs chez les isolats porteurs du gène *tet(M)*. Ceci suggère que les ICEs ne seraient pas responsables de la propagation de la résistance à la tétracycline chez *M. hominis*. Cependant, si l'on se focalise uniquement sur les isolats qui ne présentent pas d'ICE dans leur génome, 43% ne portent pas le gène *tet(M)* contre seulement 7.4% qui le portent ($p < 0,01$). Ceci suggère que les souches de *M. hominis* sans ICE pourraient être moins susceptibles à l'intégration de matériel génétique étranger que celles possédant un ICE.

Au final, cette étude a décrit la présence d'ICEs chez près de la moitié des souches cliniques de *M. hominis*. Ces ICEs ne semblent pas impliqués dans la résistance aux tétracyclines mais portent tous un module inhabituel comprenant des protéines ayant des homologies avec les effecteurs TAL, impliqués dans la reconnaissance de polynucléotides et la transduction du signal chez les bactéries symbiotiques. Ces ICEs pourraient conférer un avantage à la bactérie pour survivre dans son environnement. De futures expériences de conjugaison sont nécessaires pour savoir si ces ICEs sont fonctionnels.

High prevalence of integrative and conjugative elements encoding transcription activator-like effector repeats in *Mycoplasma hominis*

A. Meygret^{1, 2, 3}, O. Peuchant^{1, 2, 3}, E. Dordet-Frisoni⁴, P. Sirand-Pugnet^{5,6}, C. Citti⁴, C. Bébéar^{1, 2, 3}, L. Béven^{5,6}, S. Pereyre^{1, 2, 3*}.

¹Univ. Bordeaux, USC-EA 3671 Mycoplasmal and Chlamydial Infections in Humans, Bordeaux, France.

²INRA, USC-EA 3671 Mycoplasmal and Chlamydial Infections in Humans, Bordeaux, France.

³Bacteriology department, French National Reference Center for bacterial STI, CHU Bordeaux, Bordeaux, France.

⁴IHAP, Université de Toulouse, INRA, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, Toulouse, France.

⁵Univ. Bordeaux, UMR 1332, BFP, Villenave d'Ornon, France.

⁶INRA, UMR 1332, BFP, Villenave d'Ornon, France.

***Corresponding Author:** Sabine Pereyre

✉: USC EA 3671 Mycoplasmal and Chlamydial Infections in Humans, University of Bordeaux, Campus Bordeaux Carreire, 146 rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux Cedex, France.

✉: sabine.pereyre@u-bordeaux.fr

☎: +33 5 57 57 16 25

☎: +33 5 56 93 29 40

Running title: High prevalence of ICEs in *Mycoplasma hominis*

Word counts: Abstract: 304, manuscript: 5426

Figures: 3, supplementary figures: 4

Abstract

Integrative and conjugative elements (ICEs) are modular mobile genetic elements that can disseminate through excision, circularization, and transfer. Mycoplasma ICEs have recently been found distributed among some mycoplasma species and there is accumulating evidence that they play a pivotal role in horizontal gene transfers. The occurrence of ICEs has not been documented in *Mycoplasma hominis*, a human urogenital pathogen responsible for urogenital infections, neonatal infections and extragenital infections. In this study, we searched for, characterized, and compared ICEs by genome analyses of 12 strains of *M. hominis*. ICEs of 27-30 kb were found in one or two copies in seven of the 12 *M. hominis* strains sequenced. Only five of these ICEs seemed to be functional, as assessed by detection of circular forms of extrachromosomal ICE. Moreover, the prevalence of ICEs in *M. hominis* was estimated to be 45% in a collection of 120 clinical isolates of *M. hominis*, including 27 tetracycline-resistant *tet(M)*-positive isolates. The proportion of ICEs was not higher in isolates carrying the *tet(M)* gene, suggesting that ICEs are not involved in tetracycline resistance. Notably, all *M. hominis* ICEs had a very similar structure, consisting of a 4.0-5.1 kb unusual module composed of five to six juxtaposed CDSs. All the genes forming this module were specific to *M. hominis* ICEs as they had no homologues in other mycoplasma ICEs. In each *M. hominis* ICE, one to three CDSs encode proteins that share common structural features with transcription activator-like (TAL) effectors involved in polynucleotide recognition and signal transduction in symbiotic plant pathogen bacteria. The conserved and specific structure of *M. hominis* ICEs and the high prevalence in clinical strains suggest that these ICEs may confer a selective advantage for the physiology or pathogenicity of this human pathogenic bacterium. These data open the way for further studies aiming at unravelling horizontal gene transfers and virulence factors in *M. hominis*.

53

54 **Keywords**

55 *Mycoplasma hominis*

56 Integrative and conjugative element

57 Transcription activator-like effector

58 Horizontal gene transfer

59 Tet(M)

60

Introduction

Mycoplasma species represent a large group of wall-less bacteria derived from a common ancestor to Gram-positive bacteria, such as *Clostridia* (Woese et al., 1980). Their evolution has been marked by loss of genetic material, resulting in some species, such as *Mycoplasma genitalium*, which are considered good natural representatives of minimal cells (Glass et al., 2006) because of their reduced genome. Genome down-sizing was not the sole force operating during mycoplasma evolution; it was recently shown that mycoplasmas sharing the same natural niche have exchanged significant amounts of their genome through horizontal gene transfer (HGT) (Sirand-Pugnet et al., 2007; Pereyre et al., 2009). A few mobile genetic elements (MGE), including insertion sequences, phages, plasmids, and integrative and conjugative elements (ICEs), have been described in mycoplasmas (Breton et al., 2012; Marenda, 2014) and may be involved in such genetic transfer.

Over the last several decades, there has been increasing appreciation of the role of ICEs in HGT (Burrus and Waldor, 2004; Delavat et al., 2017). Their importance in bacterial evolution is underlined by their wide distribution across bacteria. These genetic elements are defined by two features: their integration in the host chromosome and their capacity to encode a type IV secretion system that mediates their transfer from the donor cell to the recipient cell via conjugation (Johnson and Grossman, 2015). Mycoplasma ICEs (MICEs) are emerging as pivotal factors in HGT of large DNA fragments in many mycoplasmas species (Citti et al., 2018; Faucher et al., 2019). The first reported MICE was ICEF, a genetic element of 23 kb occurring in four copies in *Mycoplasma fermentans* PG18 (Calcutt et al., 2002), a human mycoplasma species of the Hominis phylogenetic group. A second MICE of 27 kb, designated as ICEA, was identified in three copies in *Mycoplasma agalactiae* strain 5632 (Marenda et al., 2006), a ruminant mycoplasma belonging to the same phylogenetic group. Both MICEs are composed of about 20 structural genes, of which 12 are homologous. Similar

MICEs have also been detected in other animal mycoplasma species, such as *Mycoplasma bovis* (Wise et al., 2011), *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri*, and *Mycoplasma capricolum* subsp. *capricolum* (Thiaucourt et al., 2011). These self-transmissible elements belong to a new clade of the mutator-like superfamily and rely on a DDE recombinase for their mobility (Dordet Frisoni et al., 2013; Guerillot et al., 2014). In 2015, a comparative study including MICEs found, in several ruminant mycoplasmas species, a conserved, minimal MICE backbone composed of four coding sequences (CDSs) predicted to be essential for MICE self-dissemination across cells (Tardy et al., 2015): CDS1, of unknown function, CDS22 encoding a DDE recombinase, and CDS5 and CDS17 encoding TraG/VirD4 and TraE/VirB4 homologues, respectively, which are predicted to be two essential components of the type IV secretion system required for DNA mobility (Citti et al., 2018). The detection of MICEs in several mycoplasma species of the Hominis phylogenetic group, which includes the human *M. fermentans* species, raised the question of whether they also occur in the human *M. hominis* species.

M. hominis is present as a commensal in the lower urogenital tract but can be responsible for urogenital infections, neonatal infections, and extragenital infections in immunocompromised patients (Waites and Talkington, 2005; Waites et al., 2009). Recent evidence of HGT with *Ureaplasma parvum*, a species sharing the same urogenital habitat, has been reported despite the absence of plasmids or transposons in the *M. hominis* type strain PG21 (Pereyre et al., 2009). The MGEs have rarely been described in other *M. hominis* isolates. To date, the transposon Tn916 (Roberts et al., 1985; Mardassi et al., 2012), other transposons carrying the *tet(M)* gene, (Allen-Daniels et al., 2015; Calcutt and Foecking, 2015b) and prophages (Allen-Daniels et al., 2015) (Calcutt and Foecking, 2015a) have been reported in *M. hominis* isolates. In addition, no MICE similar to those described in *M. fermentans* or ruminant mycoplasmas have been explored in *M. hominis*. In the present study, detection and characterization of

111 *M. hominis* ICEs was performed in one reference strain and 11 clinical isolates by whole-
112 genome sequencing and analyses. Common and specific *M. hominis* ICE (ICEHo)
113 determinants were further defined by comparative genomics. In addition, the prevalence of
114 ICEHos in *M. hominis* species was estimated by screening a collection of 120 clinical isolates.
115

Material and Methods

Mycoplasma strains

The genomes of reference strain M132 and 11 French clinical isolates of *M. hominis* were sequenced. The 11 clinical isolates were part of the isolate collection of the French National Reference Center for sexually transmitted bacterial infections and have been preserved at the Centre de Ressource Biologique-Bordeaux Biothèque Santé (CRB-BBS) of Bordeaux University Hospital under the collection number BB-0033-00094 and authorization AC-2014-2166 from the French Ministry of Higher Education and Research with no information regarding the patient identity from whom the isolate had been grown. These strains were chosen among a total of about 500 *M. hominis* isolates to ensure diversity in terms of sampling origin, multi-locus variable-number tandem-repeat (VNTR) analysis (MLVA) types and years of isolation (Table 1).

To determine the prevalence of ICE in *M. hominis* species, 120 clinical isolates randomly selected from among 183 isolates collected in a previous study (performed between 1 January 2010 and 31 December 2015 at Bordeaux University Hospital, France) were used (Meygret et al., 2018). The sources of the samples were diverse and included 75 (62.5%) urogenital, 25 (20.8%) placental, 2 (1.7%) lower respiratory, 2 (1.7%) upper respiratory samples, 5 (4.2%) puncture liquids from different origin (1 cerebrospinal fluid, 1 puncture liquid from the pouch of Douglas, and 3 puncture liquids of unknown origin), as well as 11 (9.2%) samples of unknown origin. Among the 120 clinical isolates, 27 isolates harbored the *tet(M)* gene (Meygret et al., 2018).

DNA extraction

The extraction of genomic DNA was performed using Nucleobond® AXG 20 columns with a Nucleobond Buffer set III kit (Macherey Nagel, Hoerd, France) according to the manufacturer's instructions for Illumina sequencing, and using an increased initial culture volume of 10 mL for Oxford Nanopore sequencing to increase the DNA concentration. A NucleoSpin® Tissue kit (Macherey Nagel) was used for DNA extraction for conventional PCR.

Sequencing and assembly

Mate pair reads were generated with Illumina GAIIX technology for four strains, i.e. *M. hominis* 331, 3631, 4016, and 5012 (6,000X average coverage), and with the MiSeq system for the other seven strains (775X average coverage; Illumina, San Diego, CA, USA). Paired-end reads were also generated with Illumina GAIIX technology (1,700X average coverage) for all strains. Contigs were obtained using two de novo assembly tools, ABySS (Simpson et al., 2009) (version 1.3.5) and CLC assembly cell (version 4.2.0) (<http://www.clcbio.com/products/clc-assembly-cell>).

Strains 4788, 4235, and 35 were also sequenced with Oxford Nanopore technology using a GridIon apparatus. To generate the assemblies, a hybrid approach consisting of the assembly of long reads only and polishing of the resulting contigs with short reads was implemented. Long reads with Phred score < Q9 and minimum length < 1,000 bp were removed with Filtlong v0.1.1 (<https://github.com/rrwick/Filtlong>). The theoretical depth of remaining reads for each seed was greater than 250X. Assembly was performed with Canu1.7 (Koren et al., 2017) using the default parameters and an expected genome size of 800 kb. Before polishing draft assemblies with Pilon 1.22 (Walker et al., 2014), Illumina reads were trimmed using Trimmomatic V0.36 (Bolger et al., 2014). Sequences were annotated with Prokka v1.12

(Seemann, 2014), using the previously published annotation of the *M. hominis* PG21 strain genome as a reference (Pereyre et al., 2009).

Gap closures, genome analysis, and comparisons

Detection of contigs harboring ICE-related CDSs was performed by comparison with the previously reported genome sequences of *M. fermentans* PG18 (GenBank accession number: AP009608), *M. agalactiae* 5632 (FP671138), *M. bovis* PG45 (CP002188), *M. bovis* Hubei (CP002513), and *M. mycoides* subsp. *capri* GM12 (CP001668) using MolliGen (Barre et al., 2004). The characterization of ICEHo 4788, carried by a single contig, allowed detection of contigs carrying fragments of ICEHo in the other fully sequenced strains. Gap closure between contigs carrying ICE sequences was performed by PCR and Sanger sequencing. ICE maps were drawn using Clone Manager 9 Basic Edition (Scientific & Educational Software, Denver, CO, USA).

The ICE-related CDSs were analyzed using BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>), InterPro (www.ebi.ac.uk/interpro/search/sequence-search), MolliGen (<http://services.cbib.u-bordeaux.fr/molligen/>), Artemis Comparison Tool (http://www.hpa-bioinfotools.org.uk/pise/double_actv2.html), EMBOSS Needle (https://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/), TMHMM Server v.2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>), MEME analysis (<https://services.cbib.u-bordeaux.fr/molligen/TOOLBOX/MEME/tmp/>), RADAR (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/pfa/radar/>), SPINE-D (<http://sparks-lab.org/SPINE-D/>), PHYRE2 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>), IsUnstruct v2.02 (<http://bioinfo.protres.ru/IsUnstruct/>), and PONDR® (<http://www.pondr.com/>).

Southern blotting analyses

Southern blotting analyses were performed as described previously (Marenda et al., 2006). Briefly, 1 µg of genomic DNA was separately digested with *Hind*III and *Eco*RV. Membranes were hybridized with digoxigenin-labelled (Roche, Mannheim, Germany) CDS1-specific or CDS22-specific probes generated by PCR (Table 2).

Detection of ICE-related CDS and ICE extrachromosomal forms

Detection of the four conserved ICE genes (CDS1, CDS5, CDS17, and CDS22) was performed by PCR (Table 2). The primers for detection of the specific *M. hominis* ICE module were designed to correspond to the flanking CDSs, i.e. CDS11 for the forward primer and CDS14 for the reverse primer. The extrachromosomal ICEHo circular forms (cICEHos) were detected using outward facing primers (Supplemental Table S1).

PCR for detection of the four conserved CDSs was carried out in a volume of 50 µL using GoTaq G2 hot start polymerase (Promega, Madison, WI, USA). Thermal cycling reactions consisted of an initial denaturation step of 15 minutes at 95°C followed by 30 cycles of denaturation for 1 minute at 95°C, annealing for 1 minute at 56°C, and extension for 2 minutes at 72°C, with a final extension for 5 minutes at 72°C.

PCR for detection of the specific *M. hominis* ICE modules was carried out in a volume of 50 µL using the Expand Long Template PCR system (Roche). Thermal cycling reactions consisted of an initial denaturation step for 2 minutes at 95°C followed by 15 cycles of denaturation for 10 s at 95°C, annealing for 30 s at 57°C, and extension for 2 minutes at 68°C, and 20 cycles of denaturation for 15 s at 95°C, annealing for 30 s at 57°C, and extension for 2 min + 20 s for each successive cycle at 68°C, with a final extension for 7 minutes at 68°C.

211 All PCR products were sent to Eurofins Genomics (Ebersberg, Germany) for sequencing.
212 Sequencing data were analyzed using BioEdit[®] 7.2.5 software (Isis Pharmaceuticals,
213 Carlsbad, CA, USA).

214 **Statistical analysis**

215 The chi-squared test was used to compare the prevalence of ICEHos between isolates carrying
216 the *tet(M)* gene and those without the *tet(M)*. $P < 0.05$ was considered significant.

217 **Data availability**

218 Illumina reads have been deposited in SRA under BioProject PRJNA493181. Strain 4788,
219 4235 and 35 genome assemblies have been submitted to GenBank under the accession
220 numbers CP035542, CP038014, and CP035543, respectively.

221

222

223 **Results**

224 **Detection of MICEs in *M. hominis***

225 We first searched for the minimal ICE backbone composed of CDS1, CDS5, CDS17, and
226 CDS22 using the Molligen database in the 12 fully sequenced *M. hominis* genomes. Three
227 isolates, i.e. 331, 3299, and 5096, had none of the four CDSs. Two isolates, i.e. 2674 and
228 5060, had three CDSs (CDS1, CDS5, and CDS22), but they occurred at different loci
229 suggesting that they were vestigial ICE remnants. The minimal ICE backbone was detected in
230 the remaining seven isolates, suggesting the presence of complete ICEs. A full ICE,
231 designated as ICEHo 4788, was identified in isolate 4788 and was carried by a single contig.
232 Its organization and composition were defined and ICEHo 4788 was then used as a reference
233 to analyze and assemble other isolates, in which ICE elements were distributed over several
234 contigs.

235

236 ***M. hominis* 4788 ICE**

237 ICEHo 4788 is a large genetic element of 29,180 bp, accounting for 4.1% of the *M. hominis*
238 4788 genome (712,285 bp). Its GC content was 27.31%, which was not significantly different
239 from the GC content of 26.98% in the *M. hominis* 4788 genome ($P=0.622$, χ^2 test).
240 Comparative analysis of ICEHo 4788 CDS synteny and amino acid (aa) identity and
241 similarity with ICEF-II from the *M. fermentans* PG18 strain (Calcutt et al., 2002) and ICEA-
242 III from the *M. agalactiae* 5632 strain (Marenda et al., 2006) was performed (Figure 1A;
243 Table 3, Table S2). ICEHo 4788 contained 25 CDSs, including 13 distinct CDSs homologous
244 to ICEF-II CDSs, which were further designated using the same nomenclature (Calcutt et al.,
245 2002). The synteny was overall conserved between ICEHo 4788 and ICEF-II but CDS12 was
246 located at different positions—downstream of CDS18 in ICEHo 4788 and downstream of

CDS11 in ICEF-II (Figure 1A). When compared to ICEA-III (Marenda et al., 2006), only 10 distinct homologous CDSs were found in ICEHo 4788 (Figure 1, Table 3, Table S2). Overall, the percentages of similarity and identity between CDSs of ICEHo 4788 and ICEA-III were lower than those between ICEHo 4788 and ICEF-II (Table 3, Table S2). Using TMHMM and InterPro softwares, six CDSs (CDS5, CDS14, CDS15, CDS16, CDS17, and CDS19) were shown in ICEHo 4788 to harbor transmembrane domains in comparison to eight CDSs previously described in ICEF-II (CDS4, CDS5, CDS7, CDS14, CDS15, CDS16, CDS17, CDS19) (Calcutt et al., 2002) and seven in ICEA-III (CDS5, CDS7, CDS14, CDS15, CDS16, CDS17, CDS19) (Marenda et al., 2006). Marked differences were observed with *M. fermentans*, as six ICEF-II CDS homologues were lacking in ICEHo 4788 (CDS2, CDS4, CDS6, CDS7, CDS8, CDS13) and eight ICEHo 4788 CDSs had no homology with ICEF-II CDSs, nor with CDSs described previously in MICEs. These specific CDSs were designated as Mho plus a letter (MhoA to MhoK). Their best NCBI Blast hits retrieved mainly hypothetical proteins and methyltransferases from bacteria belonging to the same urogenital environment, such as *Ureaplasma parvum*, *Candidatus Mycoplasma girerdii*, and *Finegoldia magna* (Table 4).

Common and specific features of *M. hominis* ICEs

In addition to ICEHo 4788, complete ICEs were detected and characterized in six strains (ICEHo 35-I, ICEHo 132, ICEHo 3631, ICEHo 4016, ICEHo 4235-I, and ICEHo 5012) (Figure S1). Overall, ICEHos showed a similar structure except for the occurrence of MhoA as a pseudogene, which was only present in ICEHo 4788 (Figure S1). All ICEHos contained a 4.0–5.1-kb module composed of five to six juxtaposed CDSs, i.e. MhoJ, MhoH, MhoG, MhoF, MhoE, and MhoC, the synteny of which varied slightly among the strains, as shown in

Figure 1B. All of the genes forming this module were specific to *M. hominis* ICEs (see below for detailed description) as they had no homologues in other MICEs.

***M. hominis* ICEHo may occur as multiple copies**

Southern blot hybridization data using labelled CDS1 and CDS22 probes and *EcoRV*-digested chromosomal DNA suggested the presence of a single chromosomal ICEHo in *M. hominis* strains 3631, 132, 4016, 4788, and 5012, and the presence of at least two ICEHo copies in strains 4235 and 35 (Figure S2). Southern blot hybridization performed with *HindIII*-digested chromosomal DNA yielded the same results (data not shown). In strains 4235 and 35, Illumina sequencing retrieved a single copy of ICEHo due to the limits of the assembly process based on short reads only. To overcome this issue, the genomes of *M. hominis* strains 4788, 4235, and 35 were sequenced using Oxford Nanopore technology that can generate long reads. The combined assembly of Oxford Nanopore and Illumina reads confirmed the presence of a single ICEHo in strain 4788 and revealed the occurrence of two ICEHo copies in *M. hominis* 4235, namely ICEHo 4235-I of 30.5 kb at position 397,452–428,015 and ICEHo 4235-II at position 778,637–809 029 (GenBank accession number CP038014). The two copies showed 99.0% sequence identity and were in opposite orientation within the genome of *M. hominis* 4235. In *M. hominis* strain 35, the presence of two ICEHo copies, namely ICEHo 35-I of 30.3 kb (position 449,355–479,744) and ICEHo 35-II of 29.1 kb (position 312,315 to 341,498) (GenBank accession number CP035543) was also confirmed. These two copies were in the same orientation within the genome and showed 90.0% sequence identity.

Extrachromosomal circular forms and sites of integration of ICEHos

One piece of evidence for ICE functionality is the detection of a circular form due to chromosomal excision. To detect these cICEHos in *M. hominis*, outward facing primers located at both ends of the chromosomal ICEs were designed for all strains (Table S1). PCR products were detected for five strains, i.e. *M. hominis* 4788, 3631, 35, 132, and 4235, and the cICEHo junctions previously designated as cirboxes (Tardy et al., 2015) were sequenced (Figure 2A). As shown in Figure 2B, these sequences encompassed the downstream region of CDS22, a noncoding region, an imperfect inverted repeat (IR), a 6-bp coupling sequence corresponding to a juxtaposition of the two 8-bp direct repeats that flank the ICEHo, an imperfect IR, and a noncoding region located upstream of CDS1 (Figure 2A). Cirbox sequences were highly conserved with 92% identity between cirboxes of ICEHo 4788, ICEHo 3631, ICEHo 35-I, ICEHo 132, and ICEHo 4235-I. The length of the noncoding regions between CDS22 and the IR, and between the IR and CDS1 were similar, ranging between 368 and 407 nt and between 171 and 204 nt, respectively. The 6-bp coupling sequences differed between strains (Figure 2B). No cICEHo was detected for ICEHo 4016 or ICEHo 5012, but we noted that these two ICEs had truncated ends (Figure S1). Indeed, ICEHo 4016 CDS1 comprised only 171 aa compared to 263 aa for the other ICEHo CDS1 (35% loss of length). ICEHo 5012 CDS22 was comprised of 142 aa and was thus shorter than the other ICEHo CDS22 (396 aa; 36% loss of length). Furthermore, IRs and direct repeats were not found in ICEHo 5012 or ICEHo 4016.

The chromosomal locations of ICEHos are shown in Figure S3. The results indicated that ICEHos could insert in either coding or non-coding regions without any target specificity.

Analysis of the specific *M. hominis* ICE module

Further analysis of the specific *M. hominis* ICE module highlighted that in MhoH, MhoG, MhoF, and MhoJ, an absolutely conserved sequence of 23 aa

320 (SSLSDFDKTPTDLKDSKVINEYN) was present within the last 40 residues of the
321 sequences (Figure 1). This conserved sequence was also detected in CDS11 and CDS21, but a
322 Prosite search failed to retrieve functional motifs. The conserved sequence was acidic, with
323 five D/E residues, and was also found in a hypothetical protein from *Candidatus Mycoplasma*
324 *girerdii* (MGM1_3750). The C-terminal part of the proteins containing this conserved motif
325 was predicted to be disordered using SPINE-D, Phyre2, and IsUnstruct v2.02, and was
326 enriched in putative phosphorylation sites (prediction using DEPP® server) (Figure S4).

327 In the search for additional insights regarding the putative function of ICEHo 4788 proteins,
328 *in silico* analysis using Phyre2 (secondary and tertiary structure elements) and RADAR
329 (direct repeat) algorithms was performed for detailed analysis of the primary protein
330 sequences. A modelled partial structure was obtained using Phyre2 for the 10 proteins listed
331 in Table 5. All proteins for which a structure was obtained, except MhoK, were predicted to
332 share structural similarities to DNA interacting/modifying proteins. Phyre2 analysis of
333 secondary structures in MhoF and MhoH revealed a high content of α -helices, organized in a
334 tight stretch of supersecondary elements consisting of α -helices linked by short loops. Phyre2
335 3-D structure prediction indicated that both proteins shared common structural features with
336 transcription activator-like (TAL) effectors (Table 5). The highest scoring templates leading
337 to modelling of MhoF and MhoH structures were structures of the TAL effector AvrBs3/PthA
338 for MhoF and the second copy of ICEHo 4788 MhoH (98% and 95% coverage, respectively),
339 and BurrH DNA binding protein for the first copy of MhoH (97% coverage). The modelled
340 structure obtained for MhoF is shown in Figure 3A. Similar to BurrH and in contrast to
341 typical TAL effectors, such as AvrBs3, MhoF and MhoH do not possess any recognizable
342 nuclear localization signal (NLS) sequence, N-terminal type III secretion signal or activation
343 domain at the C-terminus.

Combination of Phyre2 alignments and RADAR results allowed identification of eight 32-residue long repeats in MhoF, and six repeats of the same length in both MhoH sequences in ICEHo 4788 (Figure 3B). In all proteins, the full-length repeats were flanked by two supplementary truncated repeats. In addition, the C-terminal ends of all three proteins were predicted to form a double helix containing two cryptic repeats, which included the 23-aa conserved motif. Alignment of the whole set of 32-residue long repeats found in MhoF and MhoH sequences using Clustal Omega revealed the presence of eight strictly conserved aa (Figure 3B). Following the Phyre2 model (Figure 3A), repeats were associated to form a structure based on successive two-helix bundles. Whereas in typical TAL effectors repeated sequences are almost identical, except at positions 12 and 13 corresponding to the repeat variable di-residue (RVD) motif involved in nucleotide recognition, a high degree of polymorphism of Mho TAL-like repeats was observed. Nonetheless, at positions 12 and 13 of the repeats in MhoF, variable residues (KG, FN, NG, and HG) exposed in interhelical loops were identified as the putative RVD. The other highly variable positions were positions 20 and 21 of each repeat of MhoF, but the corresponding residues were part of the helical structures predicted using Phyre2. The truncated repeats (1st and 10th repeats) in MhoF did not contain a putative RVD. Examination of MhoH sequences suggested that QG may also correspond to an RVD (Figure 3B).

Prevalence of ICEHo in a collection of 120 *M. hominis* clinical isolates

To define the prevalence of ICEHo in the *M. hominis* strains, the four CDSs that are part of the minimal ICE backbone (CDS1, CDS5, CDS17, and CDS22) and the specific *M. hominis* ICE module were searched by PCR in a panel of 120 *M. hominis* clinical isolates (Table 6). A complete ICEHo was considered present when the four CDSs and the specific *M. hominis* ICE module were detected. The data showed that 45% of the isolates possessed the four CDSs

and the specific *M. hominis* ICE module, suggesting the presence of complete ICEHos. In 35% of isolates, none of the four CDSs or the specific *M. hominis* ICE module were detected, suggesting the absence of ICEHo. The remaining 20% of clinical isolates harbored one, two or three CDSs, suggesting the presence of potential ICEHo remnants (Table 6). The specific *M. hominis* ICE module was present in 54.5% (6/11) of strains harboring three backbone CDSs. Among the 27 *M. hominis* isolates carrying the *tet(M)* gene, the prevalence of the four CDSs and the specific *M. hominis* module was 48.1% (13/27), whereas among the 93 *M. hominis* isolates not carrying the *tet(M)* gene, the prevalence of the four CDSs and the specific *M. hominis* module was 44.1% (41/93). There was no significant difference in the prevalence of ICEHos between isolates carrying the *tet(M)* gene and those without the *tet(M)* gene ($P=0.85$, χ^2 test).

381

382 **Discussion**

383 Since their discovery, MICEs have been found distributed among several mycoplasma species
384 (Calcutt et al., 2002; Marena et al., 2006; Thiaucourt et al., 2011; Wise et al., 2011; Tardy et
385 al., 2015) and there is accumulating evidence that they play a pivotal role in HGTs of large
386 DNA fragments (Dordet Frisoni et al., 2013; Dordet-Frisoni et al., 2014; Citti et al., 2018).
387 This report provides the first description of ICE in *M. hominis* and highlights their specific
388 and new features.

389 The previously reported MICE backbone, comprised of CDS1, CDS5, CDS17, and CDS22,
390 was found (Tardy et al., 2015) in *M. hominis* ICEs. These four CDSs were demonstrated to be
391 part of the minimal ICE machinery using a transposon-based strategy in *M. agalactiae*
392 (Baranowski et al., 2018). The gene repertoire and organization of CDSs in ICEHo were
393 similar to those reported in *M. agalactiae* (Marena et al., 2006) and *M. fermentans* (Calcutt
394 et al., 2002), two other species belonging to the Hominis phylogenetic group. Thus, ICEHos
395 also belong to the previously designated “hominis” MICE type (Tardy et al., 2015). Notably,
396 five CDSs (CDS5, CDS15, CDS16, CDS17, and CDS19) harboring transmembrane domains
397 and previously described as candidates for conjugative channel formation (Citti et al., 2018),
398 were identified in ICEHos. CDS14, a surface-exposed lipoprotein essential for mycoplasma
399 conjugation and predicted to initiate cell-to-cell contact in the first step of conjugation
400 (Baranowski et al., 2018; Citti et al., 2018), was also identified in ICEHos as well as CDS22,
401 encoding the DDE recombinase essential for ICE excision and integration (Baranowski et al.,
402 2018; Citti et al., 2018). These observations raised questions regarding the functionality of
403 ICEHos. As the first step in conjugative ICE transfer is excision from the chromosome, we
404 searched for circular extrachromosomal forms and these were found in five of the seven
405 strains harboring ICEHos. Interestingly, the two ICEHos for which no circular forms were

found had truncated ends, i.e. the 3' end of CDS1 in ICEHo 4016 and the 5' end of CDS22 in ICEHo 5012 (Figure S1). The absence of IRs at both extremities of ICEHo 5012 and ICEHo 4016 was also noted, suggesting that both complete 3' and 5' ends of the ICEHo are required for excision from the chromosome. In contrast, the 3' end of ICEA CDS1 was shown to be non-essential in *M. agalactiae*, as miniICEs composed of IRs and the first 470 nt of CDS1 were able to circularize (Dordet Frisoni et al., 2013). Mating experiments are needed to confirm the capacity of ICEHos to transfer. However, the transformation of *M. hominis* is problematic (Bébéar *et al.* personal data) and to date no *M. hominis* transformants harboring an ICEHo marked by an antibiotic resistance gene marker have been obtained, thus limiting the possibility of performing such experiments.

As previously reported in MICE (Citti et al., 2018), the present study showed that *M. hominis* strains can carry a single or two similar ICEHo copies. The insertion sites of ICEHo in the chromosome were variable and could occur within CDSs, suggesting that the DDE recombinase encoded by CDS22 has no specific target site and that random insertion may sometimes have deleterious effects. The prevalence of ICEHo in *M. hominis* strains was high, i.e. 45% in a collection of 120 *M. hominis* clinical isolates. This prevalence may have been slightly underestimated because six additional strains (5%) harbored the specific *M. hominis* ICE module and three of the four backbone CDSs. We cannot exclude the possibility that the fourth CDS would not have been detected by PCR due to slight modifications of the gene sequence. In addition, CDS1, CDS5, CDS17, CDS22 and the specific *M. hominis* ICE module are also present in two previously published genome datasets for two other clinical isolates, *M. hominis* PL5 (GenBank JRXA01000000) and *M. hominis* TO0613 (GenBank CP033021). Overall, this 45% prevalence was equivalent to that of 47% (78/166) found in a collection of four ruminant mycoplasma species (Tardy et al., 2015). It should also be noted that CDS22 from ICEHo 4788 has a match in the genome of *U. parvum* serovar 14 (ATCC 33697),

431 another human mycoplasma sharing the same genital niche. Thus, ICEs appear to be
432 widespread both within animal and human mycoplasmas. The maintenance of such genetic
433 mobile elements in genomes, as small as those of mycoplasmas, supports the hypothesis that
434 MICEs may confer a positive advantage for the physiology or pathogenicity of the bacterium.
435 Nevertheless, the prevalence of ICEs was not higher in isolates carrying the *tet(M)* gene
436 responsible for tetracycline resistance. This suggests that *tet(M)*-mediated tetracycline
437 resistance is not attributable to ICEHos in *M. hominis*. Indeed, in previously sequenced strains
438 harboring the *tet(M)* gene, the resistance gene was carried by a transposon that integrated into
439 the *rumA* gene in a site-specific manner (Allen-Daniels et al., 2015; Calcutt and Foecking,
440 2015c; Chalker et al., 2018), which is not a gene carried by *M. hominis* ICEs. However, when
441 focusing on isolates harboring no ICE-specific CDSs in their genome, it was noted that 43%
442 (40/93) were *tet(M)*-negative strains, whereas only 7.4% (2/27) were *tet(M)*-positive strains
443 ($P<0.01$). This finding suggests a possible association between the absence of ICE and the
444 absence of the *tet(M)* gene in the genome. Therefore, we speculated that *M. hominis* strains
445 that do not carry ICEs may be less susceptible than others to the entry of foreign DNA, such
446 as the *tet(M)* gene, by HGT. The reason for this phenomenon is unknown, but it will be of
447 interest to screen for differences in the nature and number of restriction-modification systems
448 between such strains.

449 The major difference with previously reported MICEs was the presence of a specific
450 *M. hominis* ICE module, not found in other MICEs, composed of five to six juxtaposed CDSs
451 that had no orthologs with any MICE CDSs, and no predicted transmembrane domains.
452 Interestingly, Phyre2 3-D structure prediction indicated that two proteins, MhoF and MhoH,
453 share common structural features with TAL effectors, found in *Xanthomonas* spp. and in
454 *Ralstonia solanacearum* (Heuer et al., 2007; de Lange et al., 2013), and with BurrH from
455 *Burkholderia rhizoxinica* (Juillerat et al., 2014; Stella et al., 2014). TAL effectors are

456 heterogeneous transcription factors involved in polynucleotide recognition and signal
457 transduction, and are delivered into plant cells by pathogenic bacteria *via* a type III secretion
458 system (Doyle et al., 2013; Pereira et al., 2014) . Our study raised the question of whether
459 MhoF and MhoH retained DNA-binding capability similar to BurrH, which also lacks typical
460 TAL effector features other than repeats (Juillerat et al., 2014; Stella et al., 2014). As many
461 TAL effectors are important virulence factors (Schornack et al., 2006; Boch and Bonas, 2010;
462 Mak et al., 2013), this is an important issue as these proteins may play roles in the
463 pathogenicity of *M. hominis*. The results of *in silico* analysis indicated that *mhoF* and *mhoH*
464 are phylogenetically related and belong to the same multigene family. They most likely
465 appeared by duplication and their sequences have diverged gradually during evolution.

466 Considering the predicted structural elements, DNA-binding properties of these two repeat-
467 containing proteins, especially for the longest, MhoF, cannot be excluded. Indeed, MhoF has
468 a double-helix structure similar to the minimal functional TAL effectors (Boch et al., 2009)
469 (Figure 3A). The identified putative RVDs in MhoF and MhoH sequences include the di-
470 residues KG, FN, NG, HG, and QG. The RVD NG is commonly found in natural TAL repeats
471 and shows specificity for thymine (Boch et al., 2009). Extensive studies using artificial RVDs
472 showed that HG, QG, and KG also have a binding preference for thymine, and FN shows a
473 binding preference for guanine (Yang et al., 2014; Miller et al., 2015). The genes encoding
474 the bacterial apparatus required for TAL-like protein secretion have not yet been identified in
475 *M. hominis*. Nevertheless, *M. hominis* ICEs encode a putative type IV secretion system
476 (T4SS). Although to date TAL effectors have only been associated with type III secretion
477 systems, it remains possible that *M. hominis* ICE repeat-containing proteins could be
478 transferred through this T4SS, either as free proteins or as proteins bound to DNA. Indeed,
479 T4SS were shown to translocate proteins (effectors), DNA or DNA–protein complexes
480 (Grohmann et al., 2018). The latter case is notably illustrated by the *Agrobacterium*

481 *tumefaciens* VirB/Vir D4 T4SS (Christie, 2016). Further studies are therefore needed to
482 determine whether MhoF and MhoH retain DNA-binding capacity and can be transferred
483 through a T4SS, or if another secretion system is involved, and to identify the targeted
484 nucleotides. In addition, as some TAL RVDs are involved in the recognition of modified
485 nucleotides, such as the canonical NG, which in addition to unmodified thymine binds 5-
486 methylcytosine (Deng et al., 2012), MhoF and MhoH may act together with other ICEHo
487 proteins, such as MhoI and MhoK, which are predicted methyltransferases. The presence of
488 such systems in *M. hominis* may be relevant for its survival, pathogenicity and/or virulence.
489 Interestingly, *M. hominis* was shown to undergo endosymbiosis with *Trichomonas vaginalis*,
490 a human urogenital pathogenic protozoa responsible for sexually transmitted infections. This
491 symbiosis was observed in up to 94% of clinical isolates of *T. vaginalis* (Rappelli et al., 1998;
492 Furnkranz et al., 2018), and it was recently reported that *M. hominis* has an impact on the
493 gene expression of *T. vaginalis* (Furnkranz et al., 2018). As TAL effectors were only reported
494 in bacteria able to live in symbiosis with other organisms, we speculate that ICEHos
495 harboring TAL-like effectors may provide favorable properties to *M. hominis* and/or
496 *T. vaginalis*, to enable survival in their environment.

497 In addition, a conserved motif of 23 aa localized within intrinsically disordered domains
498 (IDRs) was found in several proteins of ICEHo. IDRs are involved in essential cell processes
499 through two basic mechanisms, i.e. the entropic chain mechanism responsible for rapid
500 fluctuations among many alternative conformations and molecular recognition via short
501 recognition elements (Mitic et al., 2018). They were previously described in *M. pneumoniae*
502 (Miyata and Hamaguchi, 2016) and *M. genitalium* (Dunker et al., 2000). It is not surprising to
503 find IDRs in mobile elements, such as ICEHos, because plasmid-encoded proteins were
504 shown to contain considerably more IDRs than chromosome-encoded proteins (Mitic et al.,
505 2018). This motif was only found in a hypothetical protein of *Ca. Mycoplasma girerdii*

(MGM1_3750). *Ca. M. girerdii* is an uncultivated urogenital mycoplasma recently identified in vaginal samples by a metagenomic strategy (Martin et al., 2013). As per *M. hominis*, *Ca. M. girerdii* is tightly associated with *T. vaginalis* (Fettweis et al., 2014). Notably, *T. vaginalis*, *Ca. M. girerdii*, and *M. hominis* are able to co-localize in the vaginal tract (Fettweis et al., 2014), suggesting the possibility of HGT between the two urogenital mycoplasma species.

In conclusion, this study described the presence of ICEs in almost half of all *M. hominis* clinical isolates and these MGEs are unlikely to be associated with the antibiotic resistance *tet(M)* gene. All *M. hominis* ICEs include a specific *M. hominis* module harboring proteins that share common structural features with TAL effectors involved in polynucleotide recognition and signal transduction in symbiotic bacteria. This type of ICE may confer a selective advantage on the bacteria to allow survival in their environment, or transformation to pathogenic status, but further experiments are needed to check their functionality in the *M. hominis* species.

Authors contributions

SP and CB conceived and designed the study. AM, OP and LB performed the research. AM, OP, EDF, PSP, CC, LB and SP analyzed the data. AM, LB and SP wrote the manuscript. EDF, PSP, CC, OP and CB critically revised the manuscript.

Funding

This work was supported by internal funding.

529 **Acknowledgements**

530 We thank Franck Salin from the Bordeaux Functional Genomics Centre for genome
531 assembly.

532

533

534 The English in this document has been checked by at least two professional editors, both
535 native speakers of English. For a certificate, please see:

536 <http://www.textcheck.com/certificate/stqlk8>

537

538

539

540

541

542 **References**

543

- 544 Allen-Daniels, M.J., Serrano, M.G., Pflugner, L.P., Fettweis, J.M., Prestosa, M.A., Koparde, V.N., et al.
545 (2015). Identification of a gene in *Mycoplasma hominis* associated with preterm birth and
546 microbial burden in intraamniotic infection. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 212(6), 779 e771-779
547 e713. doi: 10.1016/j.ajog.2015.01.032.
- 548 Baranowski, E., Dordet-Frisoni, E., Sagne, E., Hygonenq, M.C., Pretre, G., Claverol, S., et al. (2018).
549 The integrative conjugative element (ICE) of *Mycoplasma agalactiae*: key elements involved
550 in horizontal dissemination and influence of coresident ICEs. *mBio* 9(4). doi:
551 10.1128/mBio.00873-18.
- 552 Barre, A., de Daruvar, A., and Blanchard, A. (2004). MolliGen, a database dedicated to the
553 comparative genomics of Mollicutes. *Nucleic Acids Res.* 32, D307-310. doi:
554 10.1093/nar/gkh114.
- 555 Boch, J., and Bonas, U. (2010). Xanthomonas AvrBs3 family-type III effectors: discovery and function.
556 *Annu. Rev. Phytopathol.* 48, 419-436. doi: 10.1146/annurev-phyto-080508-081936.
- 557 Boch, J., Scholze, H., Schornack, S., Landgraf, A., Hahn, S., Kay, S., et al. (2009). Breaking the code of
558 DNA binding specificity of TAL-type III effectors. *Science* 326(5959), 1509-1512. doi:
559 10.1126/science.1178811.
- 560 Bolger, A.M., Lohse, M., and Usadel, B. (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina
561 sequence data. *Bioinformatics* 30(15), 2114-2120. doi: 10.1093/bioinformatics/btu170.
- 562 Breton, M., Tardy, F., Dordet-Frisoni, E., Sagne, E., Mick, V., Renaudin, J., et al. (2012). Distribution
563 and diversity of mycoplasma plasmids: lessons from cryptic genetic elements. *BMC Microbiol.*
564 12, 257. doi: 10.1186/1471-2180-12-257.
- 565 Burrus, V., and Waldor, M.K. (2004). Shaping bacterial genomes with integrative and conjugative
566 elements. *Res Microbiol* 155(5), 376-386. doi: 10.1016/j.resmic.2004.01.012.
- 567 Calcutt, M.J., and Foecking, M.F. (2015a). Analysis of the complete *Mycoplasma hominis* LBD-4
568 genome sequence reveals strain-variable prophage insertion and distinctive repeat-
569 containing surface protein arrangements. *Genome Announc.* 3(1). doi:
570 10.1128/genomeA.01582-14.
- 571 Calcutt, M.J., and Foecking, M.F. (2015b). Complete genome sequence of *Mycoplasma hominis* strain
572 Sprott (ATCC 33131), isolated from a patient with nongonococcal urethritis. *Genome*
573 *Announc.* 3(4). doi: 10.1128/genomeA.00771-15.
- 574 Calcutt, M.J., and Foecking, M.F. (2015c). An excision-competent and exogenous mosaic transposon
575 harbors the tetM gene in multiple *Mycoplasma hominis* lineages. *Antimicrob. Agents Ch.*
576 59(10), 6665-6666. doi: 10.1128/AAC.01382-15.
- 577 Calcutt, M.J., Lewis, M.S., and Wise, K.S. (2002). Molecular genetic analysis of ICEF, an integrative
578 conjugal element that is present as a repetitive sequence in the chromosome of *Mycoplasma*
579 *fermentans* PG18. *J. Bacteriol.* 184(24), 6929-6941.
- 580 Chalker, V.J., Rees, C.L., Bell, O., and Spiller, O.B. (2018). "164 UK *Mycoplasma hominis* AST
581 surveillance 2005-2015: High variation in the genetic components included in *tet(M)*
582 resistance cassette, and three potential therapeutics to combat combined
583 fluoroquinolone/tetracycline resistance.", in: *Abstract retrieved from the: International*
584 *Organization for Mycoplasmaology*. (Portsmouth, New Hampshire USA).
- 585 Christie, P.J. (2016). The mosaic type IV secretion systems. *EcoSal Plus* 7(1). doi:
586 10.1128/ecosalplus.ESP-0020-2015.

- 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. doi: 10.21775/cimb.029.003.
- de Lange, O., Schreiber, T., Schandry, N., Radeck, J., Braun, K.H., Koszinowski, J., et al. (2013). Breaking the DNA-binding code of *Ralstonia solanacearum* TAL effectors provides new possibilities to generate plant resistance genes against bacterial wilt disease. *New Phytol.* 199(3), 773-786. doi: 10.1111/nph.12324.
- Delavat, F., Miyazaki, R., Carraro, N., Pradervand, N., and van der Meer, J.R. (2017). The hidden life of integrative and conjugative elements. *FEMS Microbiol Rev* 41(4), 512-537. doi: 10.1093/femsre/fux008.
- Deng, D., Yin, P., Yan, C., Pan, X., Gong, X., Qi, S., et al. (2012). Recognition of methylated DNA by TAL effectors. *Cell Res.* 22(10), 1502-1504. doi: 10.1038/cr.2012.127.
- Dordet-Frisoni, E., Sagne, E., Baranowski, E., Breton, M., Nouvel, L.X., Blanchard, A., et al. (2014). Chromosomal transfers in mycoplasmas: when minimal genomes go mobile. *mBio* 5(6), e01958. doi: 10.1128/mBio.01958-14.
- Dordet Frisoni, E., Marenda, M.S., Sagne, E., Nouvel, L.X., Guerillot, R., Glaser, P., et al. (2013). ICEA of *Mycoplasma agalactiae*: a new family of self-transmissible integrative elements that confers conjugative properties to the recipient strain. *Mol. Microbiol.* 89(6), 1226-1239. doi: 10.1111/mmi.12341.
- Doyle, E.L., Stoddard, B.L., Voytas, D.F., and Bogdanove, A.J. (2013). TAL effectors: highly adaptable phyto-bacterial virulence factors and readily engineered DNA-targeting proteins. *Trends Cell. Biol.* 23(8), 390-398. doi: 10.1016/j.tcb.2013.04.003.
- Dunker, A.K., Obradovic, Z., Romero, P., Garner, E.C., and Brown, C.J. (2000). Intrinsic protein disorder in complete genomes. *Genome Inform. Ser. Workshop Genome Inform.* 11, 161-171.
- Faucher, M., Nouvel, L.X., Dordet-Frisoni, E., Sagne, E., Baranowski, E., Hygonenq, M.C., et al. (2019). Mycoplasmas under experimental antimicrobial selection: The unpredicted contribution of horizontal chromosomal transfer. *PLoS Genet.* 15(1), e1007910. doi: 10.1371/journal.pgen.1007910.
- Ferandon, 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. doi: 10.1186/1471-2180-13-120.
- Fettweis, J.M., Serrano, M.G., Huang, B., Brooks, J.P., Glascock, A.L., Sheth, N.U., et al. (2014). An emerging mycoplasma associated with trichomoniasis, vaginal infection and disease. *PLoS One* 9(10), e110943. doi: 10.1371/journal.pone.0110943.
- Furnkranz, U., Henrich, B., and Walochnik, J. (2018). *Mycoplasma hominis* impacts gene expression in *Trichomonas vaginalis*. *Parasitol. Res.* 117(3), 841-847. doi: 10.1007/s00436-018-5761-6.
- Glass, J.I., Assad-Garcia, N., Alperovich, N., Yooseph, S., Lewis, M.R., Maruf, M., et al. (2006). Essential genes of a minimal bacterium. *P. Natl. Acad. Sci. U S A* 103(2), 425-430. doi: 10.1073/pnas.0510013103.
- Grohmann, E., Christie, P.J., Waksman, G., and Backert, S. (2018). Type IV secretion in Gram-negative and Gram-positive bacteria. *Mol. Microbiol.* 107(4), 455-471. doi: 10.1111/mmi.13896.
- Guerillot, R., Siguier, P., Goubeyre, E., Chandler, M., and Glaser, P. (2014). The diversity of prokaryotic DDE transposases of the mutator superfamily, insertion specificity, and association with conjugation machineries. *Genome Biol. Evol.* 6(2), 260-272. doi: 10.1093/gbe/evu010.
- Heuer, H., Yin, Y.N., Xue, Q.Y., Smalla, K., and Guo, J.H. (2007). Repeat domain diversity of avrBs3-like genes in *Ralstonia solanacearum* strains and association with host preferences in the field. *Appl. Environ. Microb.* 73(13), 4379-4384. doi: 10.1128/AEM.00367-07.
- Johnson, C.M., and Grossman, A.D. (2015). Integrative and Conjugative Elements (ICEs): What they do and how they work. *Annu. Rev. Genet.* 49, 577-601. doi: 10.1146/annurev-genet-112414-055018.

- Juillerat, A., Bertonati, C., Dubois, G., Guyot, V., Thomas, S., Valton, J., et al. (2014). BurrH: a new modular DNA binding protein for genome engineering. *Sci. Rep-UK* 4, 3831. doi: 10.1038/srep03831.
- Koren, S., Walenz, B.P., Berlin, K., Miller, J.R., Bergman, N.H., and Phillippy, A.M. (2017). Canu: scalable and accurate long-read assembly via adaptive k-mer weighting and repeat separation. *Genome Res.* 27(5), 722-736. doi: 10.1101/gr.215087.116.
- Mak, A.N., Bradley, P., Bogdanove, A.J., and Stoddard, B.L. (2013). TAL effectors: function, structure, engineering and applications. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 23(1), 93-99. doi: 10.1016/j.sbi.2012.11.001.
- Mardassi, B.B., Aissani, N., Moalla, I., Dhahri, D., Dridi, A., and Mlik, B. (2012). Evidence for the predominance of a single *tet(M)* gene sequence type in tetracycline-resistant *Ureaplasma parvum* and *Mycoplasma hominis* isolates from Tunisian patients. *J. Med. Microbiol.* 61(Pt 9), 1254-1261. doi: 10.1099/jmm.0.044016-0.
- Marenda, M. (2014). "Genomic mosaics", in *Mollicutes. Molecular biology and pathogenesis*, eds. G.F. Browning & C. Citti. (Norfolk, UK: Caister Academic Press).
- Marenda, M., Barbe, V., Gourgues, G., Mangenot, S., Sagne, E., and Citti, C. (2006). A new integrative conjugative element occurs in *Mycoplasma agalactiae* as chromosomal and free circular forms. *J. Bacteriol.* 188(11), 4137-4141. doi: 10.1128/JB.00114-06.
- Martin, D.H., Zozaya, M., Lillis, R.A., Myers, L., Nsuami, M.J., and Ferris, M.J. (2013). Unique vaginal microbiota that includes an unknown Mycoplasma-like organism is associated with *Trichomonas vaginalis* infection. *J. Infect. Dis.* 207(12), 1922-1931. doi: 10.1093/infdis/jit100.
- Meygret, A., Le Roy, C., Renaudin, H., Bébéar, 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. Chemoth.* doi: 10.1093/jac/dky238.
- Miller, J.C., Zhang, L., Xia, D.F., Campo, J.J., Ankoudinova, I.V., Guschin, D.Y., et al. (2015). Improved specificity of TALE-based genome editing using an expanded RVD repertoire. *Nat. Methods* 12(5), 465-471. doi: 10.1038/nmeth.3330.
- Mitic, N.S., Malkov, S.N., Kovacevic, J.J., Pavlovic-Lazetic, G.M., and Beljanski, M.V. (2018). Structural disorder of plasmid-encoded proteins in Bacteria and Archaea. *BMC Bioinformatics* 19(1), 158. doi: 10.1186/s12859-018-2158-6.
- Miyata, M., and Hamaguchi, T. (2016). Integrated information and prospects for gliding mechanism of the pathogenic bacterium *Mycoplasma pneumoniae*. *Front. Microbiol.* 7, 960. doi: 10.3389/fmicb.2016.00960.
- Pereira, A.L., Carazzolle, M.F., Abe, V.Y., de Oliveira, M.L., Domingues, M.N., Silva, J.C., et al. (2014). Identification of putative TAL effector targets of the citrus canker pathogens shows functional convergence underlying disease development and defense response. *BMC Genomics* 15, 157. doi: 10.1186/1471-2164-15-157.
- Pereyre, S., Sirand-Pugnet, P., Beven, L., Charron, A., Renaudin, H., Barre, A., et al. (2009). Life on arginine for *Mycoplasma hominis*: clues from its minimal genome and comparison with other human urogenital mycoplasmas. *PLoS Genet.* 5(10), e1000677. doi: 10.1371/journal.pgen.1000677.
- Rappelli, P., Addis, M.F., Carta, F., and Fiori, P.L. (1998). *Mycoplasma hominis* parasitism of *Trichomonas vaginalis*. *Lancet* 352(9136), 1286. doi: 10.1016/S0140-6736(98)00041-5.
- Roberts, M.C., Koutsky, L.A., Holmes, K.K., LeBlanc, D.J., and Kenny, G.E. (1985). Tetracycline-resistant *Mycoplasma hominis* strains contain streptococcal *tetM* sequences. *Antimicrob. Agents. Ch.* 28(1), 141-143.
- Schornack, S., Meyer, A., Romer, P., Jordan, T., and Lahaye, T. (2006). Gene-for-gene-mediated recognition of nuclear-targeted AvrBs3-like bacterial effector proteins. *J. Plant. Physiol.* 163(3), 256-272. doi: 10.1016/j.jplph.2005.12.001.
- Seemann, T. (2014). Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics* 30(14), 2068-2069. doi: 10.1093/bioinformatics/btu153.

- Simpson, J.T., Wong, K., Jackman, S.D., Schein, J.E., Jones, S.J., and Birol, I. (2009). ABySS: a parallel assembler for short read sequence data. *Genome Res.* 19(6), 1117-1123. doi: 10.1101/gr.089532.108.
- Sirand-Pugnet, P., Lartigue, C., Marendza, M., Jacob, D., Barre, A., Barbe, V., et al. (2007). Being pathogenic, plastic, and sexual while living with a nearly minimal bacterial genome. *PLoS Genet.* 3(5), e75. doi: 10.1371/journal.pgen.0030075.
- Stella, S., Molina, R., Bertonatti, C., Juillerrat, A., and Montoya, G. (2014). Expression, purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of the novel modular DNA-binding protein BurrH in its apo form and in complex with its target DNA. *Acta Crystallogr. F Struct. Biol. Commun.* 70(Pt 1), 87-91. doi: 10.1107/S2053230X13033037.
- Tardy, F., Mick, V., Dordet-Frisoni, E., Marendza, M.S., Sirand-Pugnet, P., Blanchard, A., et al. (2015). Integrative conjugative elements are widespread in field isolates of *Mycoplasma* species pathogenic for ruminants. *Appl. Environ. Microb.* 81(5), 1634-1643. doi: 10.1128/AEM.03723-14.
- Thiaucourt, F., Manso-Silvan, L., Salah, W., Barbe, V., Vacherie, B., Jacob, D., et al. (2011). *Mycoplasma mycoides*, from "mycoides Small Colony" to "capri". A microevolutionary perspective. *BMC Genomics* 12, 114. doi: 10.1186/1471-2164-12-114.
- 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. Browning.), 289-354.
- 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. Neonat. M.* 14(4), 190-199. doi: 10.1016/j.siny.2008.11.009.
- Walker, B.J., Abeel, T., Shea, T., Priest, M., Abouelliel, A., Sakthikumar, S., et al. (2014). Pilon: an integrated tool for comprehensive microbial variant detection and genome assembly improvement. *PLoS One* 9(11), e112963. doi: 10.1371/journal.pone.0112963.
- Wise, K.S., Calcutt, M.J., Foecking, M.F., Roske, K., Madupu, R., and Methe, B.A. (2011). Complete genome sequence of *Mycoplasma bovis* type strain PG45 (ATCC 25523). *Infect. Immun.* 79(2), 982-983. doi: 10.1128/IAI.00726-10.
- Woese, C.R., Maniloff, J., and Zablen, L.B. (1980). Phylogenetic analysis of the mycoplasmas. *P. Natl. Acad. Sci. U S A* 77(1), 494-498.
- Yang, J., Zhang, Y., Yuan, P., Zhou, Y., Cai, C., Ren, Q., et al. (2014). Complete decoding of TAL effectors for DNA recognition. *Cell Res.* 24(5), 628-631. doi: 10.1038/cr.2014.19.

724 **Conflict of interest statement**

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

727

728

729 **Tables**730 **Table 1. *M. hominis* strains used for genome sequencing**

Strain	Clinical context	Nature of the sample	Geographic origin	Year of isolation	MLVA type (Ferandon et al., 2013)
M132			Reference strain		10
35	Neonatal fever	Blood culture	Bordeaux	1989	8
331	Psoriatic arthritis	Joint fluid	Bordeaux	1991	15
2674	Mediastinitis	Mediastinal suppuration	Paris	1998	10
3299	Osteoarthritis	Joint fluid	Bordeaux	2002	36
3631	Endometritis	Amniotic liquid	Bordeaux	2004	4
4016	Endometritis	Endometrial biopsy	Lannion	2005	8
4235	Salpingitis	Peritoneal fluid	Bordeaux	2006	10
4788	Vaginosis	Vaginal secretions	Bordeaux	2008	10
5012	Commensal	Semen	Bordeaux	2009	12
5060	Vaginosis	Vaginal secretions	Bordeaux	2009	8
5096	Maternal-foetal infection	Placenta	Bordeaux	2009	15

731

732

733

734

735 **Table 2. Primers used to detect the four ICE backbone CDSs (CDS1, CDS5, CDS17, CDS22) and the specific *M. hominis* ICE module**

736

Forward primers	Sequences of forward primers (5'-3')	Reverse primers	Sequences of reverse primers (5'-3')	Size of PCR product (bp)
CDS1-F cons	TTGAAATAAARGTTTTAGATGRTGAG	CDS1-R cons	CAAACATTTGCAAATATYTA ACTCCA	290
CDS5-F cons	TGAGATTTAGCGGTTGATGGYG	CDS5-R cons	TACTTGRGCTGTTCTTCYC	771
CDS17-F cons	TRAAGCCAAAMAAGCAAAGC	CDS17-R cons	MGCCATTGTYGCTTGTTTCATC	581
CDS22-F cons	TTCAGCTAGAAAATGAYGATGC	CDS22-R cons	RCTRGTTTTAGTGGYTAAGA	146
MhoF cons	TCATCCCATACCCCCTCK	MhoR-cons	TTAAAACGACCGCCTTG GTTG	4000 to 5100

737

738 **Table 3. Comparison of CDSs from *M. hominis* ICEHo 4788 with CDSs from**
739 ***M. fermentans* PG18 ICEF-II and *M. agalactiae* 5632 ICEA-III**
740 Percentages of amino acid identity and similarity were determined using EMBOSS Needle.
741 ICEF-II: second ICE of *M. fermentans* PG18 (Calcutt et al., 2002). ICEA 5632-III: third copy
742 of ICE in *M. agalactiae* 5632 (Marenda et al., 2006). ^aMhoJ is not harbored by *M. hominis*
743 4788, but is harbored by the six other sequenced *M. hominis* strains harboring ICEs.

<i>M. fermentans</i> PG18 ICEF-II							<i>M. agalactiae</i> 5632 ICEA-III				
ICEHo 4788	Size (aa)	Size (aa) of PG18 ICEF-II CDSs	Length of alignment ICEHo 4788 vs ICEF-II	% identity (Nb identical aa/length of alignment)	% similarity (Nb similar aa/length of alignment)	% gaps (Nb gaps /length of alignment)	Size (aa) of 5632 ICEA-III CDSs	Length of alignment ICEHo 4788 vs ICEA 5632-III	% identity (Nb identical aa/length of alignment)	% similarity (Nb similar aa/length of alignment)	% gaps (Nb gaps /length of alignment)
CDS1	263	263	290	32.8 (95/290)	46.9 (136/290)	18.6 (54/290)	264	300	25.3 (76/300)	44.3 (133/300)	24.3 (73/300)
CDS3	413	400	422	37.2 (157/422)	58.3 (246/422)	7.3 (31/422)	none	none	none	none	none
CDS5	766	740	811	35.8 (290/811)	54.3 (440/811)	14.3 (116/811)	670	813	32.7 (266/813)	49.8 (405/813)	23.4 (190/813)
MhoI	335	none	none	none	none	none	none	none	none	none	none
CDS11	252	238	260	30.4 (79/260)	50.4 (131/260)	11.5 (30/260)	221	302	14.9 (45/302)	27.8 (84/302)	43.4 (131/302)
MhoH	266	none	none	none	none	none	none	none	none	none	none
MhoG	102	none	none	none	none	none	none	none	none	none	none
MhoF	328	none	none	none	none	none	none	none	none	none	none
MhoE	63	none	none	none	none	none	none	none	none	none	none
MhoC	169	none	none	none	none	none	none	none	none	none	none
CDS14	562	552	611	24.4 (147/611)	43.4 (261/611)	21.1 (129/611)	525	622	22.8 (142/622)	40.8 (254/622)	25.2 (157/622)
CDS15	120	95	126	25.4 (32/126)	39.7 (50/126)	29.4 (37/126)	121	126	29.4 (37/126)	50.8 (64/126)	8.7 (11/126)
CDS16	400	396	416	27.4 (114/416)	47.1 (196/416)	8.7 (36/416)	357	434	22.4 (97/434)	38.9 (169/434)	25.6 (111/434)
CDS17	927	937	955	39.8 (380/955)	59.1 (564/955)	4.8 (46/955)	928	950	40.2 (382/950)	60.0 (570/950)	4.7 (45/950)
CDS18	260	227	281	24.9 (70/281)	45.6 (128/281)	26.7 (75/281)	none	none	none	none	none
CDS12	130	183	195	26.2 (51/195)	39.0 (76/195)	39.5 (77/195)	134	142	24.6 (35/142)	50.0 (71/142)	14.1 (20/142)
CDS19	1434	1424	1566	28.0	45.0 (704/1566)	17.5	1517	1720	24.8	39.1 (673/1720)	28.4 (489/1720)
MhoK	363	none	none	none	none	none	none	none	none	none	none
MhoA	232	none	none	none	none	none	none	none	none	none	none
CDS21	286	313	325	56.6 (184/325)	65.2 (212/325)	15.7 (51/325)	none	none	none	none	none
CDS22	396	390	427	23.2 (99/427)	36.3 (155/427)	34 (145/427)	378	412	23.8 (98/412)	36.4 (150/412)	30.8 (127/412)
MhoJ ^a	464	none	none	none	none	none	none	none	none	none	none

Specific <i>M. hominis</i> ICE CDSs	ICEHo CDS size (aa)	NCBI best Blast hit ^a	Organism	E-value ^a	% coverage ^a	% identity ^a	Best Blast hit size (aa)	Length of alignment ^b (aa)	% identity vs. best Blast hit ^b	% similarity vs. best Blast hit ^b	% gaps vs. best Blast hit ^b
MhoI	335	DNA cytosine methyltransferase	<i>Ureaplasma parvum</i>	1e-129	59	92.5	200	335	55.2 (185/335)	56.7 (190/335)	40.3 (135/335)
MhoH	266	Hypothetical	<i>Finegoldia magna</i>	6e-44	81	46	300	336	33.0 (111/336)	45.8 (154/336)	31.5 (106/336)
MhoG	102	Hypothetical	<i>Ca. Mycoplasma girerdii</i>	4e-8	35	78	179	190	23.2 (44/190)	32.1 (61/190)	52.1 (99/190)
MhoF	328	Hypothetical	<i>Finegoldia magna</i>	3e-53	90	41	300	366	34.4 (126/366)	48.9 (179/366)	28.4 (104/366)
MhoE	63	Hypothetical	<i>Mycoplasma fermentans</i>	7e-13	95	52	60	63	49.2 (31/63)	71.4 (45/63)	4.8 (3/63)
MhoC	169	Phage protein	<i>Mycoplasma hyorhinis</i>	3e-53	97	50	223	223	37.2 (83/223)	52.9 (118/223)	24.2 (54/223)
MhoK	363	Site-specificDNA methyltransferase	<i>Ureaplasma parvum</i>	0	100	97	363	363	96.7 (351/363)	98.1 (356/363)	0 (0/363)
MhoA	232	Hypothetical	<i>Ureaplasma parvum</i>	5e-158	99	96	264	264	83.7 (221/264)	86.7 (229/264)	12.1 (32/264)
MhoJ ^c	464	Hypothetical	<i>Ca. Mycoplasma girerdii</i>	4e-43	50	66	179	472	25.6 (121/472)	30.5 (144/472)	63.8 (301/472)

747 ^a Determined using BLAST.

748 ^b Percentages of amino-acid identity and similarity with the NCBI best BLAST hits were determined using EMBOSS Needle.

749 ^c MhoJ is not harbored by *M. hominis* 4788 but is harbored by the six other sequenced *M. hominis* strains harboring ICEs.

750

751

752 **Table 5. Phyre2 models for ICEHo 4788 proteins**

753 Only models of proteins for which coverage was higher than 120 amino acids, associated with
 754 a confidence higher than 95%, are listed.

ICEHo 4788		Phyre 2 top hit template			
CDS	Template	Chain information	Organism	% Coverage (number of aa)	% Confidence
CDS3	c4lvjA	MobM relaxase domain	<i>Streptococcus agalactiae</i>	31 (126)	97.6
CDS5	d1eçRa	RecA protein like (ATPase domain)	<i>Escherichia coli</i>	51 (392)	100
MhoI	d2c7pa1	C5 cytosine DNA methyltransferase DCM	<i>Haemophilus haemolyticus</i>	95 (319)	100
MhoH-1	c4cj9A	DNA binding protein BurrH	<i>Burkholderia rhizoxinica</i>	97 (262)	100
MhoH-2	c3UGmA	TAL effector PthXo1	<i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>	95 (253)	100
MhoF	c3UGmA	TAL effector PthXo1	<i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>	98 (322)	100
MhoC	c1aqjB	N6 adenine DNA methyltransferase TaqI	<i>Thermus aquaticus</i>	72 (121)	99.6
CDS17	c4ag5a	Type IV secretory pathway component VirB4	<i>Thermoanaerobacter pseudethanolicus</i>	40 (373)	100
CDS12	c1qvcA	Single stranded DNA binding Protein 2	<i>Escherichia coli</i>	95 (123)	100
MhoK	d1G60A	S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferase	<i>Moraxella bovis</i>	64 (233)	100

755

756

757

758 **Table 6. Distribution of the four ICE backbone CDSs and the specific *M. hominis* ICE**
 759 **module in 120 clinical isolates of *M. hominis***

760 CDSs and the specific *M. hominis* ICE module were either detected (dark cells) or not
 761 detected (white cells).

CDS profiles				120 <i>M. hominis</i> clinical isolates % (<i>n</i>)	Presence of the specific <i>M. hominis</i> ICE module % (<i>n</i>) per CDS profile
CDS1	CDS5	CDS17	CDS22		
				45 (54)	100 (54)
				35 (42)	0 (0)
				10 (12)	0 (0)
				6.7 (8)	37.5 (3)
				2.5 (3)	100 (3)
				0.8 (1)	0 (0)

762

763

764

765 **Figure legends**

766 **Figure 1. Genetic organization of integrative and conjugative elements (ICEs) from *M.***
767 ***hominis*, *M. agalactiae*, and *M. fermentans*.** (A) Comparison of ICEs present in *M. hominis*
768 4788 (ICEHo 4788), *M. agalactiae* 5632 (ICEA-III), and *M. fermentans* PG18 (ICEF-II). (B)
769 Genetic organisation of the specific *M. hominis* ICE module in the ICEHos of the seven
770 sequenced *M. hominis* strains harboring complete ICEHos.

771 ICEs are designated according to their originally proposed names. *M. hominis* ICEs are
772 designated with same number as the *M. hominis* strain from which they are originated from
773 (e.g. ICEHo 4788 is from *M. hominis* 4788 strain). Arrows represent coding sequences
774 (CDSs), hatched arrows represent pseudogenes. Homologous CDSs are identified by the same
775 color and same number or letter underneath, using previously described nomenclature. ICEHo
776 4788 CDSs that had no homology with CDSs reported previously in mycoplasma ICEs
777 (MICEs) were designated as Mho plus a letter (MhoA to MhoK).

778 **Figure 2. Chromosomal and extrachromosomal circular forms of ICEHo.** (A) Schematic
779 representation of the chromosomal loci containing ICEHos in the five sequenced *M. hominis*
780 strains harboring ICEHos able to circularize. The chromosomal ICEs possess two imperfect
781 inverted repeats (IRs, represented by a grey triangle) at each end that are flanked by two 8-bp
782 direct repeats (DRs, represented by a black rectangle). (B) Extrachromosomal ICEHo circular
783 forms with details of the 6-bp coupling sequences. Excision and circularization from the *M.*
784 *hominis* donor chromosome resulted in a free circular form, in which the junction contains a
785 6-bp coupling region. This coupling region corresponds to a juxtaposition of the DRs flanking
786 the ICEHo.

787 **Figure 3: (A) Predicted structure for MhoF (residues 2–323) modelled using Phyre2.**
788 Variable residues (putative repeat variable di-residue [RVD]) at positions 10 and 11 of each
789 repeat (i.e. at positions 12 and 13 of the double helix) are shown in red (balls and sticks
790 representation). **(B) Repeated sequences in MhoF and MhoH sequences.** The repeated
791 sequences identified using the RADAR algorithm were further refined using Phyre2
792 alignments. Repeats were aligned using Clustal Omega. Amino acids (aa) with similar
793 physicochemical properties are shown in the same color: red, small and hydrophobic aa; blue,
794 acidic aa; magenta, basic aa; green, hydroxyl, sulfhydryl, and amine aa; grey, unusual/imino
795 acids.

796 The two residues of the double helix that are not repeated are indicated in black. Most
797 variable di-residues within MhoF repeats, and corresponding di-residues in MhoH, are shown
798 in boxes. *Conserved residues among repeats for each protein without taking into account the
799 truncated repeats. The multilevel consensus sequence was identified using MEME software.

800 **Figure S1. Genetic organisation of ICEHos in seven fully sequenced strains of *M.***
801 ***hominis*.** Homologous CDSs are indicated by the same color and the same numbers using the
802 previously described nomenclature of ICE CDSs. MhoA, MhoC, MhoD, MhoE, MhoF,
803 MhoG, MhoH, MhoI, MhoJ, and MhoK are *M. hominis* ICE CDSs that have not been
804 reported in other MICEs. CDSs harboring chopped color represent pseudogenes.

805 **Figure S2. Southern blotting analysis of the seven fully sequenced *M. hominis* strains**
806 **harboring complete ICEHos.** (A) Genomic DNA digested with *EcoRV* and probed with
807 digoxigenin-labelled CDS1 gene probe. (B) Genomic DNA digested with *EcoRV* and probed
808 with digoxigenin-labelled CDS22 gene probe. Dots indicate the fragment displaying the
809 expected size and corresponding to the ICEHos described in this study.

810 **Figure S3: Genomic locations of ICEHo insertion sites in the seven *M. hominis* strains**
811 **harboring complete ICEHos.** HP, hypothetical protein; CHP, conserved hypothetical
812 protein.

813 **Figure S4: Prediction of disordered domains and phosphorylated serine, threonine, and**
814 **tyrosine residues in MhoF from ICEHo 4788.** Prediction of disordered domains was
815 performed using IsUnstruct, and prediction of phosphorylated serine, threonine, and tyrosine
816 residues using DEPP server. Stars indicate predicted phosphorylation sites. Amino acids in
817 red represent predicted disordered domains. The conserved 23-aa sequence is shown in bold.

818

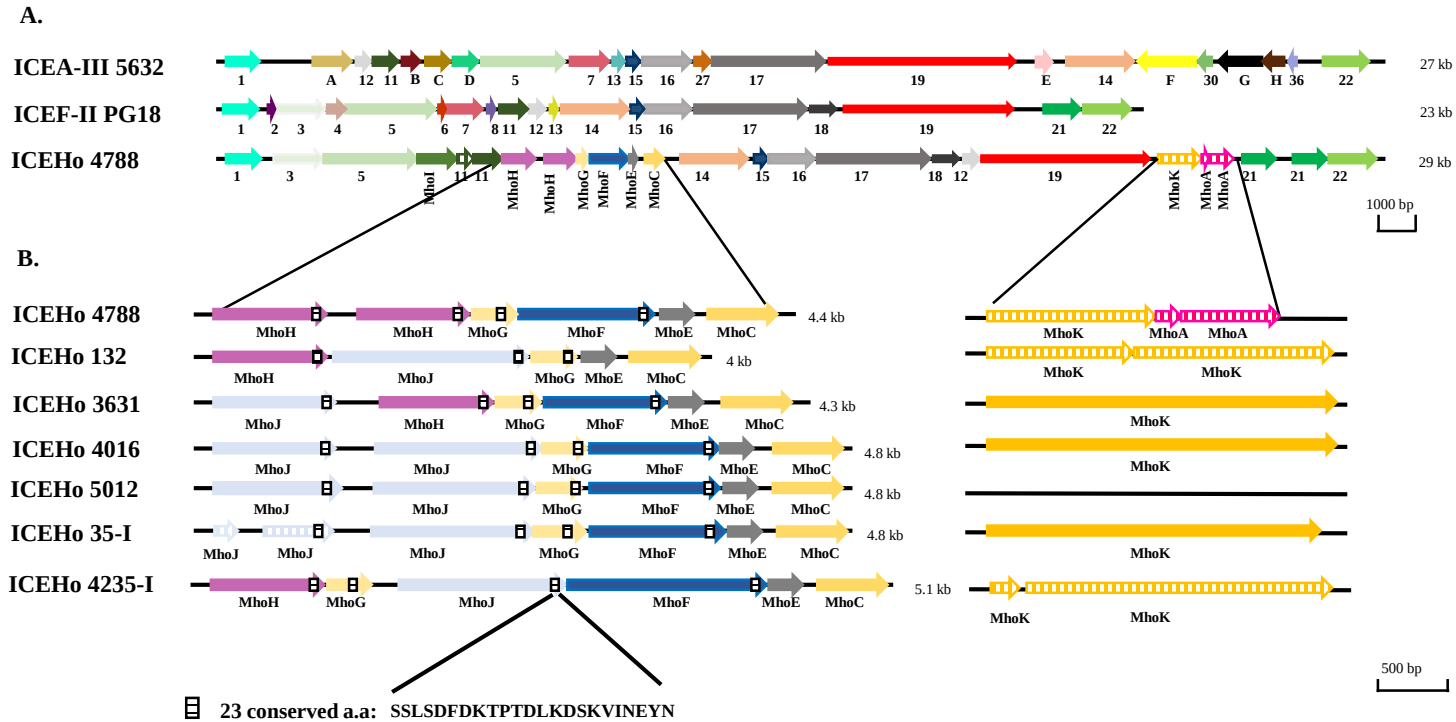


Figure 1. Genetic organization of integrative and conjugative elements (ICEs) from *M. hominis*, *M. agalactiae*, and *M. fermentans*.

A) Comparison of ICEs present in *M. hominis* 4788 (ICEHo 4788), *M. agalactiae* 5632 (ICEA-III), and *M. fermentans* PG18 (ICEF-II).

B) Genetic organisation of the specific *M. hominis* ICE module in the ICEHos of the seven sequenced *M. hominis* strains harboring complete ICEHos. ICEs are designated according to their originally proposed names. Arrows represent coding sequences (CDSs), hatched arrows represent pseudogenes. Homologous CDSs are identified by the same color and same number or letter underneath, using previously described nomenclature. ICEHo 4788 CDSs that had no homology with CDSs reported previously in mycoplasma ICEs (MICEs) were designated as Mho plus a letter (MhoA to MhoK).

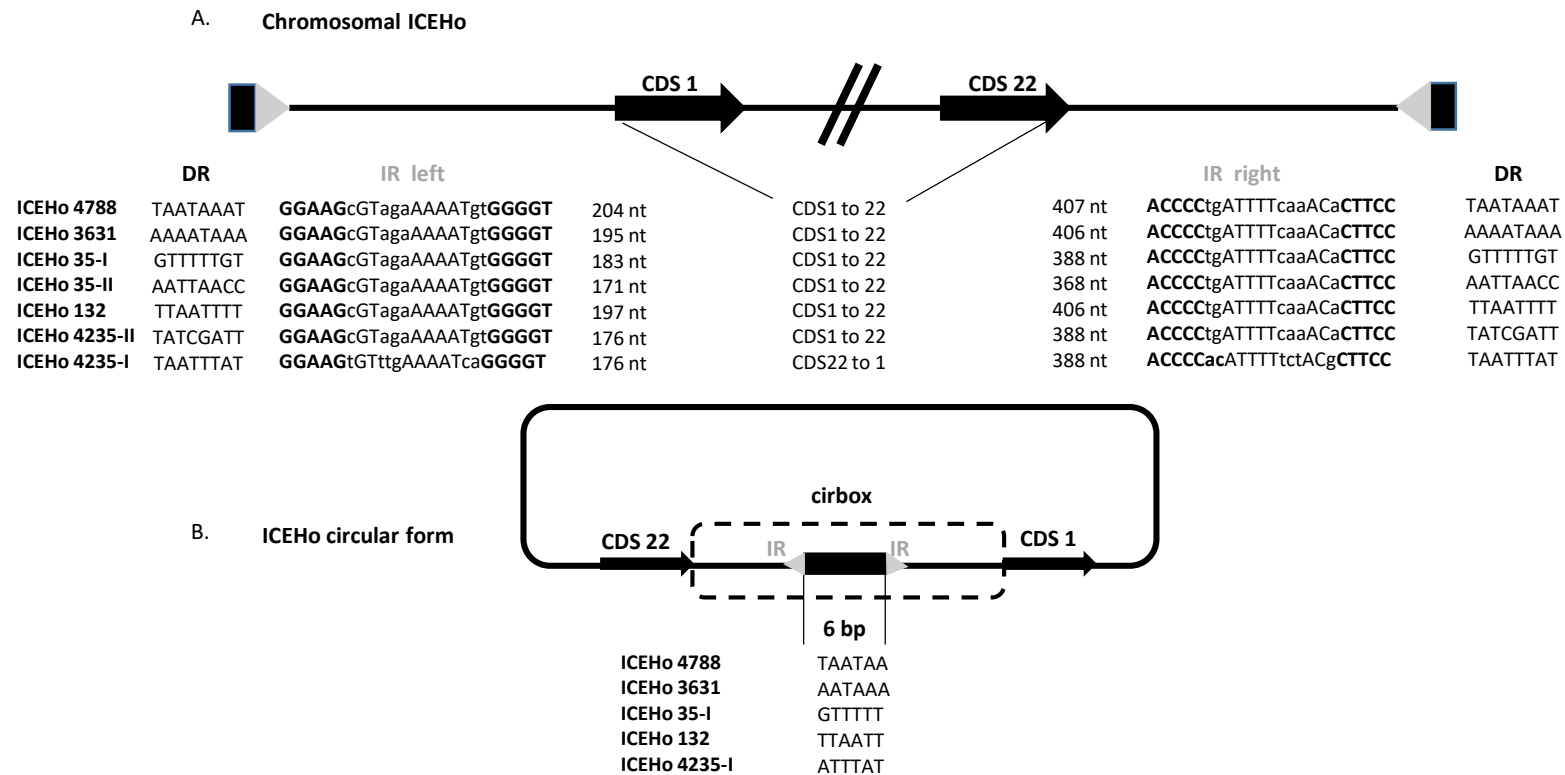


Figure 2. Chromosomal and extrachromosomal circular forms of ICEH.

(A) Schematic representation of the chromosomal loci containing ICEHos in the five sequenced *M. hominis* strains harboring ICEHos able to circularize. The chromosomal ICEs possess two imperfect inverted repeats (IRs, represented by a grey triangle) at each end that are flanked by two 8-bp direct repeats (DRs, represented by a black rectangle). (B) Extrachromosomal ICEHo circular forms with details of the 6-bp coupling sequences. Excision and circularization from the *M. hominis* donor chromosome resulted in a free circular form, in which the junction contains a 6-bp coupling region. This coupling region corresponds to a juxtaposition of the DRs flanking the ICEHo.

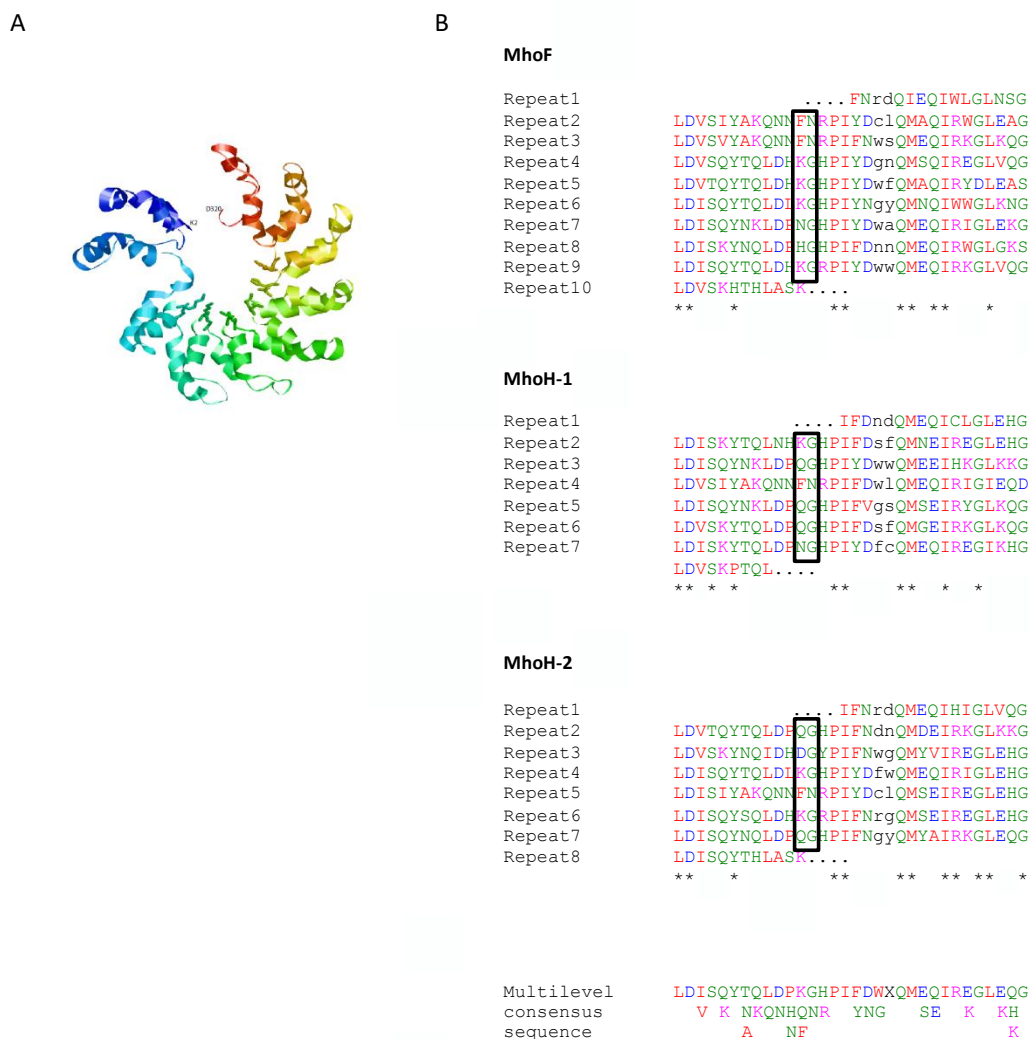


Figure 3: (A) Predicted structure for MhoF (residues 2–320) modelled using Phyre2. Variable residues (putative repeat variable di-residue [RVD]) at positions 12 and 13 of the double helix are shown using balls and sticks representation. **(B) Repeated sequences in MhoF and MhoH sequences.** The repeated sequences identified using the RADAR algorithm were further refined using Phyre2 alignments. Repeats were aligned using Clustal Omega. Amino acids (aa) with similar physicochemical properties are shown in the same color: red, small and hydrophobic aa; blue, acidic aa; magenta, basic aa; green, hydroxyl, sulfhydryl, and amine aa.

The two residues of the double helix that are not repeated are indicated in black. Most variable di-residues within MhoF repeats, and corresponding di-residues in MhoH, are shown in boxes. *Conserved residues among repeats for each protein without taking into account the truncated repeats. The multilevel consensus sequence was identified using MEME software.

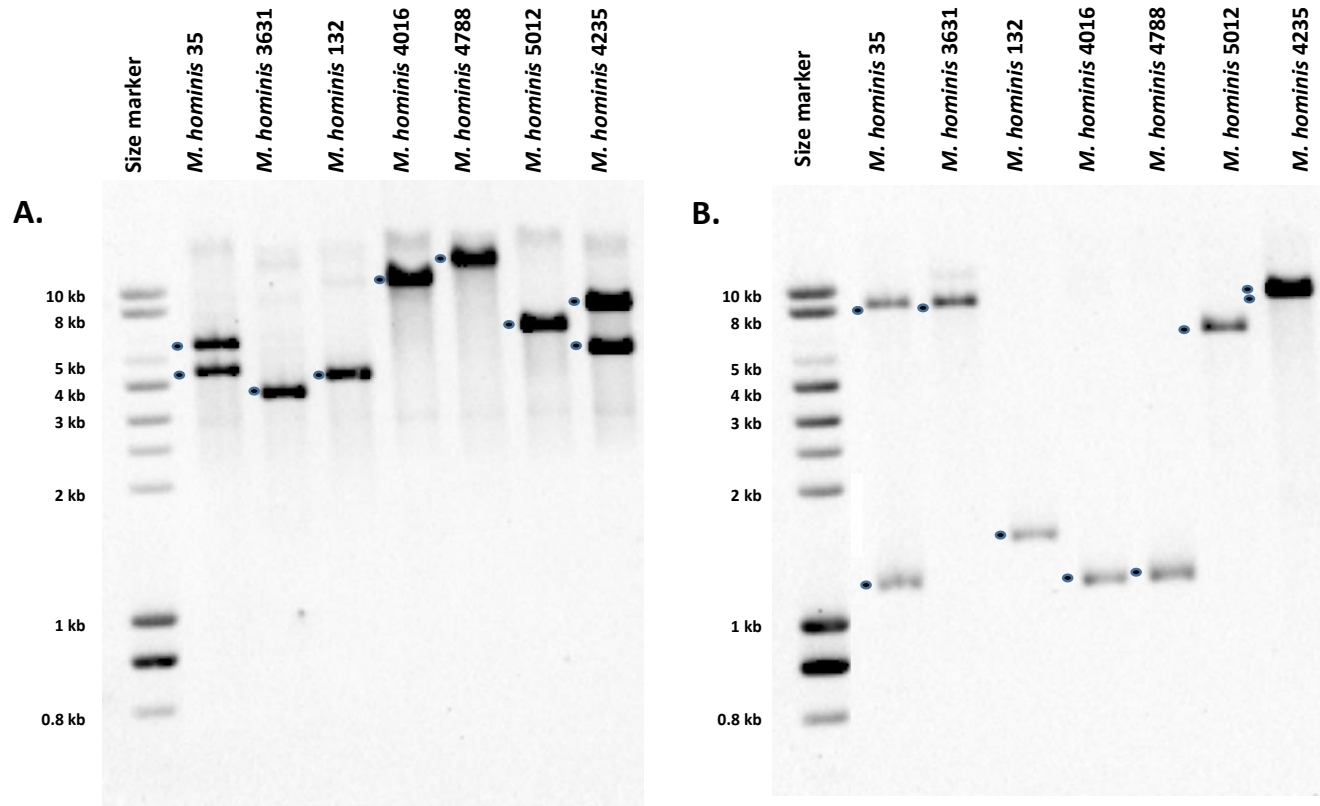


Figure S2. Southern blotting analysis of the seven fully sequenced *M. hominis* strains harboring complete ICEHos.

(A) Genomic DNA digested with *EcoRV* and probed with digoxigenin-labelled CDS1 gene probe.

(B) Genomic DNA digested with *EcoRV* and probed with digoxigenin-labelled CDS22 gene probe. Dots indicate the fragment displaying the expected size and corresponding to the ICEHs described in this study.

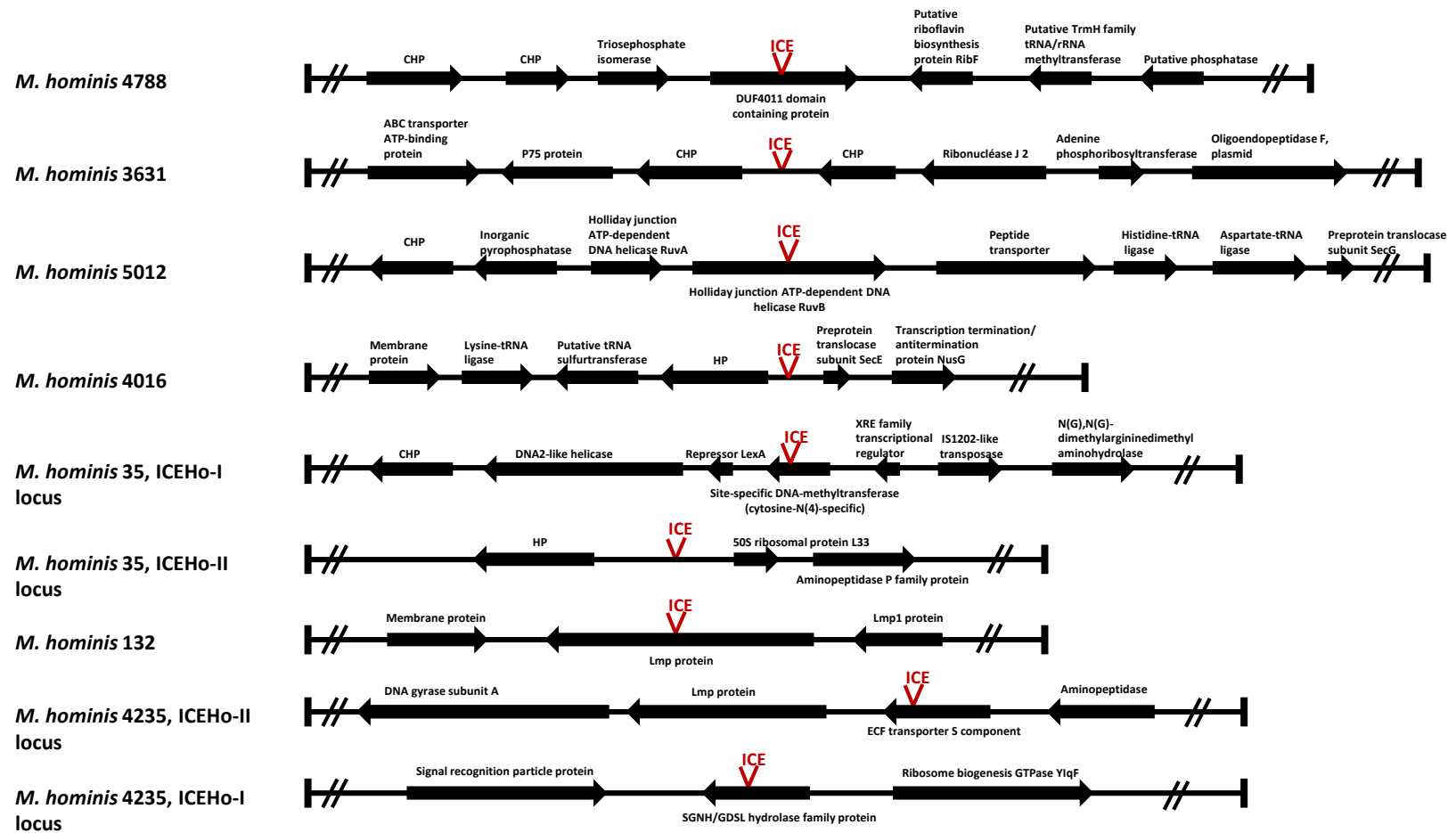


Figure S3: Genomic locations of ICEH insertion sites in the seven *M. hominis* strains harboring complete ICEHos.

HP, hypothetical protein; CHP, conserved hypothetical protein.

Table S1. Oligonucleotides used for the detection of extrachromosomal ICE circular forms

Forward primers	Sequences of forward primers (5'-3')	Reverse primers	Sequences of reverse primers (5'-3')
35-F-circu	GAATGGTTGGATTTCACTCTGG	35-R-circu	AGCTGTGTGTTTGGCTCTTC
4016-F-circu	CCCTTGTTTGCTAATGCTACTC	4016-R-circu	GCTGGGAGCCATTTATTACTG
5012-F-circu	GAATGGTTGGATTTCACTCTGG	5012-R-circu	TTAGCCTCTTGCTGCATTACC
132-F-circu	TCCCTTGTTTGCTAATGCTACG	132-R-circu	TTTAGCCTCTTGCTGCATTACC
4788-F-circu	GAATGGTTGGATTTCACTCTGG	4788-R-circu	GCATCCACAAGGCTATAATCG
3631-F-circu	TTCCGTGGTTCTTCCTTTGC	3631-R-circu	TAGCCTCTTGCTGCATTACC
4235-F-circu	CTTTGCCCTATTCAAGGGTG	4235-R-circu	TAGCCTCTTGCTGCATTACC

Table S2. Comparison of CDSs from *M. hominis* ICEHo 4788 with CDSs from *M. fermentans* PG18 ICEF-II and *M. agalactiae* 5632 ICEA-III using BLAST.

<i>M. fermentans</i> PG18 ICEF-II						<i>M. agalactiae</i> 5632 ICEA-III			
ICEHo 4788		Size (aa) of PG18 ICEF-II CDSs	% coverage	% identity	E-value	Size (aa) of 5632 ICEA-III CDSs	% coverage	% identity	E-value
CDS	Size (aa)								
CDS1	263	263	100	35.71	5e-38	264	71	30.99	3e-9
CDS3	413	400	98	37.56	1e-87	none	none	none	none
CDS5	766	740	64	44.75	3e-135	670	69	42.11	3e-130
CDS11	252	238	78	32.67	6e-25	221	9	30.43	0.37
CDS14	562	552	82	23.75	5e-19	525	97	21.63	1e-13
CDS15	120	95	45	44.74	1e-9	121	76	32.29	1e-14
CDS16	400	396	90	29.49	2e-36	357	67	25.68	1e-18
CDS17	927	937	98	40.04	0	928	99	40.26	0
CDS18	260	227	93	34.66	2e-39	none	none	none	none
CDS12	130	183	91	40.50	7e-24	134	65	31.03	3e-8
CDS19	1434	1424	73	31.83	2e-134	1517	76	30.97	5e-81
CDS21	286	313	88	68.50	6e-110	none	none	none	none
CDS22	396	390	77	34.98	1e-28	378	80	32.96	2e-34

CONCLUSION ET DISCUSSION

CONCLUSION ET DISCUSSION

L'objectif majeur de ma thèse consistait en la mise en évidence et la caractérisation des ICEs chez *M. hominis*, qui jusqu'alors n'avaient jamais été décrit. Au cours de ce travail, nous avons, grâce à une approche reposant sur la biologie moléculaire et la bio-informatique, réussi à mettre en évidence ces ICEs et à caractériser leur organisation architecturale commune avec celle des ICEs déjà décrits dans d'autres espèces de mycoplasmes¹⁹⁰. L'originalité des ICEs présents chez *M. hominis* réside dans la présence d'un nouveau module composé de cinq ou six CDSs, qui est spécifique de l'espèce *M. hominis*, et dont certaines protéines ont des homologies avec un effecteur TAL. L'hypothèse selon laquelle ce dernier pourrait jouer un rôle chez *M. hominis* et/ou *T. vaginalis* lors de leur symbiose est posée. De plus, la prévalence élevée des ICEs retrouvés dans notre collection de souches cliniques (45%) suggère que ces ICEs pourraient conférer un avantage sélectif pour la physiologie ou la pathogénicité de cette bactérie pathogène humaine.

La suite logique de cette étude est de **savoir si ces ICEs sont fonctionnels c'est à dire s'ils sont capables de conjuguer**. Des expériences de conjugaison doivent donc être tentées en premier lieu. Une première étape indispensable au phénomène de conjugaison est la formation d'un intermédiaire circulaire due à l'excision de l'ICE du chromosome. Au cours de notre étude, nous avons pu mettre en évidence la circularisation d'ICEs chez cinq souches de *M. hominis* (souches 4888, 3631, 35, 132 et 4235) parmi les douze séquencées. Ces souches seront ainsi des souches d'intérêt pour les essais de conjugaison. Les différentes stratégies de conjugaison, la méthodologie et nos premiers résultats sont présentés ci-dessous ainsi que nos projets pour obtenir des souches mieux adaptées aux expériences de conjugaison.

Secondairement, **nous envisageons de vérifier si les protéines de l'ICE sont exprimées et souhaitons tenter de les localiser et mettre en évidence leur fonction**. Des études de protéomique sont donc envisagées.

Objectifs des expériences de conjugaison

Pour effectuer des expériences de conjugaison idéales, nous devons disposer d'une souche donneuse de *M. hominis*, porteuse d'un ICE lui-même marqué avec un gène résistance à un antibiotique, par exemple le gène *tet(M)* de résistance à la tétracycline, habituellement utilisé comme marqueur chez les mycoplasmes. Nous devons aussi utiliser une souche receveuse de *M. hominis* dépourvue d'ICE et possédant un marqueur de résistance à un antibiotique différent (**Figure 19**). Les transconjugants seront ainsi sélectionnés sur la base d'une double résistance aux deux antibiotiques.

Comme souche receveuse, nous disposons au laboratoire d'une souche dérivée de la souche de référence *M. hominis* PG21 (ATCC 23114) qui ne possède pas d'ICE²⁷ et qui a acquis par sélection *in vitro* en présence de fluoroquinolone une résistance à l'ofloxacin (CMI : 64µg/ml) et à la ciprofloxacine (CMI : 64 µg/ml)¹⁹⁸. Elle est dénommée souche *M. hominis* 74 (ou mutant IIS1B¹⁹⁸). La résistance aux fluoroquinolones chez cette souche a été précédemment caractérisée¹⁹⁸ et est reliée à la présence d'une mutation dans la protéine GyrA (Ser83Leu) et dans la protéine ParC (Glu84Lys).

Concernant la souche donneuse, aucune des cinq souches de *M. hominis* séquencées et porteuses d'ICEs capables de circularisation ne peut servir de donneur car aucune ne possède de gène *tet(M)* inséré dans l'ICE. Un essai de transformation des souches *M. hominis* 4888, 3631, 35, 132 et 4235 a été réalisé au laboratoire avec le protocole décrit lors de la thèse de Fabien Rideau^{199,200} mais n'a pas permis d'obtenir de telles souches pour l'instant. La manipulation idéale ne peut donc pas être réalisée à ce jour.

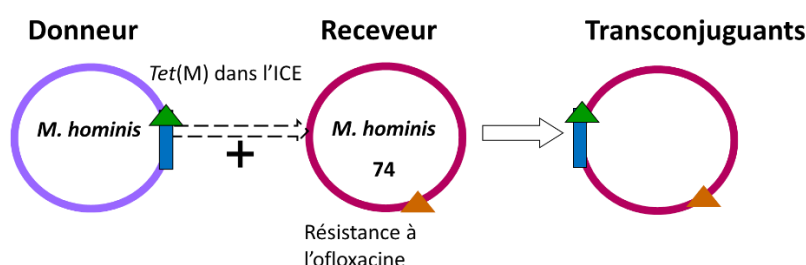


Figure 19 : Expérience de transfert conjugatif idéale au sein de l'espèce *M. hominis*. Rectangle bleu, ICE. Triangle vert, gène *tet(M)* de résistance aux tétracyclines. Triangle orange, mutation associée à la résistance aux fluoroquinolones. Souche *M. hominis* 74 caractérisée dans Bébér et al. 1998¹⁹⁸.

Par conséquent, nous nous sommes d'abord dirigés vers la réalisation **d'expériences de conjugaison inter-espèces** avec *M. agalactiae*, espèce animale phylogénétiquement proche de *M. hominis* et capable de conjugaison². En effet, il a été montré que des transferts conjuguatifs sont possibles entre deux espèces de mycoplasmes différents, par exemple entre *M. agalactiae* et *M. bovis* ou entre *M. agalactiae* et *M. capricolum* subsp. *capricoulum* (C. Citti et E. Dordet-Frisoni, données non publiées). En collaboration avec les Dr Christine Citti et Emilie Dordet-Frisoni de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, nous avons utilisé comme donneur la souche *M. agalactiae* 5632 qui possède trois ICEs, dont un précédemment transformé avec le plasmide pMT85 porteur du gène de résistance à la gentamicine *aacA-aphD*² (**Figure 20**). Comme souche receveuse, nous disposons d'une souche clinique de *M. hominis* issue de la collection établie dans le chapitre 1, chez laquelle aucun des CDSs caractéristiques d'ICE ni le module spécifique retrouvé dans les ICEs de *M. hominis* n'a pu être détecté par PCR. Cette souche dénommée *M. hominis* 6227 possède le gène de résistance à la tétracycline *tet(M)* (**Figure 20**). Au terme de cette conjugaison, la double sélection par gentamicine et tétracycline doit nous permettre de récupérer soit la souche receveuse 6227 qui aurait intégré l'ICE marqué, soit la souche donneuse 5632 qui aurait intégré le transposon portant le gène *tet(M)* de résistance à la tétracycline (**Figure 20**).

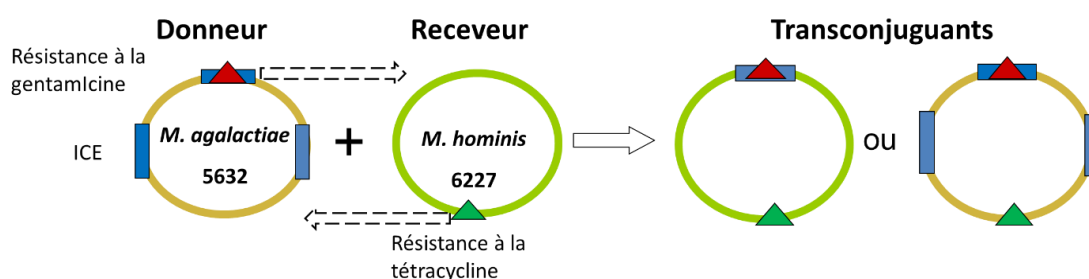


Figure 20 : Expériences de transfert conjuguatif entre différentes espèces proches phylogénétiquement (*M. hominis* et *M. agalactiae*). Rectangles bleus, ICEs. Triangle rouge, gène *aacA-aphD* de résistance à la gentamicine. Triangle vert, gène *tet(M)* de résistance aux tétracyclines.

Enfin, il a aussi été montré chez *M. agalactiae* l'existence de transferts chromosomiques dans la direction opposée à celle de l'ICE, c'est à dire de la cellule sans ICE vers la cellule avec ICE, de manière indépendante des mouvements de l'ICE¹⁹⁵. Ceci nous a permis d'envisager également des **expériences de conjugaison au sein de l'espèce *M. hominis***, malgré l'absence de souche de *M. hominis* marquée dans l'ICE. Les essais de transformation menés au laboratoire sur la souche *M. hominis* 132, nous ont permis de disposer d'un clone nommé 22-4 ayant intégré le gène *tet*(M) dans le gène d'une adénosine déaminase situé hors de l'ICE^{199,200}. En utilisant ce clone, le transfert d'ICE ne pourra pas être mis en évidence car l'ICE n'est pas marqué (**Figure 21**). Cependant, en utilisant la souche *M. hominis* 74 résistante à l'ofloxacine comme souche receveuse, s'il se produit le même phénomène que chez *M. agalactiae*²⁰¹, nous pouvons espérer obtenir une cellule issue de la souche donneuse possédant une double résistance à la tétracycline et à l'ofloxacine (**Figure 21**).

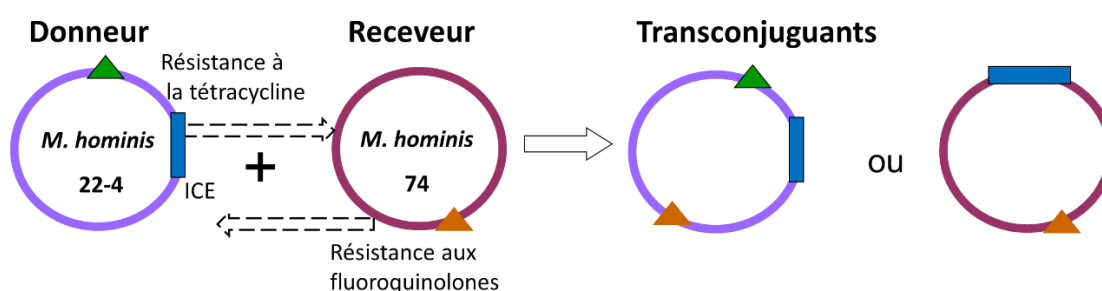


Figure 21 : Expériences de transfert conjugal réalisables au sein de l'espèce *M. hominis*. Rectangle bleu, ICE. Triangle vert, gène *tet*(M) de résistance aux tétracyclines. Triangle orange, mutation associée à la résistance aux fluoroquinolones. Souche *M. hominis* 74 caractérisée dans Bébéar *et al.* 1998¹⁹⁸.

Mise en place du protocole de conjugaison

Nous avons mis au point un protocole de conjugaison, représenté sur la **Figure 22**, dérivé de celui utilisé chez *M. agalactiae*². Le protocole de conjugaison consistait en la mise en culture dans 2 ml de milieu Hayflick arginine (HA)⁷⁰ d'une souche donneuse et d'une souche receveuse pendant 6h à 37°C. Une numération en milieu liquide grâce à des dilutions en série de 10⁻¹ à 10⁻⁹ étaient alors réalisées ainsi que le dépôt de 10 µl de chaque dilution sur une gélose HA pour disposer aussi d'une numération en milieu solide (**Figure 23**). Ces numérations sont incubées avant lecture 5j à 37°C sous 5% de CO₂ pour les milieux solides mais sans CO₂ pour les milieux liquides.

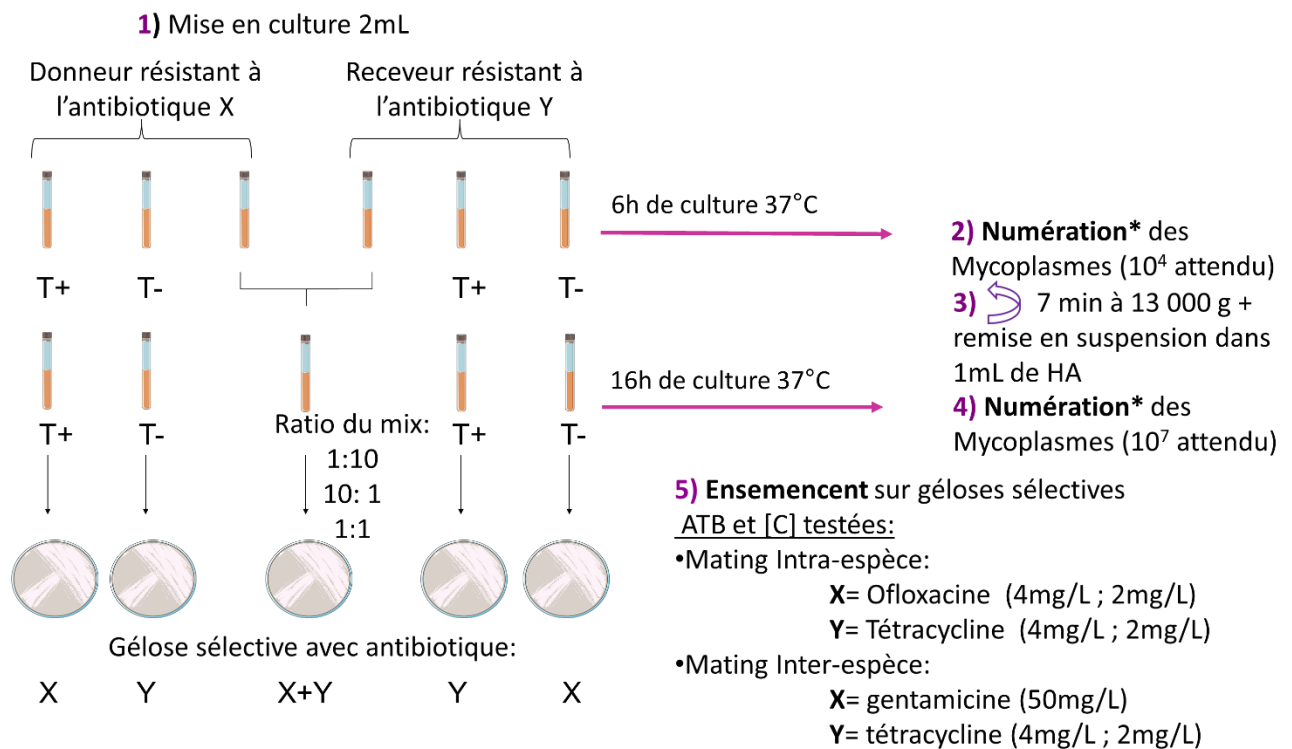


Figure 22 : Protocole de conjugaison mis en place au laboratoire. T+, témoin positif, par exemple ensemencement de la souche résistante à l'antibiotique X sur une gélose contenant l'antibiotique X. T-, témoin négatif, par exemple ensemencement de la souche résistante à l'antibiotique X sur une gélose contenant l'antibiotique Y.

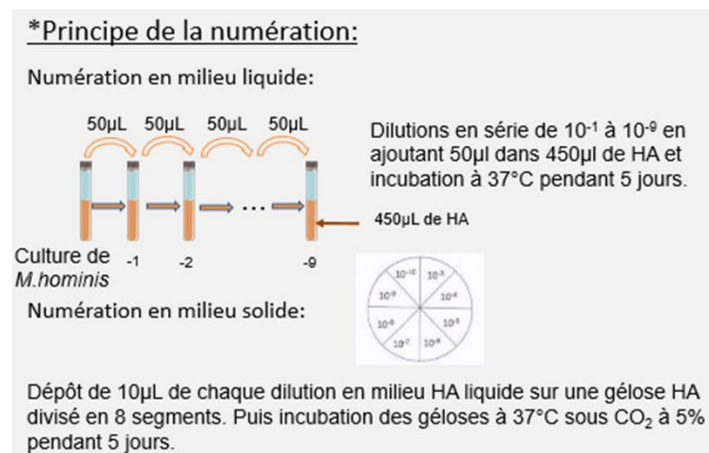


Figure 23: Principe de la numération en milieu liquide et solide.

A l'issue des 6h d'incubation, un mélange entre la souche donneuse et la souche receveuse était effectué. Différents ratios de mélange ont été testés, soit dans un rapport de volume de 1 donneur pour 1 receveur soit dans un rapport de 1 donneur pour 10 receveur ou inversement. Le mélange était alors centrifugé puis remis en suspension dans 1 ml de HA avant d'être remis en incubation à 37°C pour une durée de 16 h. A la fin de la période d'incubation, de nouvelles numérations liquides et solides étaient effectuées avant dépôt du mélange sur des géloses contenant deux antibiotiques. Ces géloses étaient gardées 1 mois avec des lectures hebdomadaires pour surveiller l'apparition de conjugants résistants aux deux antibiotiques. Systématiquement, les expériences de conjugaison ont été associées à la réalisation en parallèle d'un témoin positif (ensemencement de la souche résistante à l'antibiotique X sur une gélose contenant l'antibiotique X) et d'un témoin négatif (ensemencement de la souche résistante à l'antibiotique X sur une gélose contenant l'antibiotique Y) (**Figure 22**). Différentes concentrations d'antibiotique dans les géloses doublement sélectives ont été testées.

L'analyse des colonies des potentiels transconjugants s'effectuait par une mise en culture systématique en milieu HA liquide contenant les deux antibiotiques adaptés à l'expérience de conjugaison réalisée. Si les colonies repiquées en milieu liquide doublement sélectif arrivaient à repousser, une extraction d'ADN était systématiquement réalisée grâce au kit Nucleospin tissue (Marcherey-Nagel) et des PCR spécifiques étaient réalisées pour identifier le potentiel transconjugant en fonction de l'expérience réalisée. En effet, nous disposons d'amorces spécifiques du gène *tet(M)*, nommés InMtet1 et InMtet2² et de deux couples d'amorces spécifiques de la souche *M. agalactiae* 5632 ciblant deux protéines hypothétiques nommées MAGa0900F et MAGa0900R et MAGa3840F, MAGa3840R². De plus, des amorces spécifiques de la souche *M. hominis* 74 ont été obtenues par comparaison génomique des souches *M. hominis* 22-4 et 74, respectivement issues des souches de référence *M. hominis* 132 et *M. hominis* PG21, toutes deux entièrement séquencées. Ces primers, dénommés Mho_2090F/Mho_2090R, Mho_3110F/Mho_3110R et Mho_5220F/Mho_5220R ciblent respectivement les gènes codants pour deux lipoprotéines et une enzyme de restriction de type I présents chez la souche 74 mais absent dans le clone 22-4. Les amorces utilisées dans cette étude sont présentées dans le **Tableau 2**.

Tableau 2 : Amorces utilisées pour détecter *M. agalactiae* 5632, *M. hominis* 74 et le gène *tet(M)*.

Forward primers	Sequences of forward primers (5'-3')	Reverse primers	Sequences of reverse primers (5'-3')	Size of PCR product (bp)
IntMtet1	TGGCGTACAAGCACAAACTC	IntMtet2	GCAAAGTTCAGACGGACCTC	442
MAGa0900F	ATGGCAATTGATTTACTCCC	MAGa0900R	ATGATGTTGGCCGTATTTGG	1500
MAGa3840F	GAAGCACTAAAATCAGGCAA	MAGa3840R	GCGGCAGCAGAGTTATCAAG	1223
Mho_2090F	GCGTTGGTCGCTCCATTAAATTCG	Mho_2090R	TCCTTCTTCGTCATTGGCTTG	990
Mho_3110F	CAGGCAGAAACAGACATCCTTAAC	Mho_3110R	TGATCGGTCGTTGATGAAGC	1080
Mho_5220F	TTCAAGAGCAGGAAGTGCAG	Mho_5220R	TCAATTTCAAGAGGAAGGCCAG	861

Premiers résultats des essais de conjugaison

Les premiers résultats des essais de conjugaison sont présentés dans le **Tableau 3**. Au total, sept expériences de conjugaison intra-espèce et 14 expériences de conjugaison inter-espèce ont été réalisées. Même si les témoins positifs réalisés en parallèle de chaque expérience ont toujours bien poussé, nous n'avions que très rarement des témoins négatifs réellement négatifs. Cette observation nous a donc conduit à augmenter les concentrations d'antibiotiques dans les géloses sans toutefois réussir à obtenir le résultat attendu.

Suite aux expériences intra-espèces, de nombreux transconjugants potentiels ont poussé sur gélose doublement sélectives après 5 à 30 jours d'incubation. Cependant, aucun d'entre eux n'a repoussé après repiquage en milieu liquide doublement sélectif, suggérant qu'il n'y avait pas eu de transfert d'ADN. De potentiels transconjugants issus des conjugaisons inter-espèce ont réussi à repousser au bout d'une quinzaine de jours en milieu liquide en présentant un virage coloré en jaune du milieu. Ceci nous a orienté vers l'obtention d'une souche appartenant à l'espèce *M. agalactiae* qui fermente le glucose et donc acidifie le milieu.

Cependant, le gène *tet(M)* n'a pu être détecté par PCR chez aucun d'entre eux, confirmant qu'il n'y avait pas eu de transfert de l'ICE.

Tableau 3: Récapitulatif des résultats obtenus lors des expériences de conjugaison au sein de l'espèce *M. hominis* (intra-espèce) et entre *M. agalactiae* et *M. hominis* (inter-espèce).

Conjugaison	Nombre d'essais réalisés	Ratio du mix	[C] d'ATB sur géloses en double sélection (mg/mL)	Nombre de colonies sur géloses T-/essais	Nombre de colonies totales repiquées en HA liquide avec ATB	Nombre de colonies qui ont repoussé avec ATB
Intra-espèce 74 vs 22-4	1	01:01	Tetra2 + Oflo2	4	14	0
	1	01:01	Tetra4 + Oflo4	0	15	0
	1	01:10	Tetra2 + Oflo2	≈20	9	0
	4	01:10	Tetra4 + Oflo4	≈10	46	0
Inter-espèce 56332 vs 6227	1	01:01	Genta50 + Tetra2	≈20	9	9
	1	01:01	Genta50 + Tetra4	0	1	0
	3	10:01	Genta50 + Tetra2	10-20	34	11
	3	01:10	Genta50 + Tetra2	≈10	34	8
	1	10:01	Genta50 + Tetra4	<10	8	0
	5	01:10	Genta50 + Tetra4	<10	37	0

Tétra, tétracycline ; Oflo, ofloxacin ; Genta, gentamicine ; ATB, antibiotique ; T-, témoin négatif. Conjugaison intra-espèce : *M. hominis* 74 vs *M. hominis* 22-4 (Figure 21). Conjugaison inter-espèce : *M. agalactiae* 5632 vs *M. hominis* 6227 (Figure 20).

Perspectives sur les essais de conjugaison

Aucun transfert conjugal au sein de l'espèce *M. hominis* ou entre les espèces *M. hominis* et *M. agalactiae* n'a pu être mis en évidence pour l'instant.

Plusieurs hypothèses ont été avancées concernant la non négativité de nos témoins négatifs. D'une part, la présence d'un effet inoculum lié à la forte concentration du mélange déposé sur les géloses doublement sélectives est à mettre en cause. En effet, les numérations réalisées avant dépôt sur géloses étaient aux environs de 10^7 UFC/ml. Hors, les CMI des souches utilisées pour choisir les concentrations d'antibiotiques dans les géloses sélectives sont déterminées pour des concentrations de 10^4 à 10^5 UFC/ml⁸¹. Ceci rend nos concentrations d'antibiotique dans les géloses caduques. Nous devons néanmoins conserver de fortes concentrations pour réaliser les expériences de conjugaison car la fréquence de conjugaison a été estimée seulement entre $2.7 \cdot 10^{-11}$ et $7.2 \cdot 10^{-8}$ transconjugants par donneur-CFU chez *M.*

*agalactiae*¹⁰⁵. En revanche, après conjugaison et incubation, nous pourrions tenter de diluer le mélange pour atteindre des concentrations de l'ordre de 10⁵ UFC/ml avant de l'étaler sur plusieurs géloses doublement sélectives. D'autre part, concernant les potentiels transconjuguants issus de la conjugaison inter-espèce qui ont repoussé sous double sélection mais ne possédaient pas le gène *tet(M)*, il est à noter que leur pousse tardive ne permet pas d'exclure une perte d'activité des antibiotiques dans le milieu liquide après plusieurs jours à 37°C. Enfin, les colonies présentes sur nos témoins négatifs pourraient correspondre à des mutants spontanés, c'est à dire à une sélection de mutations de l'ARNr 16S conduisant à une augmentation des CMI des tétracyclines ou à une sélection de mutations des gènes cibles des fluoroquinolones. Il s'agit d'un mécanisme fréquent chez les mycoplasmes de ruminants et déjà décrit chez *M. hominis*^{91,198}. Un séquençage de l'ARNr 16S ou des gènes *gyrA* et *parC* de ces clones permettrait d'explorer cette hypothèse.

L'absence de mise en évidence d'un transfert conjugatif pourrait également être due au choix des souches utilisées. En effet, la souche 22-4, dérivée de la souche *M. hominis* 132 par transformation, possède un ICE avec un CDS19 tronqué (cf. chapitre 2). Or le CDS19 possède un domaine transmembranaire et serait un candidat potentiel à la formation du pore de conjugaison¹⁹⁰. On peut alors se demander si la production d'une protéine tronquée, en perturbant l'architecture du pore, n'altérerait pas les propriétés de conjugaison. Des essais de transformation sont actuellement en cours au laboratoire pour essayer de transformer la souche *M. hominis* 4788 qui possède un ICE dont les protéines responsables de la formation du pore de conjugaison semblent intègres. De même, de nombreux échecs de transformation ayant eu lieu au laboratoire avec la souche *M. hominis* PG21, dont est issue la souche receveuse *M. hominis* 74¹⁹⁹, il est possible que cette souche soit moins permissive aux transferts horizontaux de gènes. Cette idée se voit renforcée par l'observation faite dans le chapitre 2 selon laquelle les souches de *M. hominis* qui ne portent pas d'ICEs pourraient être moins susceptibles que celles qui en portent vis-à-vis de l'intégration de matériel génétique étranger. La collection de souches cliniques de *M. hominis* caractérisée au niveau de la résistance menée dans le chapitre 1, associée à la détection de la présence des ICEs réalisée dans le chapitre 2, nous permet de disposer de nouvelles souches d'intérêt pour des essais de conjugaison. Ainsi, pour les expériences de conjugaison entre *M. agalactiae* et *M. hominis*, nous pourrions utiliser comme souches receveuses d'autres souches cliniques sans ICE complet portant le gène *tet(M)* (souches *M. hominis* 5571 ou 6885 par exemple) ou une souche clinique sans ICE résistante aux fluoroquinolones par mutation dans les gènes *gyrA* et *parC* (souche 6774). Pour les

expériences intra-espèce, nous pourrions utiliser une de nos 13 souches cliniques portant un ICE et un gène *tet*(M) ou une souche clinique résistante aux fluoroquinolones portant un ICE (souche 5700), et utiliser des souches receveuses sans ICE portant respectivement une résistance aux fluoroquinolones (souche 6774 décrite plus haut) ou une résistance à la tétracycline (souches 6227, 5571 ou 6885). Enfin, il peut être intéressant de faire des essais préalables avec des mélanges des souches donneuses et receveuses précédemment nommées pour augmenter nos chances d'obtenir un premier échange conjugatif.

Par ailleurs, des expériences de conjugaison en présence de PEG (polyéthylène glycol) inspirées d'un protocole décrit chez *M. pulmonis*²⁰² pourraient être intéressantes à mettre en œuvre. L'introduction du PEG sera faite à l'étape 3 décrite sur la **Figure 22** en utilisant du PEG 8000 dilué à 50% dans du PBS. Après centrifugation du mélange bactérien et élimination du surnageant, une remise en suspension du mélange sera faite dans 15µl de HA et 135µl de PEG pour un temps de contact à température ambiante de 1 minute. Puis une dilution au 1/10 dans du HA sera incubée pendant 2h à 37°C. Une nouvelle centrifugation, un rejet du surnageant et une remise en suspension dans 1 ml de HA seront alors effectués avant la mise à l'étuve pour les 16h d'incubation avant étalement sur les géloses sélectives. Le PEG, de par sa consistance visqueuse, permet un contact rapproché entre les cellules donneuses et receveuses qui pourrait favoriser l'échange de matériel génétique tout en exerçant la propriété de désorganiser les membranes. Ainsi, des expériences de fusion membranaire à l'aide de PEG ont déjà été réalisées avec succès entre deux souches de *M. agalactiae*¹⁹⁵.

D'autre part, même si *M. hominis* et *M. agalactiae* appartiennent au même groupe phylogénétique Hominis, il se pourrait également que la distance génétique entre les deux soit trop éloignée pour permettre des échanges de matériel génétique. De plus, *M. hominis* est un pathogène humain tandis que *M. agalactiae* est un pathogène de ruminant. Cette différence d'hôte pourrait également être impliquée dans l'absence d'échanges de matériel génétique observée entre ces deux pathogènes. Des expériences de conjugaison inter-espèce avec des mycoplasmes plus proches phylogénétiquement tels que *M. arthritidis* ou encore des mycoplasmes tels que *M. fermentans* ayant le même hôte humain pourraient être envisagées.

Enfin, il est à relever que toutes les expériences de conjugaison ont été réalisées en fin de phase exponentielle de croissance comme précédemment décrit pour *M. agalactiae*² mais cela n'est peut-être pas optimal pour *M. hominis*. En effet, récemment au laboratoire, il a été

démontré une optimisation de la transformation chez *M. hominis* en utilisant une seule culture, qui correspond à une phase de croissance précoce, soit le début de la phase exponentielle de croissance¹⁹⁹. La plupart des protocoles de transformation publiés n'utilisant qu'une seule phase de croissance spécifique de chaque espèce, on peut aisément imaginer qu'il en est de même concernant la conjugaison. Des expériences avec une phase de croissance plus précoce ou avec un mélange de différentes phases de croissance qui comprendraient ainsi certainement la phase la plus appropriée aux échanges de matériel génétique pourraient permettre une augmentation de l'efficacité des transferts conjuguatifs.

Optimisation de la transformation de *M. hominis* pour l'obtention de souches permettant la réalisation de l'essai de conjugaison intra-espèce idéal

Pour réaliser l'expérience de conjugaison idéale (**Figure 19**), nous avons besoin d'une souche de *M. hominis* possédant un ICE complet, lui même porteur d'un marqueur de résistance. Une telle souche doit pouvoir être obtenue par transformation d'une souche déjà porteuse d'ICE. Cependant, à ce jour, les efficacités de transformation obtenues au laboratoire avec la souche *M. hominis* M132 sont faibles de l'ordre de 10^{-9} transformants/cellules/ μ g de plasmides^{199,200}. La probabilité d'obtenir un transformant avec insertion du marqueur de résistance dans l'ICE est donc très faible. Les transformations ont été obtenues au laboratoire grâce au vecteur pMT85-PStetM (**Figure 24**), dérivé du plasmide pMT85²⁰³ ayant intégré un mini transposon basé sur le Tn4001. Dans ce plasmide, le gène codant la transposase est situé à l'extérieur du transposon ce qui permet de favoriser une insertion stable de celui-ci dans le génome²⁰³. Le pMT85-PStetM porte le gène de résistance à la tétracycline *tet*(M) sous la dépendance du promoteur de la spiraline, qui est une protéine de spiroplasma et non de *M. hominis*. Les prochains travaux envisagés seraient d'optimiser ce vecteur en changeant le promoteur en amont du gène *tet*(M). Nous pourrions utiliser un promoteur fort de l'espèce *M. hominis* par exemple celui de l'arginine déiminase impliquée dans le métabolisme de l'arginine du mycoplasme. En effet, une augmentation de l'efficacité de transformation permettrait d'augmenter les chances d'obtenir une souche de *M. hominis* « idéale » pour les manipulations de conjugaison intra-espèce, c'est-à-dire porteuse d'un ICE ayant intégré le gène *tet*(M). La transformation de souches portant plusieurs copies d'ICEs comme les souches *M. hominis* 4235 et 35 décrites au chapitre 2 augmentera aussi les chances car le gène *tet*(M) aura une meilleure probabilité de s'intégrer dans un ICE et ces souches sont potentiellement plus aptes à acquérir/donner du matériel génétique exogène.

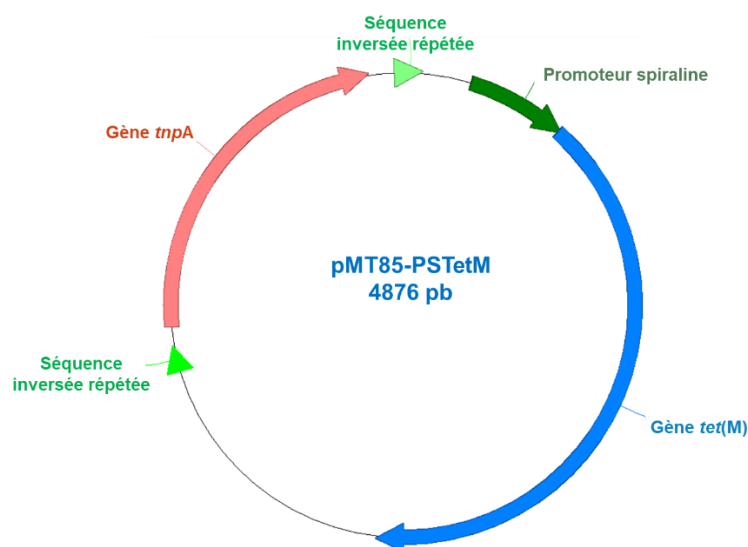


Figure 24 : Représentation du vecteur pMT85-PTetM (d'après Rideau, F. 2018¹⁹⁹).

Les protéines codées par l'ICE de *M. hominis* sont-elles exprimées ?

Nous souhaitons aussi déterminer si les protéines codées par l'ICE de *M. hominis* sont exprimées. Pour cela, nous envisageons de réaliser des expériences de protéomique sur la souche *M. hominis* 4788 qui nous a servi de souche de référence dans le chapitre 2 de ce document et qui semble posséder un ICE (ICEH 4788) avec des CDSs intègres. Pour cela, une culture de *M. hominis* 4788 d'environ 50 ml en milieu Hayflick arginine⁷⁰ sera utilisée. Une analyse par chromatographie liquide couplée à une spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS) sera réalisée après extraction des protéines grâce au Triton TX-100²⁰⁴. La température de transition de phase de ce détergent se situe aux alentours de 60°C. A 37°C, il se forme des micelles de grosse taille, enrichies en protéines amphiphiles, qu'il sera possible de récupérer par centrifugation et de séparer de la phase aqueuse qui contient les protéines hydrosolubles (ici cytoplasmiques). Trois cycles de transition seront réalisés pour laver chacune des deux phases. Les protéines de la phase détergent seront précipitées en utilisant du méthanol et récupérées par centrifugation. Puis une digestion à la trypsine en gel SDS-PAGE 4% sera effectuée avant analyse sur un système de chromatographie en phase liquide à haute performance puis un spectromètre de masse disponibles au Centre de Génomique Fonctionnelle de Bordeaux (Université de Bordeaux). La comparaison des peptides obtenus avec les cartes de masses et spectres MS/MS théoriques issus du séquençage du génome de la souche *M. hominis* 4788 par technologie Oxford Nanopore (cf. chapitre 2) permettra d'identifier les peptides. Avec cette

expérience, nous espérons identifier un certain nombre de protéines de l'ICEH 4788 décrites par bio-informatique.

Si des protéines sont exprimées, il pourra être intéressant de les localiser par immunomarquage. Nous pourrions produire une protéine recombinante d'intérêt grâce à un vecteur inséré chez *E. coli*²⁰⁵. Cette protéine recombinante pourra alors servir pour la production d'anticorps monoclonaux. Une visualisation de la protéine d'intérêt marquée par les anticorps spécifiques pourra notamment être intéressante lors de l'infection par *M. hominis* d'un *T. vaginalis* ou lors de la coculture avec une cellule de l'hôte comme une cellule dendritique.

Si aucune des protéines de l'ICE n'est retrouvée, plusieurs possibilités seront à envisager. Soit, les protéines de l'ICE sont faiblement exprimées et ne sont pas vues par LC-MS/MS au sein d'un mélange complexe. Il faut aussi noter que les protéines de petite taille et les protéines ionisées sont peu accessibles à la LC-MS/MS. Il est aussi possible que ces protéines ne soient exprimées que dans certaines conditions physiologiques à déterminer, telles que le contact avec une cellule de l'hôte ou lors d'une localisation intra-cellulaire du mycoplasme dans un *T. vaginalis*. Dans ce cas, de nouvelles expériences de protéomique devront être menées en essayant de reproduire ces conditions. Enfin, il est aussi possible que les protéines soient sécrétées. Dans ce cas, les protéines ne seront pas retrouvées dans la cellule mais dans le sécrétome. Dans le cas d'une symbiose avec *T. vaginalis*, les protéines pourraient par exemple être sécrétées dans le parasite.

Si l'étude de protéomique n'aboutit pas, nous envisagerons des expériences de transcription inverse et PCR en temps réel sur les gènes de l'ICE pour voir s'ils sont transcrits. Nous pourrions également comparer les taux de transcription de ces gènes dans différentes conditions, notamment en localisation intra-cellulaire dans *T. vaginalis* ou au contact de cellules de l'hôte comme des cellules dendritiques.

Fonctionnalité des protéines MhoF et MhoH de l'ICE de *M. hominis*

L'originalité des ICEs trouvés chez *M. hominis* est de posséder un module spécifique contenant des protéines présentant des homologies avec des effecteurs TAL, notamment les protéines MhoF et MhoH (cf. chapitre 2). Ces effecteurs TAL sont des facteurs de transcription impliqués dans la reconnaissance de polynucléotides et la transduction de signaux^{196,197}. Des

études ont montré qu'un nombre minimal de répétitions (au moins 6,5) au sein des effecteurs TAL était nécessaire pour la reconnaissance de l'ADN cible et une activation efficace de l'expression des gènes²⁰⁶. MhoH et MhoF devraient donc être capables de lier de l'ADN puisqu'elles possèdent respectivement 6,5 et 8,5 répétitions de 32 nucléotides chacune (Figure 3, chapitre 2). Pour confirmer cette hypothèse, nous pourrions produire les protéines recombinantes MhoF ou MhoH et vérifier leur capacité à lier l'ADN de *M. hominis* sur un gel retard. Ainsi, si la protéine se fixe effectivement sur un fragment d'ADN, la migration de cette dernière sera retardée. La bande retardée pourra alors être extraite du gel pour analyse. Une banque d'oligonucléotides potentiellement reconnus par les di-résidus hypervariables des répétitions pourra aussi être déduite de la séquence des protéines MhoF et MhoH et synthétisée. Les mêmes expériences seront ensuite réalisées pour tenter de préciser la séquence d'ADN reconnue. De l'ADN de *T. vaginalis* ou de cellule dendritiques pourra aussi être testé dans l'hypothèse d'un rôle de ces protéines lors de la symbiose avec le parasite ou lors de l'infection de la cellule hôte.

En conclusion,

Au cours de ma thèse nous avons réussi à mettre en évidence pour la première fois la présence d'ICEs chez *M. hominis*, éléments génétiques mobiles présents dans 45% des souches cliniques. La découverte de ces éléments renforce l'idée que les transferts horizontaux ont pu jouer un rôle majeur dans l'évolution de *M. hominis* et que ce phénomène n'est pas restreint aux mycoplasmes de ruminants. La découverte au sein de ces ICEs de protéines homologues à des effecteurs TAL potentiellement capables de lier l'ADN et de modifier l'expression des gènes suggère que l'acquisition d'ICEs pourrait être impliquée dans l'adaptation du pathogène à sa niche écologique notamment lors de sa symbiose avec *T. vaginalis* et/ou peut-être être impliquée dans son pouvoir pathogène. La poursuite de ces travaux devrait permettre de mieux comprendre la physiopathologie de ce pathogène génital humain au génome minimal.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Sirand-Pugnet, P., Citti, C., Barre, A. and Blanchard, A. 2007, Evolution of mollicutes: down a bumpy road with twists and turns. *Research in microbiology*, **158**, 754-766.
2. Dordet Frisoni, E., Marena, M. S., Sagne, E., et al. 2013, ICEA of *Mycoplasma agalactiae*: a new family of self-transmissible integrative elements that confers conjugative properties to the recipient strain. *Mol. Microbiol.*, **89**, 1226-1239.
3. Calcutt, M. J., Lewis, M. S. and Wise, K. S. 2002, Molecular genetic analysis of ICEF, an integrative conjugal element that is present as a repetitive sequence in the chromosome of *Mycoplasma fermentans* PG18. *J. Bacteriol.*, **184**, 6929-6941.
4. Marena, M., Barbe, V., Gourgues, G., Mangenot, S., Sagne, E. and Citti, C. 2006, A new integrative conjugative element occurs in *Mycoplasma agalactiae* as chromosomal and free circular forms. *J. Bacteriol.*, **188**, 4137-4141.
5. Tardy, F., Mick, V., Dordet-Frisoni, E., et al. 2015, Integrative conjugative elements are widespread in field isolates of *Mycoplasma* species pathogenic for ruminants. *Appl. Environ. Microb.*, **81**, 1634-1643.
6. Bellanger, X., Payot, S., Leblond-Bourget, N. and Guedon, G. 2014, Conjugative and mobilizable genomic islands in bacteria: evolution and diversity. *FEMS microbiology reviews*, **38**, 720-760.
7. Song, T., Ye, A., Xie, X., et al. 2014, Epidemiological investigation and antimicrobial susceptibility analysis of *Ureaplasma* species and *Mycoplasma hominis* in outpatients with genital manifestations. *J Clin Pathol*, **67**, 817-820.
8. Waites, K. and Talkington, D. 2005, New developments in human diseases due to mycoplasmas. In: Browning, A. B. G. F. (ed), *Mycoplasmas molecular biology pathogenicity and strategies for control.*, Horizon Bioscience, Norfolk, pp. 289-354.
9. 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. Neonat. M.*, **14**, 190-199.
10. Calcutt, M. J. and Foecking, M. F. 2015, 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**.
11. Calcutt, M. J. and Foecking, M. F. 2015, Complete genome sequence of *Mycoplasma hominis* strain Sprott (ATCC 33131), isolated from a patient with nongonococcal urethritis. *Genome Announc.*, **3**.
12. Barre, A., de Daruvar, A. and Blanchard, A. 2004, MolliGen, a database dedicated to the comparative genomics of Mollicutes. *Nucleic Acids Res.*, **32**, D307-310.

13. Klieneberger-Nobel, E. 1967, Mycoplasma, a brief historical review. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **143**, 713-718.
14. Tully, J. G., Bové, Joseph M., Laigret, Frédéric, and Whitcomb, Robert F 1993, 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.
15. Johansson KE, P. B. 2002, Taxonomy of Mollicutes. In: Razin S, H. R. (ed), *Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas*, Kluwer Academic/Plenum London, pp. p. 1-29.
16. 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.
17. Weisburg, W. G., Tully, J. G., Rose, D. L., et al. 1989, A phylogenetic analysis of the mycoplasmas: basis for their classification. *Journal of bacteriology*, **171**, 6455-6467.
18. Blanchard, A. 1990, *Ureaplasma urealyticum* urease genes; use of a UGA tryptophan codon. *Molecular microbiology*, **4**, 669-676.
19. Waites, K. B., Xiao, L., Liu, Y., Balish, M. F. and Atkinson, T. P. 2017, *Mycoplasma pneumoniae* from the respiratory tract and beyond. *Clinical microbiology reviews*, **30**, 747-809.
20. Chalker, V., Stocki, T., Mentasti, M., Fleming, D. and Harrison, T. 2011, Increased incidence of *Mycoplasma pneumoniae* infection in England and Wales in 2010: multilocus variable number tandem repeat analysis typing and macrolide susceptibility. *Euro surveillance : bulletin European sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*, **16**.
21. Pereyre, S., Renaudin, H., Charron, A. and Bebear, C. 2012, Clonal spread of *Mycoplasma pneumoniae* in primary school, Bordeaux, France. *Emerging infectious diseases*, **18**, 343-345.
22. Jensen, J. S., Cusini, M., Gomberg, M. and Moi, H. 2016, 2016 European guideline on *Mycoplasma genitalium* infections. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology : JEADV*, **30**, 1650-1656.
23. Taylor-Robinson, D., Gilroy, C. B., Horowitz, S. and Horowitz, J. 1994, *Mycoplasma genitalium* in the joints of two patients with arthritis. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology*, **13**, 1066-1069.
24. Kokkayil, P. and Dhawan, B. 2015, Ureaplasma: current perspectives. *Indian journal of medical microbiology*, **33**, 205-214.

25. Razin, S., Yogev, D. and Naot, Y. 1998, Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, **62**, 1094-1156.
26. Glass, J. I., Assad-Garcia, N., Alperovich, N., et al. 2006, Essential genes of a minimal bacterium. *P. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 425-430.
27. Pereyre, S., Sirand-Pugnet, P., Beven, L., et al. 2009, Life on arginine for *Mycoplasma hominis*: clues from its minimal genome and comparison with other human urogenital mycoplasmas. *PLoS genet.*, **5**, e1000677.
28. Hahn, R. G. and Kenny, G. E. 1974, Differences in arginine requirement for growth among arginine-utilizing *Mycoplasma* species. *Journal of bacteriology*, **117**, 611-618.
29. Taylor-Robinson, D. 2007, The role of mycoplasmas in pregnancy outcome. *Best practice & research. Clinical obstetrics & gynaecology*, **21**, 425-438.
30. Bébéar, C. and Bébéar, C. M. 2007, Infections humaines à mycoplasmes. *Revue Francophone des Laboratoires.*, 63-69.
31. Sha, B. E., Zariffard, M. R., Wang, Q. J., et al. 2005, Female genital-tract HIV load correlates inversely with *Lactobacillus* species but positively with bacterial vaginosis and *Mycoplasma hominis*. *The Journal of infectious diseases*, **191**, 25-32.
32. Waites, K. B., Katz, B. and Schelonka, R. L. 2005, Mycoplasmas and ureaplasmas as neonatal pathogens. *Clinical microbiology reviews*, **18**, 757-789.
33. Neman-Simha, V., Renaudin, H., de Barbeyrac, B., et al. 1992, Isolation of genital mycoplasmas from blood of febrile obstetrical-gynecologic patients and neonates. *Scandinavian journal of infectious diseases*, **24**, 317-321.
34. Huang, C., Long, X., Jing, S., et al. 2016, *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* infections and semen quality in 19,098 infertile men in China. *World J. Urol.*, **34**, 1039-1044.
35. Pereyre, S., Bébéar, C. and Bébéar, C. 2015, *Mycoplasma hominis*, *M. genitalium*, *Ureaplasma* spp. In: VL, Y. (ed), *Antimicrobial Therapy and Vaccines*, Esun technologies, Pittsburgh, PA, USA.
36. Zhou, M., Wang, P., Chen, S., et al. 2016, Meningitis in a Chinese adult patient caused by *Mycoplasma hominis*: a rare infection and literature review. *BMC infectious diseases*, **16**, 557.
37. Lee, E. H., Winter, H. L., van Dijk, J. M., Metzemaekers, J. D. and Arends, J. P. 2012, Diagnosis and antimicrobial therapy of *Mycoplasma hominis* meningitis in adults. *International journal of medical microbiology : IJMM*, **302**, 289-292.
38. MacKenzie, C. R., Nischik, N., Kram, R., Krauspe, R., Jager, M. and Henrich, B. 2010, Fatal outcome of a disseminated dual infection with drug-resistant *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma parvum* originating from a septic arthritis in an immunocompromised

- patient. *International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases*, **14 Suppl 3**, e307-309.
39. Qiu, H. J., Lu, W. P., Li, M., et al. 2017, The infection of *Mycoplasma hominis* after total knee replacement: Case report and literature review. *Chinese journal of traumatology = Zhonghua chuang shang za zhi*, **20**, 243-245.
 40. Rieber, H., Frontzek, A. and Fischer, M. 2019, Periprosthetic joint infection associated with *Mycoplasma hominis* after transurethral instrumentation in an immunocompetent patient. Unusual or underestimated? A case report and review of the literature. *International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases*, **82**, 86-88.
 41. Mechai, F., Le Moal, G., Duchene, S., Burucoa, C., Godet, C. and Freslon, M. 2006, *Mycoplasma hominis* osteitis in an immunocompetent man. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, **25**, 715-717.
 42. Pascual, A., Perez, M. H., Jatón, K., et al. 2010, *Mycoplasma hominis* necrotizing pleuropneumonia in a previously healthy adolescent. *BMC Infect Dis*, **10**, 335.
 43. Novosad, S. A., Basavaraju, S. V., Annambhotla, P., et al. 2017, *Mycoplasma hominis* infections transmitted through amniotic tissue product. *Clin Infect Dis*, **65**, 1152-1158.
 44. Sampath, R., Patel, R., Cunningham, S. A., et al. 2017, Cardiothoracic transplant recipient *Mycoplasma hominis*: An uncommon infection with probable donor transmission. *EBioMedicine*, **19**, 84-90.
 45. Smibert, O. C., Wilson, H. L., Sohail, A., et al. 2017, Donor-derived *Mycoplasma hominis* and an apparent cluster of *M. hominis* cases in solid organ transplant recipients. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, **65**, 1504-1508.
 46. Nowbakht, C., Edwards, A. R., Rodriguez-Buritica, D. F., et al. 2019, Two cases of fatal hyperammonemia syndrome due to *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* in immunocompromised patients outside lung transplant recipients. *Open forum infectious diseases*, **6**, ofz033.
 47. Sabo, M. C., Lehman, D. A., Wang, B., et al. 2019, Associations between vaginal bacteria implicated in HIV acquisition risk and proinflammatory cytokines and chemokines. *Sexually transmitted infections*.
 48. Citti, C., Nouvel, L. X. and Baranowski, E. 2010, Phase and antigenic variation in mycoplasmas. *Future microbiology*, **5**, 1073-1085.
 49. Chopra-Dewasthaly, R., Spargser, J., Zimmermann, M., Citti, C., Jechlinger, W. and Rosengarten, R. 2017, Vpma phase variation is important for survival and persistence of *Mycoplasma agalactiae* in the immunocompetent host. *PLoS pathogens*, **13**, e1006656.

50. Shaw, B. M., Simmons, W. L. and Dybvig, K. 2012, The Vsa shield of *Mycoplasma pulmonis* is antiphagocytic. *Infection and immunity*, **80**, 704-709.
51. Zhang, Q. and Wise, K. S. 1996, Molecular basis of size and antigenic variation of a *Mycoplasma hominis* adhesin encoded by divergent vaa genes. *Infection and immunity*, **64**, 2737-2744.
52. Ladefoged, S. A., Jensen, L. T., Brock, B., Birkelund, S. and Christiansen, G. 1996, Analysis of 0.5-kilobase-pair repeats in the *Mycoplasma hominis* lmp gene system and identification of gene products. *Journal of bacteriology*, **178**, 2775-2784.
53. Nyvold, C., Birkelund, S. and Christiansen, G. 1997, The *Mycoplasma hominis* P120 membrane protein contains a 216 amino acid hypervariable domain that is recognized by the human humoral immune response. *Microbiology*, **143 (Pt 2)**, 675-688.
54. Goret, J., Le Roy, C., Touati, A., et al. 2016, Surface lipoproteome of *Mycoplasma hominis* PG21 and differential expression after contact with human dendritic cells. *Future microbiology*, **11**, 179-194.
55. Truchetet, M. E., Beven, L., Renaudin, H., et al. 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. *The Journal of infectious diseases*, **204**, 1796-1805.
56. Goret, J., Beven, L., Faustin, B., et al. 2017, Interaction of *Mycoplasma hominis* PG21 with human dendritic cells: Interleukin-23-inducing mycoplasmal lipoproteins and inflammasome activation of the cell. *Journal of bacteriology*, **199**.
57. Pereyre, S. and Bébéar, C. 2019, Infections à *Mycoplasma hominis*. *Encycl. Méd. Chir., Maladies infectieuses*, Elsevier Masson SAS, Paris.
58. Allen-Daniels, M. J., Serrano, M. G., Pflugner, L. P., et al. 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.
59. 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.
60. Rappelli, P., Addis, M. F., Carta, F. and Fiori, P. L. 1998, *Mycoplasma hominis* parasitism of *Trichomonas vaginalis*. *Lancet*, **352**, 1286.
61. Dessi, D., Rappelli, P., Diaz, N., Cappuccinelli, P. and Fiori, P. L. 2006, *Mycoplasma hominis* and *Trichomonas vaginalis*: a unique case of symbiotic relationship between two obligate human parasites. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*, **11**, 2028-2034.
62. Rappelli, P., Carta, F., Delogu, G., et al. 2001, *Mycoplasma hominis* and *Trichomonas vaginalis* symbiosis: multiplicity of infection and transmissibility of *M. hominis* to human cells. *Archives of microbiology*, **175**, 70-74.

63. Vancini, R. G., Pereira-Neves, A., Borojevic, R. and Benchimol, M. 2008, *Trichomonas vaginalis* harboring *Mycoplasma hominis* increases cytopathogenicity in vitro. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology*, **27**, 259-267.
64. Morada, M., Manzur, M., Lam, B., et al. 2010, Arginine metabolism in *Trichomonas vaginalis* infected with *Mycoplasma hominis*. *Microbiology*, **156**, 3734-3743.
65. 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*. *Frontiers in microbiology*, **7**, 953.
66. Dessi, D., Margarita, V., Cocco, A. R., Marongiu, A., Fiori, P. L. and Rappelli, P. 2019, *Trichomonas vaginalis* and *Mycoplasma hominis*: new tales of two old friends. *Parasitology*, 1-6.
67. Fichorova, R., Fraga, J., Rappelli, P. and Fiori, P. L. 2017, *Trichomonas vaginalis* infection in symbiosis with Trichomonasvirus and Mycoplasma. *Research in microbiology*, **168**, 882-891.
68. Furnkranz, U., Henrich, B. and Walochnik, J. 2018, *Mycoplasma hominis* impacts gene expression in *Trichomonas vaginalis*. *Parasitol. Res.*, **117**, 841-847.
69. Bébéar, C. and Pereyre, S. 2018, *Mycoplasma* et *Ureaplasma* spp. In: Microbiologie, S. F. d. (ed), *REMIC*. 6ème édition Ed., Paris, France.
70. Waites KB, B. C., Roberston JA, Talkington DF, Kenny GE. 2001, Laboratory diagnosis of mycoplasmal infections. In: Microbiology, A. S. f. (ed), *Cumitech 34*, Washington D.C.
71. Pereyre, S., Tardy, F., Renaudin, H., et al. 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.
72. Horner, P., Donders, G., Cusini, M., Gomberg, M., Jensen, J. S. and Unemo, M. 2018, Should we be testing for urogenital *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma parvum* and *Ureaplasma urealyticum* in men and women? - a position statement from the European STI Guidelines Editorial Board. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.*, **32**, 1845-1851.
73. 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.
74. 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.

75. Pascual, A., Jatón, 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**.
76. 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.
77. Férandon, C., Peuchant, O., Janis, C., et al. 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.
78. Waites, K. and Bébéar, C. 2016, Mycoplasma. In: Truant, A. L. (ed), *Manual of commercial methods in clinical microbiology, international edition*. 2nd Ed., Wiley J. and Sons, Hoboken, New jersey, pp. 195-213.
79. Ferandon, 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.
80. 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.
81. Waites KB, B. D., Bébéar C, S.D. B, Davidson M, Duffy LB, Kenny GE, Matlow A, Shortridge D, Talkington DF, Totten PA, Watts JL, Zheng X 2011, Methods for antimicrobial susceptibility testing for human mycoplasmas: Approved guideline. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne (PA).
82. Bébéar, C. M. and Bébéar, C. 2002, Antimycoplasmal agents. In: Razin, S. and Herrmann, R. (eds), *Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas.*, Kluwer Academic/Plenum Publishers, London, pp. 545-566.
83. Bébéar, C. M. 2006, *Mycoplasma, Ureaplasma*. In: Courvalin, P., Leclercq, R. and Bingen, E. (eds), *Antibiogramme*, ESKA, Paris, pp. 491-500.
84. Bébéar, C. M. and Kempf, I. 2005, Antimicrobial therapy and antimicrobial resistance. In: Blanchard A, B. G. (ed), *Mycoplasmas molecular biology pathogenicity and strategies for control.*, Horizon bioscience, Norfolk, pp. p. 535-568.
85. Pereyre, S., Gonzalez, P., De Barbeyrac, B., et al. 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*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **46**, 3142-3150.
86. McCormack, W. M. 1993, Susceptibility of mycoplasmas to antimicrobial agents: clinical implications. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, **17 Suppl 1**, S200-201.

87. Raherison, S., Gonzalez, P., Renaudin, H., Charron, A., Bebear, C. and Bebear, C. M. 2002, Evidence of active efflux in resistance to ciprofloxacin and to ethidium bromide by *Mycoplasma hominis*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **46**, 672-679.
88. Raherison, S., Gonzalez, P., Renaudin, H., Charron, A., Bebear, C. and Bebear, C. M. 2005, Increased expression of two multidrug transporter-like genes is associated with ethidium bromide and ciprofloxacin resistance in *Mycoplasma hominis*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **49**, 421-424.
89. De Barbeyrac, B., Dupon, M., Rodriguez, P., Renaudin, H. and Bébéar, C. 1996, A Tn1545-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.
90. Connell, S. R., Trieber, C. A., Dinos, G. P., Einfeldt, E., Taylor, D. E. and Nierhaus, K. H. 2003, Mechanism of Tet(O)-mediated tetracycline resistance. *The EMBO journal*, **22**, 945-953.
91. Degrange, 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*. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, **61**, 1390-1392.
92. Brodersen, D. E., Clemons, W. M., Jr., Carter, A. P., Morgan-Warren, R. J., Wimberly, B. T. and Ramakrishnan, V. 2000, The structural basis for the action of the antibiotics tetracycline, pactamycin, and hygromycin B on the 30S ribosomal subunit. *Cell*, **103**, 1143-1154.
93. Furneri, P. M., Rappazzo, G., Musumarra, M. P., Di Pietro, P., Catania, L. S. and Roccasalva, L. S. 2001, Two new point mutations at A2062 associated with resistance to 16-membered macrolide antibiotics in mutant strains of *Mycoplasma hominis*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **45**, 2958-2960.
94. 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.
95. Bébéar, C. M., Renaudin, H., Charron, A., Bov  , J. M., Bébéar, C. and Renaudin, J. 1998, Alterations in topoisomerase IV and DNA gyrase in quinolone-resistant mutants of *Mycoplasma hominis* obtained in vitro. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **42**, 2304-2311.
96. Gruson, D., Pereyre, S., Renaudin, H., Charron, A., Bébéar, C. and Bébéar, C. M. 2005, In vitro development of resistance to six and four fluoroquinolones in *Mycoplasma pneumoniae* and *Mycoplasma hominis*, respectively. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **49**, 1190-1193.
97. Meng, D. Y., Sun, C. J., Yu, J. B., Ma, J. and Xue, W. C. 2014, Molecular mechanism of fluoroquinolones resistance in *Mycoplasma hominis* clinical isolates. *Braz J Microbiol*, **45**, 239-242.

98. Bébéar, C. M., Bove, J. M., Bébéar, C. and Renaudin, J. 1997, Characterization of *Mycoplasma hominis* mutations involved in resistance to fluoroquinolones. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **41**, 269-273.
99. Bébéar, C. M., Renaudin, H., Charron, A., Gruson, D., Lefrancois, M. and Bébéar, C. 2000, In vitro activity of trovafloxacin compared to those of five antimicrobials against mycoplasmas including *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* fluoroquinolone-resistant isolates that have been genetically characterized. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **44**, 2557-2560.
100. Bébéar, C. M., Renaudin, J., Charron, A., et al. 1999, Mutations in the gyrA, parC, and parE genes associated with fluoroquinolone resistance in clinical isolates of *Mycoplasma hominis*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **43**, 954-956.
101. Bébéar, C. M., Renaudin, H., Charron, A., Clerc, M., Pereyre, S. and Bébéar, C. 2003, DNA gyrase and topoisomerase IV mutations in clinical isolates of *Ureaplasma* spp. and *Mycoplasma hominis* resistant to fluoroquinolones. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **47**, 3323-3325.
102. 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.
103. Raherison, S., Gonzalez, P., Renaudin, H., Charron, A., Bébéar, C. and Bébéar, C. M. 2002, Evidence of active efflux in resistance to ciprofloxacin and to ethidium bromide by *Mycoplasma hominis*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **46**, 672-679.
104. Raherison, S., Gonzalez, P., Renaudin, H., Charron, A., Bébéar, C. and Bébéar, C. M. 2005, Increased expression of two multidrug transporter-like genes is associated with ethidium bromide and ciprofloxacin resistance in *Mycoplasma hominis*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **49**, 421-424.
105. Faucher, M., Nouvel, L. X., Dordet-Frisoni, E., et al. 2019, Mycoplasmas under experimental antimicrobial selection: The unpredicted contribution of horizontal chromosomal transfer. *PLoS genet.*, **15**, e1007910.
106. Bebear, C., de Barbeyrac, B., Dewilde, A., et al. 1993, Multicenter study of the in vitro sensitivity of genital mycoplasmas to antibiotics. *Pathologie-biologie*, **41**, 289-293.
107. D  grange, S., Renaudin, H., Charron, A., Bébéar, C. and Bébéar, C. M. 2008, Tetracycline resistance in *Ureaplasma* spp. and *Mycoplasma hominis*: prevalence in Bordeaux, France, from 1999 to 2002 and description of two tet(M)-positive isolates of *M. hominis* susceptible to tetracyclines. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **52**, 742-744.
108. Krausse, R. and Schubert, S. 2010, In-vitro activities of tetracyclines, macrolides, fluoroquinolones and clindamycin against *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma* ssp. isolated in Germany over 20 years. *Clinical microbiology and infection : the official*

- transgenic food crop. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **112**, 5844-5849.
122. Norman, A., Hansen, L. H. and Sorensen, S. J. 2009, Conjugative plasmids: vessels of the communal gene pool. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, **364**, 2275-2289.
 123. Brochet, M., Rusniok, C., Couve, E., et al. 2008, Shaping a bacterial genome by large chromosomal replacements, the evolutionary history of *Streptococcus agalactiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **105**, 15961-15966.
 124. Davison, J. 1999, Genetic exchange between bacteria in the environment. *Plasmid*, **42**, 73-91.
 125. Wagner, P. L., Livny, J., Neely, M. N., Acheson, D. W., Friedman, D. I. and Waldor, M. K. 2002, Bacteriophage control of Shiga toxin 1 production and release by *Escherichia coli*. *Molecular microbiology*, **44**, 957-970.
 126. Zafarullah, M., Charlier, D. and Glansdorff, N. 1981, Insertion of IS3 can "turn-on" a silent gene in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, **146**, 415-417.
 127. Browning, G. F. and Citti, C. 2014, *Mollicutes: Molecular biology and pathogenesis*. Caister Academic Press: Norfolk, UK.
 128. Westberg, J., Persson, A., Holmberg, A., et al. 2004, The genome sequence of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC type strain PG1T, the causative agent of contagious bovine pleuropneumonia (CBPP). *Genome research*, **14**, 221-227.
 129. Pilo, P., Fleury, B., Marena, M., Frey, J. and Vilei, E. M. 2003, Prevalence and distribution of the insertion element ISMag1 in *Mycoplasma agalactiae*. *Veterinary microbiology*, **92**, 37-48.
 130. Miles, K., McAuliffe, L., Persson, A., Ayling, R. D. and Nicholas, R. A. 2005, Insertion sequence profiling of UK *Mycoplasma bovis* field isolates. *Veterinary microbiology*, **107**, 301-306.
 131. Nouvel, L. X., Sirand-Pugnet, P., Marena, M. S., et al. 2010, Comparative genomic and proteomic analyses of two *Mycoplasma agalactiae* strains: clues to the macro- and micro-events that are shaping mycoplasma diversity. *BMC genomics*, **11**, 86.
 132. Hu, W. S., Hayes, M. M., Wang, R. Y., Shih, J. W. and Lo, S. C. 1998, High-frequency DNA rearrangements in the chromosomes of clinically isolated *Mycoplasma fermentans*. *Current microbiology*, **37**, 1-5.
 133. Amram, E., Borovok, I., Nachum-Biala, Y., et al. 2016, High prevalence of diverse insertion sequences within the rRNA operons of *Mycoplasma bovis*. *Applied and environmental microbiology*, **82**, 6386-6394.

134. Sasaki, Y., Ishikawa, J., Yamashita, A., et al. 2002, The complete genomic sequence of *Mycoplasma penetrans*, an intracellular bacterial pathogen in humans. *Nucleic acids research*, **30**, 5293-5300.
135. Ditty, S. E., Li, B., Zhang, S., Zou, N. and Lo, S. C. 2003, Characterization of an IS element in *Mycoplasma orale* that is highly homologous to *M. fermentans* ISLE. *Current microbiology*, **46**, 302-306.
136. Afshar, B., Pitcher, D., Nicholas, R. A. and Miles, R. J. 2008, An evaluation of PCR methods to detect strains of *Mycoplasma fermentans*. *Biologicals : journal of the International Association of Biological Standardization*, **36**, 117-121.
137. Calcutt, M. J., Lavrrar, J. L. and Wise, K. S. 1999, IS1630 of *Mycoplasma fermentans*, a novel IS30-type insertion element that targets and duplicates inverted repeats of variable length and sequence during insertion. *Journal of bacteriology*, **181**, 7597-7607.
138. Lilly, J. and Camps, M. 2015, Mechanisms of theta plasmid replication. *Microbiology spectrum*, **3**.
139. Ruiz-Maso, J. A., Macho, N. C., Bordanaba-Ruiseco, L., Espinosa, M., Coll, M. and Del Solar, G. 2015, Plasmid rolling-circle replication. *Microbiology spectrum*, **3**, PLAS-0035-2014.
140. Couturier, M., Bex, F., Bergquist, P. L. and Maas, W. K. 1988, Identification and classification of bacterial plasmids. *Microbiological reviews*, **52**, 375-395.
141. Ranhand, J. M., Mitchell, W. O., Popkin, T. J. and Cole, R. M. 1980, Covalently closed circular deoxyribonucleic acids in spiroplasmas. *Journal of bacteriology*, **143**, 1194-1199.
142. Saillard, C., Carle, P., Duret-Nurbel, S., et al. 2008, The abundant extrachromosomal DNA content of the *Spiroplasma citri* GII3-3X genome. *BMC genomics*, **9**, 195.
143. Firrao, G., Garcia-Chapa, M. and Marzachi, C. 2007, Phytoplasmas: genetics, diagnosis and relationships with the plant and insect host. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*, **12**, 1353-1375.
144. Bergemann, A. D. and Finch, L. R. 1988, Isolation and restriction endonuclease analysis of a mycoplasma plasmid. *Plasmid*, **19**, 68-70.
145. Djordjevic, S. R., Forbes, W. A., Forbes-Faulkner, J., et al. 2001, Genetic diversity among *Mycoplasma* species bovine group 7: clonal isolates from an outbreak of polyarthritis, mastitis, and abortion in dairy cattle. *Electrophoresis*, **22**, 3551-3561.
146. King, K. W. and Dybvig, K. 1992, Nucleotide sequence of *Mycoplasma mycoides* subspecies *mycoides* plasmid pKMK1. *Plasmid*, **28**, 86-91.
147. 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*. *Journal of microbiological methods*, **91**, 121-127.

148. Garcillan-Barcia, M. P., Francia, M. V. and de la Cruz, F. 2009, The diversity of conjugative relaxases and its application in plasmid classification. *FEMS microbiology reviews*, **33**, 657-687.
149. Breton, M., Tardy, F., Dordet-Frisoni, E., et al. 2012, Distribution and diversity of mycoplasma plasmids: lessons from cryptic genetic elements. *BMC microbiol.*, **12**, 257.
150. Thiaucourt, F., Manso-Silvan, L., Salah, W., et al. 2011, *Mycoplasma mycoides*, from "mycoides Small Colony" to "capri". A microevolutionary perspective. *BMC genomics*, **12**, 114.
151. Burdett, V. 1980, Identification of tetracycline-resistant R-plasmids in *Streptococcus agalactiae* (group B). *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **18**, 753-760.
152. Salmond, G. P. and Fineran, P. C. 2015, A century of the phage: past, present and future. *Nature reviews. Microbiology*, **13**, 777-786.
153. Canchaya, C., Fournous, G. and Brussow, H. 2004, The impact of prophages on bacterial chromosomes. *Molecular microbiology*, **53**, 9-18.
154. Freeman, V. J. 1951, Studies on the virulence of bacteriophage-infected strains of *Corynebacterium diphtheriae*. *Journal of bacteriology*, **61**, 675-688.
155. Waldor, M. K., Tschape, H. and Mekalanos, J. J. 1996, A new type of conjugative transposon encodes resistance to sulfamethoxazole, trimethoprim, and streptomycin in *Vibrio cholerae* O139. *Journal of bacteriology*, **178**, 4157-4165.
156. Kuroda, M., Ohta, T., Uchiyama, I., et al. 2001, Whole genome sequencing of meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet*, **357**, 1225-1240.
157. Coleman, D. C., Sullivan, D. J., Russell, R. J., Arbuthnott, J. P., Carey, B. F. and Pomeroy, H. M. 1989, *Staphylococcus aureus* bacteriophages mediating the simultaneous lysogenic conversion of beta-lysin, staphylokinase and enterotoxin A: molecular mechanism of triple conversion. *Journal of general microbiology*, **135**, 1679-1697.
158. Gourlay, R. N. 1971, Mycoplasmatales virus-laidlawii 2, a new virus isolated from *Acholeplasma laidlawii*. *The Journal of general virology*, **12**, 65-67.
159. Cole, R. M., Tully, J. G., Popkin, T. J. and Bove, J. M. 1973, Morphology, ultrastructure, and bacteriophage infection of the helical mycoplasma-like organism (*Spiroplasma citri* gen. nov., sp. nov.) cultured from "stubborn" disease of citrus. *Journal of bacteriology*, **115**, 367-384.
160. Renaudin, J., Aullo, P., Vignault, J. C. and Bove, J. M. 1990, Complete nucleotide sequence of the genome of *Spiroplasma citri* virus SpV1-R8A2 B. *Nucleic acids research*, **18**, 1293.
161. Gourlay, R. N., Wyld, S. G. and Garwes, D. J. 1983, Some properties of mycoplasma virus Br 1. *Archives of virology*, **75**, 1-15.

162. Dybvig, K., Liss, A., Alderete, J., Cole, R. M. and Cassell, G. H. 1987, Isolation of a virus from *Mycoplasma pulmonis*. *Israel journal of medical sciences*, **23**, 418-422.
163. Voelker, L. L. and Dybvig, K. 1998, Characterization of the lysogenic bacteriophage MAV1 from *Mycoplasma arthritidis*. *Journal of bacteriology*, **180**, 5928-5931.
164. Jansson, E., Backman, A., Hakkarainen, K., von Bonsdorff, C. H., Seniusova, B. and Miettinen, A. 1982, Isolation and preliminary characterisation of mycoplasmavirus 20-P. *Medical biology*, **60**, 116-120.
165. Roske, K., Calcutt, M. J. and Wise, K. S. 2004, The *Mycoplasma fermentans* prophage phiMFV1: genome organization, mobility and variable expression of an encoded surface protein. *Molecular microbiology*, **52**, 1703-1720.
166. Voelker, L. L., Weaver, K. E., Ehle, L. J. and Washburn, L. R. 1995, Association of lysogenic bacteriophage MAV1 with virulence of *Mycoplasma arthritidis*. *Infection and immunity*, **63**, 4016-4023.
167. Voelker, L. L. and Dybvig, K. 1999, Sequence analysis of the *Mycoplasma arthritidis* bacteriophage MAV1 genome identifies the putative virulence factor. *Gene*, **233**, 101-107.
168. Clapper, B., Tu, A. H., Simmons, W. L. and Dybvig, K. 2004, Bacteriophage MAV1 is not associated with virulence of *Mycoplasma arthritidis*. *Infection and immunity*, **72**, 7322-7325.
169. Clapper, B., Tu, A. H., Elgavish, A. and Dybvig, K. 2004, The vir gene of bacteriophage MAV1 confers resistance to phage infection on *Mycoplasma arthritidis*. *Journal of bacteriology*, **186**, 5715-5720.
170. Kelly, S., Sullivan, J., Ronson, C., et al. 2014, Genome sequence of the Lotus spp. microsymbiont *Mesorhizobium loti* strain R7A. *Standards in genomic sciences*, **9**, 6.
171. Burrus, V., Pavlovic, G., Decaris, B. and Guedon, G. 2002, The ICES_{t1} element of *Streptococcus thermophilus* belongs to a large family of integrative and conjugative elements that exchange modules and change their specificity of integration. *Plasmid*, **48**, 77-97.
172. Burrus, V. 2017, Mechanisms of stabilization of integrative and conjugative elements. *Current opinion in microbiology*, **38**, 44-50.
173. Delavat, F., Miyazaki, R., Carraro, N., Pradervand, N. and van der Meer, J. R. 2017, The hidden life of integrative and conjugative elements. *FEMS microbiology reviews*, **41**, 512-537.
174. Johnson, C. M. and Grossman, A. D. 2015, Integrative and Conjugative Elements (ICEs): What they do and how they work. *Annu. Rev. Genet.*, **49**, 577-601.
175. Lee, C. A., Babic, A. and Grossman, A. D. 2010, Autonomous plasmid-like replication of a conjugative transposon. *Molecular microbiology*, **75**, 268-279.

176. Dahmane, N. 2017, Caractérisation des éléments intégratifs conjugatifs de la famille ICESt3 et des facteurs influençant leur mobilité. Université de Lorraine.
177. Guerillot, R., Siguier, P., Gournbeyre, E., Chandler, M. and Glaser, P. 2014, The diversity of prokaryotic DDE transposases of the mutator superfamily, insertion specificity, and association with conjugation machineries. *Genome Biol. Evol.*, **6**, 260-272.
178. McCullen, C. A. and Binns, A. N. 2006, *Agrobacterium tumefaciens* and plant cell interactions and activities required for interkingdom macromolecular transfer. *Annual review of cell and developmental biology*, **22**, 101-127.
179. Li, Y. G. and Christie, P. J. 2018, The *Agrobacterium* VirB/VirD4 T4SS: mechanism and architecture defined through in vivo mutagenesis and chimeric systems. *Current topics in microbiology and immunology*, **418**, 233-260.
180. Auchtung, J. M., Aleksanyan, N., Bulku, A. and Berkmen, M. B. 2016, Biology of ICEBs1, an integrative and conjugative element in *Bacillus subtilis*. *Plasmid*, **86**, 14-25.
181. Christie, P. J. 2016, The mosaic type IV secretion systems. *EcoSal Plus*, **7**.
182. Chandran Darbari, V. and Waksman, G. 2015, Structural biology of bacterial type IV secretion systems. *Annual review of biochemistry*, **84**, 603-629.
183. Fronzes, R., Schafer, E., Wang, L., Saibil, H. R., Orlova, E. V. and Waksman, G. 2009, Structure of a type IV secretion system core complex. *Science*, **323**, 266-268.
184. Goessweiner-Mohr, N., Arends, K., Keller, W. and Grohmann, E. 2014, Conjugation in Gram-positive bacteria. *Microbiology spectrum*, **2**, PLAS-0004-2013.
185. Minoia, M., Gaillard, M., Reinhard, F., Stojanov, M., Sentchilo, V. and van der Meer, J. R. 2008, Stochasticity and bistability in horizontal transfer control of a genomic island in *Pseudomonas*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **105**, 20792-20797.
186. Beaber, J. W. and Waldor, M. K. 2004, Identification of operators and promoters that control SXT conjugative transfer. *Journal of bacteriology*, **186**, 5945-5949.
187. Seth-Smith, H. M., Fookes, M. C., Okoro, C. K., et al. 2012, Structure, diversity, and mobility of the *Salmonella* pathogenicity island 7 family of integrative and conjugative elements within Enterobacteriaceae. *Journal of bacteriology*, **194**, 1494-1504.
188. Chuzeville, S., Dramsi, S., Madec, J. Y., Haenni, M. and Payot, S. 2015, Antigen I/II encoded by integrative and conjugative elements of *Streptococcus agalactiae* and role in biofilm formation. *Microbial pathogenesis*, **88**, 1-9.
189. Sullivan, J. T., Trzebiatowski, J. R., Cruickshank, R. W., et al. 2002, Comparative sequence analysis of the symbiosis island of *Mesorhizobium loti* strain R7A. *Journal of bacteriology*, **184**, 3086-3095.

190. 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.
191. Baranowski, E., Dordet-Frisoni, E., Sagne, E., et al. 2018, The integrative conjugative element (ICE) of *Mycoplasma agalactiae*: key elements involved in horizontal dissemination and influence of coresident ICEs. *mBio*, **9**.
192. Calcutt, M. J. and Foecking, M. F. 2015, An excision-competent and exogenous mosaic transposon harbors the tetM gene in multiple *Mycoplasma hominis* lineages. *Antimicrob. Agents Ch.*, **59**, 6665-6666.
193. Li, Y., Zheng, H., Liu, Y., et al. 2011, The complete genome sequence of *Mycoplasma bovis* strain Hubei-1. *PloS one*, **6**, e20999.
194. Wise, K. S., Calcutt, M. J., Foecking, M. F., Roske, K., Madupu, R. and Methe, B. A. 2011, Complete genome sequence of *Mycoplasma bovis* type strain PG45 (ATCC 25523). *Infect. Immun.*, **79**, 982-983.
195. Dordet-Frisoni, E., Sagne, E., Baranowski, E., et al. 2014, Chromosomal transfers in mycoplasmas: when minimal genomes go mobile. *mBio*, **5**, e01958.
196. Pereira, A. L., Carazzolle, M. F., Abe, V. Y., et al. 2014, Identification of putative TAL effector targets of the citrus canker pathogens shows functional convergence underlying disease development and defense response. *BMC genomics*, **15**, 157.
197. Doyle, E. L., Stoddard, B. L., Voytas, D. F. and Bogdanove, A. J. 2013, TAL effectors: highly adaptable phytochemical virulence factors and readily engineered DNA-targeting proteins. *Trends Cell. Biol.*, **23**, 390-398.
198. Bébéar, C. M., Renaudin, H., Charron, A., Bove, J. M., Bébéar, C. and Renaudin, J. 1998, Alterations in topoisomerase IV and DNA gyrase in quinolone-resistant mutants of *Mycoplasma hominis* obtained in vitro. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **42**, 2304-2311.
199. Rideau, F. 2018, Développement d'outils génétiques chez *Mycoplasma hominis* via la biologie de synthèse. Université de Bordeaux.
200. Rideau, F., Le Roy, C., Sagné, E., et al. 2019, Random insertion of plasposon in *Mycoplasma hominis* minimal genome leads to large DNA rearrangements. *Scientific reports*, In Revision.
201. Faucher, M. 2018, Le transfert horizontal de gènes chez les mycoplasmes: de l'acquisition de l'antibiorésistance à la dynamique des génomes. Université de Toulouse.
202. Teachman, A. M., French, C. T., Yu, H., Simmons, W. L. and Dybvig, K. 2002, Gene transfer in *Mycoplasma pulmonis*. *Journal of bacteriology*, **184**, 947-951.

203. Zimmerman, C. U. and Herrmann, R. 2005, Synthesis of a small, cysteine-rich, 29 amino acids long peptide in *Mycoplasma pneumoniae*. *FEMS microbiology letters*, **253**, 315-321.
204. Tanford, C. and Reynolds, J. A. 1976, Characterization of membrane proteins in detergent solutions. *Biochimica et biophysica acta*, **457**, 133-170.
205. Gopal, G. J. and Kumar, A. 2013, Strategies for the production of recombinant protein in *Escherichia coli*. *The protein journal*, **32**, 419-425.
206. Boch, J., Scholze, H., Schornack, S., et al. 2009, Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. *Science*, **326**, 1509-1512.

Characterization of integrative conjugative elements (ICE) in *Mycoplasma hominis*

Mycoplasmas are small-genome bacteria derived from Gram-positive ancestors by a succession of genetic material losses. It has long been considered that genetic reduction was the only force governing the evolution of these bacteria, however, horizontal transfers of large chromosomal regions within and between mycoplasma species have recently been reported. Conjugative and integrative elements (ICE) found in some species of mycoplasma may be responsible for these transfers. These ICEs encode the systems necessary for excision, conjugative transfer and integration into a recipient cell.

Mycoplasma hominis is a commensal genital mycoplasma that can be responsible for gynecological infections, neonatal infections and extragenital infections. Preliminary analysis of *M. hominis* genomes had showed the presence of coding regions characteristic of ICEs. The objectives of this thesis were to search for and characterize ICEs in one reference strain and 11 fully sequenced *M. hominis* clinical isolates and to determine the prevalence of these ICEs in the *M. hominis* species. To do so, a retrospective study over a period of 6 years was conducted on clinical isolates collected at the Bordeaux University Hospital. The minimum inhibitory concentrations of tetracyclines and fluoroquinolones as well as resistance mechanisms were determined, providing a collection of clinical isolates characterized for the study of ICEs.

ICEs of 27-30 kpb were found in one or two copies in seven of the 12 *M. hominis* sequenced strains. Only five of these ICEs seemed functional since circular forms of extrachromosomal ICE were detected. All *M. hominis* ICEs exhibited a similar structure consisting of a 4.0-5.1 kb module composed of five to six juxtaposed CDSs, encoding proteins that share common structural features with transcription activator-like (TAL) effectors, involved in polynucleotide recognition and signal transduction in symbiotic bacteria. The characterization of antibiotic resistance mechanisms in *M. hominis* clinical isolates collected at Bordeaux University Hospital enabled us to obtain a collection of 183 isolates isolated between 2010 and 2015, of which 14.8% harbored the *tet*(M) gene responsible for tetracycline resistance, 2.7% were resistant to levofloxacin and 1.6% were resistant to moxifloxacin by mutation in topoisomerase IV and DNA gyrase genes. Screening of 120 of these clinical isolates revealed a high prevalence of ICEs in *M. hominis*, measured to be 45%. The proportion of ICEs was not higher in isolates carrying the *tet* (M) gene, suggesting that ICEs were not responsible for the spread of tetracycline resistance.

Additional mating experiments will be necessary to confirm the functionality of the ICEs found in the *M. hominis* species. However, the conserved and specific structure of *M. hominis* ICEs and the high prevalence in clinical strains suggest that these ICEs may confer a selective advantage for the physiology or pathogenicity of the bacteria. This work opens the way for future studies that will provide a better understanding of horizontal gene transfers and virulence factors in *M. hominis*.

Keywords: *Mycoplasma hominis* / ICE (integrative and conjugative element) / Prevalence of resistances

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

Caractérisation d'éléments conjugatifs intégratifs (ICE) chez *Mycoplasma hominis*

Les mycoplasmes sont des bactéries à petit génome dérivées d'ancêtres à Gram positif par une succession de pertes de matériel génétique. Il a longtemps été considéré que la réduction génétique était la seule force régissant l'évolution de ces bactéries, cependant, des transferts horizontaux de grandes régions chromosomiques au sein et entre les espèces de mycoplasmes ont été récemment mis en évidence. Des éléments conjugatifs et intégratifs (ICE) découverts chez certaines espèces de mycoplasme pourraient être à l'origine de ces transferts. Ces ICEs codent les systèmes nécessaires pour leur excision, leur transfert conjugatif et leur intégration dans la cellule receveuse.

Mycoplasma hominis est un mycoplasme commensal des voies génitales qui peut être responsable d'infections gynécologiques, d'infections néonatales et d'infections extragénitales. L'analyse préliminaire de génomes de *M. hominis* avait montré la présence de régions codantes caractéristiques des ICEs. Les objectifs de cette thèse étaient de rechercher et caractériser les ICEs chez 12 isolats cliniques de *M. hominis* entièrement séquencés et de déterminer la prévalence de ces ICEs au sein de l'espèce *M. hominis*. Pour cela, une étude rétrospective sur une période de 6 ans a été menée sur des isolats cliniques obtenus au CHU de Bordeaux. Les concentrations minimales inhibitrices des tétracyclines et des fluoroquinolones ainsi que les mécanismes de résistance ont été déterminés, permettant de disposer d'une collection d'isolats cliniques caractérisés pour l'étude des ICEs.

Des ICEs de près de 30 kpb ont été trouvés en une ou plusieurs copies dans sept des 12 souches de *M. hominis* séquencées. Seulement cinq de ces ICEs semblaient fonctionnels puisqu'une forme circulaire a pu être détectée. Tous les ICEs de *M. hominis* présentaient une structure similaire avec un module spécifique de *M. hominis* d'environ 4-kpb, codant des protéines ayant des caractéristiques structurales similaires à des effecteurs TAL (transcription activator-like), impliqués dans la reconnaissance de nucléotides et dans la transduction de signaux chez les bactéries symbiotiques. La caractérisation des mécanismes de résistance aux antibiotiques des isolats cliniques de *M. hominis* collectés au CHU de Bordeaux nous a permis de disposer d'une collection de 183 isolats isolés entre 2010 et 2015, parmi lesquels 14,8% étaient porteur du gène *tet(M)* responsable de la résistance aux tétracyclines, 2,7% étaient résistants à la lévofloxacine et 1,6% étaient résistants à la moxifloxacine par mutation des gènes de la topoisomérase IV et de l'ADN gyrase. Le screening de 120 de ces isolats cliniques a révélé une prévalence élevée des ICEs dans l'espèce *M. hominis*, mesurée à 45%. Il n'y avait pas de prédominance des ICEs dans les isolats portant le gène *tet(M)*, suggérant que les ICEs n'étaient pas responsables de la dissémination de la résistance à la tétracycline.

Des expériences complémentaires de conjugaison seront nécessaires pour confirmer la fonctionnalité des ICEs retrouvés dans l'espèce *M. hominis*. Cependant, la forte prévalence et le caractère très conservé des ICEs chez *M. hominis* suggèrent que ces ICEs pourraient conférer un avantage sélectif pour la physiologie ou la physiopathologie de la bactérie. Ce travail ouvre ainsi la voie à de futures études qui permettront une meilleure compréhension des transferts horizontaux de gènes et des facteurs de virulence chez *M. hominis*.

Mots clés : *Mycoplasma hominis* / ICE (élément intégratifs et conjugatifs)/ Prévalence des résistances

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