



**Etude de l'interaction de Mycoplasma hominis PG21
avec les cellules dendritiques humaines. :
Caractérisation de la fraction bioactive du mycoplasme
et réponse immunitaire innée de la cellule**

Julien Goret

► **To cite this version:**

Julien Goret. Etude de l'interaction de Mycoplasma hominis PG21 avec les cellules dendritiques humaines. : Caractérisation de la fraction bioactive du mycoplasme et réponse immunitaire innée de la cellule. Maladies infectieuses. Université de Bordeaux, 2015. Français. <NNT : 2015BORD0386>. <tel-01390446>

HAL Id: tel-01390446

<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01390446>

Submitted on 2 Nov 2016

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 SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE
SPÉCIALITÉ MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE

Par Julien GORET

**Etude de l'interaction de *Mycoplasma hominis* PG21
avec les cellules dendritiques humaines :
caractérisation de la fraction bioactive du mycoplasme
et réponse immunitaire innée de la cellule**

Sous la direction de : Madame le Docteur Sabine PEREYRE

Soutenue le 7 décembre 2015

Membres du jury :

Dr CITTI Christine, Directeur de Recherche à l'INRA de Toulouse
Dr TARDY Florence, Directeur de Recherche à l'ANSES de Lyon
Pr BLANCO Patrick, PU-PH à l'Université de Bordeaux
Dr PILO Paola, Docteur à l'Université de Bern
Dr BEVEN Laure, MCU à l'INRA de Villenave d'Ornon
Dr PEREYRE Sabine, MCU-PH à l'Université de Bordeaux

Président et rapporteur
Rapporteur
Examinateur
Examinateur
Examinateur
Examinateur

A mon grand-père Georges (1922-2014)

REMERCIEMENTS

Je tiens, en premier lieu, à exprimer toute ma reconnaissance à Madame le Professeur Cécile Bébéar, Directeur de l'USC EA3671 INRA, Infections humaines à mycoplasmes et chlamydiae de l'Université de Bordeaux et Praticien Hospitalier au Centre Hospitalier Universitaire de Bordeaux pour l'intérêt et l'attention particulière que vous avez portés à mon parcours et pour m'avoir accueilli au sein de votre équipe pour la réalisation de cette thèse. Je vous remercie vivement pour la confiance que vous n'avez cessée de me témoigner. Soyez assurée de ma sincère et respectueuse gratitude.

Je remercie Madame le Docteur Christine Citti, directrice adjointe de l'UMR 1225, INRA, Interactions Hôtes - Agents Pathogènes de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse pour l'honneur que vous me faites en présidant ce jury de thèse.

J'adresse mes remerciements à Madame le Docteur Florence Tardy, Directeur de Recherche de l'UMR Mycoplasmoses des Ruminants à l'ANSES de Lyon pour l'honneur que vous me faites en acceptant d'être rapporteur de ma thèse et de juger mon travail.

J'adresse mes remerciements à Monsieur le Professeur Patrick Blanco, Professeur des Universités et Praticien Hospitalier au Centre Hospitalier Universitaire de Bordeaux, chef d'équipe à l'UMR CNRS 5164 Composantes Innées de la Réponse Immunitaire et de la Différenciation de 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 Madame le Docteur Paola Pilo de l'Institut für Veterinär-Bakteriologie de l'Université de Bern 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 Madame Laure Béven, Maître de Conférence à l'UMR 1332, Unité Biologie du Fruit et Pathologie, INRA de l'Université de Bordeaux pour l'honneur que tu me fais en acceptant d'être examinateur de ma thèse et de juger mon travail. Je te remercie vivement de m'avoir fait part de tes connaissances, de ta rigueur de travail, de tes conseils avisés ainsi que de ton soutien pour la réalisation de ce travail. Sois assurée de mes profonds remerciements et de l'estime que je te porte.

Mes sincères remerciements s'adressent aussi à Sabine Pereyre, Maître de Conférences à l'USC EA3671 INRA, Infections humaines à mycoplasmes et chlamydiae de l'Université de Bordeaux et Praticien Hospitalier au Centre Hospitalier Universitaire de Bordeaux pour avoir encadré ce travail avec beaucoup d'attention, de patience, et de rigueur scientifique en me prodiguant conseils et encouragements tout en me laissant une grande liberté dans mes choix théoriques et méthodologiques. J'ai eu plaisir à travailler et apprendre à tes côtés. Sois assurée de ma profonde amitié.

Je remercie vivement toute l'équipe de l'unité EA3671 Infections humaines à mycoplasmes et chlamydiae de l'Université de Bordeaux pour le plaisir que j'ai eu à travailler avec eux durant ces trois années. Je remercie Brigitte Couderc, Nadège Henin, Cécile Nadalié et Charles Cazanave. J'ai une pensée particulière pour Chloé Le Roy, Arabella

Touati et Hélène Renaudin pour leur disponibilité, leur compétence et leur aide constante.

Je remercie tous ceux qui ont contribué ou collaboré à cette thèse tant d'un point de vue méthodologique que théorique. Je remercie Pascal Sirand Pignet de l'UMR 1332, Biologie du Fruit et Pathologie, INRA de l'Université de Bordeaux pour ses lumières sur le génome de Mycoplasma hominis. Je remercie particulièrement les membres de l'UMR CNRS 5164 Composantes Innées de la Réponse Immunitaire et de la Différenciation de l'Université de Bordeaux pour m'avoir aid e   maîtriser la partie immunologique de ce travail : un grand merci à Isabelle Douchet, Clément Jacquemin, Cécile Contin-Bordes, Marie-Elise Truchetet, Myriam Capone, Sophie Daburon et Benjamin Faustin. J'adresse ma sympathie à l'équipe de l'UMR 5234 Microbiologie Fondamentale et Pathog enicit  de l'Université de Bordeaux pour l'aide précieuse concernant la manipulation des ARN : merci à Michel Ventura, Cyril Masante et Chloé Jaubert. Je remercie Stéphane Claverol de la Plateforme Génomique Fonctionnelle de l'Université de Bordeaux pour sa disponibilité et ses conseils concernant la spectrométrie de masse. Enfin, j'adresse mes remerciements à l'ensemble de l'équipe Biologie du Fruit et Pathologie de l'INRA pour son accueil avec sympathie et m'avoir permis de travailler dans de bonnes conditions.

En parallèle de ce travail universitaire, j'ai eu le plaisir d'exercer mes fonctions au Laboratoire de Bactériologie du Centre Hospitalier Universitaire de Bordeaux. Je tenais à remercier particulièrement Monsieur le Professeur Francis Mégraud, Chef de Service, de m'avoir accueilli au sein de son équipe et de m'avoir témoigné confiance et estime. Un vif merci à mes collègues biologistes pour leur sympathie, leur soutien et le partage de leurs savoirs et compétences : merci à Bertille de Barbeyrac, Véronique Dubois, Philippe Lehours, Emilie Bess de, Olivia Peuchant, Delphine Chrisment, Pauline Floch, Françoise Obeniche et Nassima Bela di ainsi que l'ensemble de l'équipe technique.

J'ai une pensée pour les 36 internes à qui j'ai eu le plaisir de transmettre ma passion de la Microbiologie. Je remercie plus particulièrement les chaminous, Thibaut, Charlotte, Julie, Mariya, Hugo, Cécile, Maeva, Gaspard, Bastien, Anne et Alexandre avec qui il est si bon de partager professionnellement, humainement et amicalement autour de bons vins et champagnes.

Je tenais à dédier ce travail à ceux qui me soutiennent et m'entourent depuis de nombreuses années.

A mon grand-père pour son estime.

A mes parents, à mon frère et   ma famille pour la confiance sans faille et votre présence rassurante dans les moments difficiles.

A mon épouse Caroline, pour ton soutien indéfectible tout au long de ce travail. Tu me fais l'honneur de partager ma vie et de comprendre mes tourments avec bienveillance et confiance.

A ma fille Anna, qui est venue pimenter ce travail de ses rires et de ses charmes.

A ceux avec qui j'ai partagé ces années d'études à Bordeaux et avec qui il est toujours bon de se remémorer ces souvenirs en envisageant l'avenir avec drôlerie et dérision. A Olivia, Antoine, Fabienne, Cédric, Vincent, Jonathan, Marie, Vanessa, David et Laura.

A Adeline, Jérome, Nino et Alban pour leur bienveillance et leur gentillesse.

A mes anciens co-internes qui ne me demandent plus pourquoi je passe une seconde thèse. A Fabien, Brigitte, Adrien, Felix, Marie, Guillaume, Mamy, Malika.

LISTE DES ABREVIATIONS

| | |
|----------|--|
| ABC | ATP binding cassette |
| ADI | Arginine déiminase |
| ADH | Arginine dihydrolase |
| ADN | Acide désoxyribonucléique |
| ADNr | Acide désoxyribonucléique ribosomique |
| ADP | Adénosine diphosphate |
| AIM2 | Absent in melanoma 2 |
| ARN | Acide ribonucléique |
| ARNr | Acide ribonucléique ribosomique |
| ASC | Apoptosis-associated speck-like protein |
| ATCC | American Type Culture Collection |
| ATP | Adénosine triphosphate |
| BIR | Baculoviral IAP Repeat |
| CARD | Caspase recrutement and activation domain |
| CDS | Coding DNA Sequence (Séquence codante) |
| CK | Carbamate kinase |
| CHAPS | 3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate |
| CMH | Complexe majeur d'histocompatibilité |
| CPA | Cellule présentatrice d'antigènes |
| DAMPs | Danger-associated molecular patterns (signaux de danger émis par l'hôte) |
| DOC | Désoxycholate de sodium |
| FSL | Fibroblast-stimulating lipopeptide |
| G+C% | Teneur en guanine plus cytosine |
| GM-CSF | Granulocyte macrophage colony-stimulating factor |
| hDCs | Human dendritic cells (cellules dendritiques humaines) |
| HIN | Hematopoietic expression, interferon inducible nature and nuclear localization |
| IFI16 | Interferon-inducible protein 16 |
| IFN | Interféron |
| IFNAR | Interferon- α/β receptor (récepteur IFN- α/β) |
| IL | Interleukine |
| IRF | Interferon (IFN)-regulatory factor |
| IS | Séquence d'insertion |
| kDa | Kilo Dalton |
| kpb | Kilopaire de bases |
| LC-MS/MS | Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem |
| Lgt | Lipoprotéine diacylglycéril transférase |
| Lmp | Large membrane protein |
| Lnt | Lipoprotéine N-acyl transférase |
| LP | Lipoprotéine |
| LPS | Lipopolysaccharide |
| LRR | Leucine rich repeats |
| Lsp | Lipoprotéine signal peptidase |

| | |
|----------------|---|
| MALP | Macrophage-activating lipopeptide |
| MAM | <i>Mycoplasma arthritidis</i> mitogen |
| MDHM | Mycoplasma-Derived High Molecular |
| MLSK | Macrolides, lincosamides, streptogramines et kétolides |
| MSA | Macrophage-stimulating activity (facteur de stimulation macrophagique) |
| MyD88 | Myeloid differentiation factor 88 |
| NAIP | Baculoviral IAP repeat-containing protein |
| NF- κ B | Nuclear factor-kappa B (facteur nucléaire kappa B) |
| NLR | NOD-like receptor (récepteurs de type NOD) |
| NO ou NO• | Oxyde nitrique (radicaux libres) |
| NOD | Nucleotide-binding and oligomerization domain |
| OCT | Ornithine carbamoyl transférase |
| OG | Octyl glucopyranoside |
| PAGE | Polyacrylamide gel electrophoresis (électrophorèse en gel de polycarylamide) |
| PAMP | Pathogen associated molecular pattern |
| PBMC | Peripheral blood mononuclear cells (cellules mononucléées du sang périphérique) |
| PCC | Protein conducting channel |
| PCR | Polymerase chain reaction |
| PE | Protéines extraites |
| PGE2 | Prostaglandine E2 |
| PNE | Protéines non extraites |
| Pré-proLP | Pré-prolipoprotéine |
| Pro-LP | Prolipoprotéine |
| PYD | Domaine pyrine |
| SDS | Sodium dodecyl sulfate |
| Sec | Système de sécrétion général |
| SRP | Signal recognition particule |
| STAT3 | Signal transducer and activator of transcription 3 |
| Tat | Twin arginin protein transport |
| TBK1 | TRAF-family-member-associated NF- κ B activator-binding kinase |
| TCR | T-cell receptor (récepteur des cellules T) |
| TGF | Transforming growth factor |
| Th | T-helper ou T-auxiliaire |
| TIR | Toll-Interleukine 1 receptor |
| TLR | Récepteur Toll-like |
| TM | Transmembranaire |
| TNF | Tumor necrosis factor |
| TRIF | Toll/IL-1R (TIR) domain containing adaptator protein inducing IFN- β |
| TX-100 | Triton X-100 |
| TX-114 | Triton X-114 |
| UCC | Unité de changement de couleur |
| UV | Rayonnement ultra-violet |
| Vaa | Variable adherence-associated |

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES

| | |
|---|-----------|
| REMERCIEMENTS..... | 3 |
| LISTE DES ABREVIATIONS | 5 |
| TABLE DES MATIERES | 7 |
| LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES | 11 |
| INTRODUCTION..... | 13 |
| ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE | 18 |
| 1. Les mycoplasmes et <i>Mycoplasma hominis</i>..... | 19 |
| 1.1. Les mycoplasmes | 19 |
| 1.2. <i>Mycoplasma hominis</i> | 19 |
| 1.2.1. Phylogénie et Taxonomie | 19 |
| 1.2.2. Caractéristiques du génome | 20 |
| 1.2.3. Métabolisme énergétique carboné | 22 |
| 1.2.4. Ecologie et présence à l'état commensal..... | 23 |
| 1.2.5. Manifestations cliniques des infections à <i>M. hominis</i> | 24 |
| 1.2.5.1. Infections urogénitales..... | 24 |
| 1.2.5.2. Infections durant la grossesse..... | 25 |
| 1.2.5.3. Infections chez le nouveau né | 26 |
| 1.2.5.4. Infections extragénitales..... | 27 |
| 1.2.6. Diagnostic bactériologique des infections à <i>M. hominis</i> | 28 |
| 1.2.6.1. Prélèvements..... | 28 |
| 1.2.6.2. Culture et identification | 29 |
| 1.2.6.3. Interprétation des résultats | 30 |
| 1.2.6.4. Diagnostic moléculaire | 31 |
| 1.2.6.5. Diagnostic indirect | 31 |
| 1.2.7. Etude de la sensibilité aux antibiotiques | 32 |
| 1.2.7.1. Méthodes d'étude de la sensibilité aux antibiotiques | 32 |
| 1.2.7.2. Résistances naturelles et antibiotiques actifs..... | 32 |
| 1.2.7.3. Résistances acquises..... | 33 |
| 1.2.8. Traitement | 34 |
| 2. Structure membranaire des mycoplasmes et de <i>M. hominis</i> | 35 |
| 2.1. Caractéristiques des membranes des mycoplasmes | 35 |
| 2.2. Les lipoprotéines membranaires des mycoplasmes | 36 |

| | |
|--|-----------|
| 2.2.1. Structure des lipoprotéines bactériennes | 36 |
| 2.2.2. Biosynthèse des lipoprotéines..... | 37 |
| 2.2.2.1. Structure et rôle du peptide signal..... | 37 |
| 2.2.2.2. Modifications post-transcriptionnelles..... | 37 |
| 2.2.2.3. Translocation des pré-prolipoprotéines du cytoplasme à la membrane plasmique chez <i>M. hominis</i> | 39 |
| 2.2.2.4. Devenir des pré-prolipoprotéines dans la membrane plasmique ... | 40 |
| 2.2.3. Fonctions des lipoprotéines des mycoplasmes..... | 40 |
| 2.2.3.1. Les différentes fonctions..... | 40 |
| 2.2.3.2. Fonctions des lipoprotéines de <i>M. hominis</i> | 40 |
| 2.2.4. Variations de l'expression des lipoprotéines membranaires chez les mycoplasmes | 42 |
| 2.2.4.1. Généralités | 42 |
| 2.2.4.2. Exemple de <i>M. hominis</i> | 45 |
| 3. Le système immunitaire inné humain et les mycoplasmes | 48 |
| 3.1. Le système immunitaire inné | 48 |
| 3.1.1. Définition | 48 |
| 3.1.2. Les cellules dendritiques | 48 |
| 3.1.3. Les Toll-like récepteurs | 49 |
| 3.1.4. Inflammasomes | 51 |
| 3.2. Activation des cellules dendritiques et voies engagées..... | 51 |
| 3.2.1. Signalisation intracellulaire médiée par les TLRs..... | 51 |
| 3.2.2. Activation des inflammasomes | 53 |
| 3.2.2.1. Voie canonique de l'inflammasome..... | 53 |
| 3.2.2.2. Voie non canonique de l'inflammasome..... | 54 |
| 3.2.3. Maturation phénotypique des cellules dendritiques | 55 |
| 3.3. Polarisation du système immunitaire adaptatif | 56 |
| 3.4. Stimulation du système immunitaire inné par <i>M. hominis</i> | 56 |
| 3.4.1. Stimulation du système immunitaire inné par <i>M. hominis</i> entier | 56 |
| 3.4.2. Stimulation du système immunitaire inné par les lipoprotéines membranaires des mycoplasmes du groupe Hominis | 57 |
| 3.4.2.1. <i>M. hominis</i> | 57 |
| 3.4.2.2. <i>M. arthritidis</i> | 58 |
| 3.4.2.3. <i>M. fermentans</i> | 59 |
| 3.4.2.4. Autres mycoplasmes du groupe Hominis | 59 |
| 3.4.3. Interaction des lipoprotéines mycoplasmiques avec les TLRs..... | 60 |
| 3.4.3.1. Affinité des lipoprotéines pour les TLRs | 60 |

| | |
|--|----|
| 3.4.3.2. Relation structure/activité des lipoprotéines bactériennes | 60 |
| 3.4.3.3. Interaction des lipoprotéines de <i>M. hominis</i> avec les TLRs | 62 |
| 3.4.4. Interaction des lipoprotéines mycoplasmaïques avec les inflammasomes..... | 62 |

CHAPITRE 1. LIPOPROTEOME DE SURFACE DE MYCOPLASMA HOMINIS PG21 ET EXPRESSION DIFFERENTIELLE APRES CONTACT AVEC LES CELLULES DENDRITIQUES HUMAINES

| | |
|----------------------------|-----|
| CONTEXTE | 67 |
| ABSTRACT | 69 |
| INTRODUCTION | 70 |
| MATERIALS AND METHODS..... | 72 |
| RESULTS | 76 |
| DISCUSSION | 80 |
| CONCLUSION..... | 84 |
| FUTURE PERSPECTIVE..... | 85 |
| EXECUTIVE SUMMARY..... | 86 |
| TABLES AND FIGURES | 88 |
| REFERENCES..... | 96 |
| SUPPLEMENTARY DATA | 100 |

CHAPITRE 2. ETUDE DE L'INTERACTION DE MYCOPLASMA HOMINIS PG21 AVEC LES CELLULES DENDRITIQUES HUMAINES : FRACTION BIOACTIVE DU MYCOPLASME ET REPONSE IMMUNITAIRE INNEE DE LA CELLULE

| | |
|----------------------------------|-----|
| CONTEXTE | 108 |
| RESUME | 111 |
| INTRODUCTION | 112 |
| MATERIELS ET METHODES | 116 |
| RESULTATS | 121 |
| DISCUSSION | 127 |
| CONCLUSION..... | 132 |
| TABLES ET FIGURES | 133 |
| REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES..... | 147 |
| DONNEES SUPPLEMENTAIRES..... | 152 |

DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES..... 154

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 159

LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES

Liste des tableaux

| | | |
|-------------------|---|----|
| Tableau 1. | Association des mycoplasmes génitaux à différents tableaux cliniques | 24 |
| Tableau 2. | Ecart des concentrations minimales inhibitrices en µg/ml de différents antibiotiques vis-à-vis des mycoplasmes urogénitaux ne possédant pas de résistance aux antibiotiques étudiés | 32 |
| Tableau 3. | Résistance acquise aux antibiotiques chez <i>M. hominis</i> | 33 |
| Tableau 4. | Toll-like récepteurs identifiés chez l'homme et la souris | 49 |
| Tableau 5. | Classification, structure et fonction des récepteurs NLR, nucleotide-binding domain et leucine-rich repeat containing | 51 |
| Tableau 6. | Activation des TLRs par différentes fractions issues de différentes espèces de mycoplasmes | 60 |

Liste des figures

| | | |
|-------------------|---|----|
| Figure 1. | Arbre phylogénétique des mollicutes | 20 |
| Figure 2. | Métabolisme de l'arginine chez <i>M. hominis</i> | 22 |
| Figure 3. | Aspect des colonies de <i>M. hominis</i> sur gélose | 30 |
| Figure 4. | Comparaison de l'organisation moléculaire des enveloppes des bactéries à Gram négatif et de la membrane plasmique des mycoplasmes | 35 |
| Figure 5. | Localisation des lipoprotéines bactériennes | 36 |
| Figure 6. | Structure des lipoprotéines | 36 |
| Figure 7. | Peptide signal chez les bactéries | 37 |
| Figure 8. | Biosynthèse des lipoprotéines bactériennes | 38 |
| Figure 9. | Mécanisme de translocation co-translationnel de <i>M. hominis</i> PG21 déduit de l'annotation du génome | 39 |
| Figure 10. | Biosynthèse et adressage des lipoprotéines chez les bactéries à Gram négatif et les bactéries à Gram positif | 40 |
| Figure 11. | Mécanismes génétiques régissant la variation de phase des protéines de surface des mycoplasmes | 43 |
| Figure 12. | Affinité des récepteurs Toll-like pour les constituants des agents pathogènes | 50 |
| Figure 13. | Signalisation intracellulaire médiée par les récepteurs Toll-like | 52 |
| Figure 14. | Activation des inflammasomes | 53 |
| Figure 15. | Interactions entre la cellule présentatrice d'antigène et le lymphocyte T | 55 |
| Figure 16. | Cellule dendritique immature et mature en microscopie électronique | 55 |
| Figure 17. | Polarisation de l'immunité adaptative | 56 |

INTRODUCTION

Mycoplasma hominis est un mycoplasme humain retrouvé à l'état commensal dans le tractus urogénital de l'homme et de la femme. Cette bactérie opportuniste peut être responsable d'infections du tractus urogénital, principalement chez la femme, d'infections néonatales ou d'infections disséminées notamment chez les immunodéprimés (Pereyre & Bébéar, 2012).

Les mycoplasmes sont caractérisés par l'absence de paroi, leur membrane étant directement exposée au milieu extérieur. Celle-ci contient de nombreuses lipoprotéines qui peuvent être associées à des fonctions de structure, de transport, d'adhésion ou de stimulation du système immunitaire inné (Browning *et al.*, 2011). En effet, tout comme le lipopolysaccharide (LPS) des bactéries à Gram négatif, les lipoprotéines membranaires des mycoplasmes ont une activité potentiellement immunomodulatrice et inflammatoire. Elles ont le pouvoir d'activer des cellules macrophagiques ou dendritiques humaines, d'induire la production de cytokines, d'activer le facteur nucléaire NF- κ B et de polariser le système immunitaire adaptatif (Cole *et al.*, 2005, He *et al.*, 2009, Peltier *et al.*, 2005, Shimizu *et al.*, 2007, Shimizu *et al.*, 2008a, Shimizu *et al.*, 2008b, Truchetet *et al.*, 2011). Il est possible d'extraire ces lipoprotéines de membranes pour étudier leur effet immunomodulateur. Une extraction de vésicules membranaires de mycoplasmes avec des détergents non-dénaturants comme le Triton X-114 (TX-114) permet de séparer les lipoprotéines amphiphiles des autres constituants membranaires. Cette méthodologie a déjà été mise en œuvre pour l'étude du potentiel immunomodulateur de lipoprotéines d'origine mycoplasmique (Cole *et al.*, 2005, Muhlradt *et al.*, 1997) chez *M. arthritidis* (Cole *et al.*, 2005), *M. fermentans* (Liu *et al.*, 2012), *Ureaplasma parvum* (Shimizu *et al.*, 2008b) ou *M. genitalium* (He *et al.*, 2009, Shimizu *et al.*, 2008a). Ainsi, Cole *et al.* (Cole *et al.*, 2005) ont partiellement isolé et purifié chez *M. arthritidis*, espèce phylogénétiquement proche de *M. hominis*, trois facteurs stimulant les macrophages et les cellules dendritiques murines. Chez *U. parvum*, trois lipoprotéines ont pu être identifiées comme participant à l'activité immunomodulatrice de l'extrait TX-114 (Shimizu *et al.*, 2008b); de même, chez *M. genitalium*, une lipoprotéine triacylée a été montrée immunoactive (Shimizu *et al.*, 2008a). Plus récemment, dans la fraction immunomodulatrice extraite chez *M. fermentans* par le TX-114, 21 lipoprotéines ont pu être identifiées par spectrométrie de masse (Liu *et al.*, 2012).

L'effet immunomodulateur de *M. hominis* n'est encore que peu étudié chez l'homme. Les premières études ont permis de montrer que la stimulation de cellules épithéliales par *M. hominis* permet la production de cytokines du chimiotactisme neutrophilique (Kruger & Baier, 1997). De plus, *M. hominis* vivant ou inactivé par la chaleur peut induire la production de TNF- α par une lignée de macrophages murins (Crouse *et al.*, 1998). En 2005, Scott *et al.* (Scott *et al.*, 2005) ont montré que *M. hominis* PG21, inactivé par fixation au paraformaldéhyde, entraîne une maturation des cellules dendritiques humaines et la

sécrétion d'interleukine-10 (IL-10) mais pas d'IL-12. La même année, Peltier *et al.* (Peltier *et al.*, 2005) ont mis en évidence la présence d'un facteur membranaire de stimulation des macrophages humains chez la souche ATCC 33159 de *M. hominis* et l'ont partiellement purifié et caractérisé. Ce facteur de 29 kDa n'a pas été identifié. Récemment, Hasebe *et al.* (Hasebe *et al.*, 2014) ont isolé et purifié une lipoprotéine de 40 kDa correspondant à une forme tronquée de l'adhésine P50 appelée également Variable adherence-associated (Vaa). Cette lipoprotéine tronquée a conservé ses propriétés d'adhésion et induit la production de TNF- α par des cellules macrophagiques humaines. Enfin, des travaux effectués dans notre laboratoire ont montré que la fraction bioactive de *M. hominis* PG21 correspond à la fraction membranaire extraite au TX-114 (Truchetet *et al.*, 2011). Cette fraction entraîne la maturation des cellules dendritiques humaines (hDCs) et la sécrétion de cytokines avec un rapport IL-23/IL-12 très en faveur de l'IL-23. Les lymphocytes T CD4+ cultivés en présence de cellules dendritiques infectées par *M. hominis* PG21 produisent de l'IL-17. Il y aurait ainsi une polarisation de la réponse immunitaire adaptative vers la voie Th17 *via* la sécrétion d'IL-23.

Les lipoprotéines ainsi que d'autres constituants de surface des agents pathogènes tel que le LPS des bactéries à Gram négatif constituent des PAMPs (Pathogen Associated Molecular Pattern) reconnus par les récepteurs PRR (Pattern-Recognition Receptors). Parmi ces PRR, les récepteurs membranaires extracellulaires Toll-like (TLR) participent à la reconnaissance des PAMPs et induisent la stimulation des cellules du système immunitaire inné. Il a été montré que la fraction membranaire de *M. hominis* PG21 extraite au TX-114 entraîne la maturation des hDCs via le TLR2 (Truchetet *et al.*, 2011). De façon concomitante à la stimulation de TLR, un autre groupe de PRR incluant les récepteurs cytosoliques de type NOD-like receptor (NLR) détectent les PAMPs et activent les voies de l'inflammasome. Un inflammasome est un complexe protéique oligomérique qui contrôle l'activation des caspases inflammatoires (caspase 1, caspase 4 et caspase 5) et induit la maturation par protéolyse des cytokines inflammatoires IL-1 β et IL-18. Shimizu *et al.* (Shimizu *et al.*, 2011) ont publié la première étude suggérant que les mycoplasmes activent les voies de l'inflammasome. Ces auteurs ont décrit que *M. pneumoniae* M129 cyto-adhérent aux cellules THP-1 induisait une forte production d'IL-1 β . Bose *et al.* (Bose *et al.*, 2014) ont montré que la toxine CARDS (Community-Acquired Respiratory Distress Syndrome) de *M. pneumoniae* activait l'inflammasome NLRP3 chez des cellules macrophagiques murines. Xu *et al.* (Xu *et al.*, 2013) ont montré que *M. hyorhinae* vivant, traité à la chaleur ou aux UV, ou qu'un extrait membranaire TX-114 de *M. hyorhinae* induisait la production dose-dépendante d'IL-1 β chez des cellules THP-1 par l'activation de l'inflammasome NLRP3. Khare *et al.* (Khare *et al.*, 2012) ont décrit l'activation de la production d'IL-1 β via l'inflammasome NLRP7 chez des

macrophages humains (THP-1 et MF) par *Acholeplasma laidlawii*, un membre de la famille des mollicutes, par des lipopeptides dérivés des mycoplasmes, FSL-1 (fibroblast-stimulating lipopeptide-1) de *M. salivarium* et MALP-2 (macrophage-activating lipopeptide-2) de *M. fermentans*, et par des lipopeptides synthétiques Pam₂CSK4 et Pam₃CSK4. Une liaison au TLR2 était indispensable pour induire la transcription de la pro-IL-1 β et de la pro-IL-18 via le NF- κ B. Enfin, Sugiyama *et al.* (Sugiyama *et al.*, 2015) ont montré que *M. salivarium* ATCC 23064, vivant ou inactivé par la chaleur, pouvait induire la production d'IL-1 β chez des cellules humaines THP-1.

Dans cette thèse, nous avons étudié **l'interaction de *M. hominis* PG21 avec les hDCs** en nous penchant d'une part sur **la fraction du mycoplasme qui active les hDCs** et d'autre part sur **la réponse immunitaire innée des hDCs**.

Nous avons d'abord cherché à déterminer quelles sont les lipoprotéines contenues dans l'extrait TX-114 par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium (SDS-PAGE) et identification par chromatographie liquide couplée à une spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS). Trente-six lipoprotéines ont été détectées sur les 48 annotées *in silico*, incluant trois nouvelles lipoprotéines putatives appartenant à la famille des Lmp-related proteins, soit 75% des protéines annotées *in silico*. Douze lipoprotéines n'ont pas été détectées par cette méthode mais celles-ci étaient toutes transcrites *in vitro* comme indiqué par transcription inverse et PCR quantitative (qRT-PCR).

Nous avons ensuite cherché à déterminer quelles sont les lipoprotéines de *M. hominis* PG21 qui stimulent les hDCs et entraînent une sécrétion d'IL-23. Pour cela, nous avons cherché à enrichir en lipoprotéines bioactives une fraction des vésicules membranaires du mycoplasme par un procédé original de double extraction. Celui-ci reposait sur l'utilisation d'un premier détergent non dénaturant, le N-lauroylsarcosine de sodium ou Sarkosyl, suivie d'une extraction par le TX-114. Les lipoprotéines ont été ensuite séparées par SDS-PAGE. Après identification des sous-fractions immunomodulatrices, leur composition en lipoprotéines a été déterminée par LC-MS/MS. Nous avons déterminé que 20 lipoprotéines étaient potentiellement activatrices des hDCs. Elles étaient réparties en deux groupes de poids moléculaire distincts, un premier groupe de lipoprotéines de masse moléculaire apparente (MMap) de 40 à 100 kDa et un deuxième groupe de MMap de 20 à 35 kDa. La lipoprotéine MHO_4720 pourrait à elle seule expliquer l'activité immunomodulatrice du second groupe. *M. hominis* n'étant à ce jour pas transformable, nous ne pouvions confirmer l'activité de cette lipoprotéine par mutagénèse dirigée. Nous avons donc synthétisé un lipopeptide dérivé de MHO_4720, Pam₂-CGGEKFN, afin d'en étudier

l'activité sur les cellules dendritiques. Ce peptide s'est montré capable d'induire une production d'IL-23 dose dépendante par les hDCs.

Lors de l'interaction des mycoplasmes avec la cellule hôte, quelques études ont rapporté une régulation de l'expression des gènes du mycoplasme codant pour les lipoprotéines (Cecchini *et al.*, 2007, Hallamaa *et al.*, 2008, Madsen *et al.*, 2006). Pour déterminer si ce phénomène se produit chez *M. hominis*, les variations transcriptionnelles des gènes codant pour les 48 lipoprotéines de *M. hominis* PG21 ont été analysées par qRT-PCR après contact du mycoplasme avec les hDCs. Un panel de gènes de référence adaptés à la normalisation de l'expression des gènes de *M. hominis* a préalablement été déterminé. Une surexpression a été observée pour 21 gènes de lipoprotéines après 4h ou 24h de co-incubation. Parmi eux, sept gènes codant pour des lipoprotéines de fonction inconnue étaient spécifiques de *M. hominis* et six gènes étaient potentiellement associés à des fonctions d'adhésion et de capture de nutriments issus de l'hôte. *M. hominis* PG21 régule ainsi l'expression des gènes codant pour ses lipoprotéines lors du processus de colonisation de l'hôte et utiliserait des mécanismes spécifiques d'espèce.

Dans un deuxième temps, la réponse immunitaire innée des hDCs a été évaluée. Nous avons montré que *M. hominis* PG21 induisait une forte production d'IL-1 β , suggérant l'activation d'inflammasomes. Cette production était significativement diminuée par l'utilisation d'YVAD-fmk, inhibiteur des caspases 1 et 5. L'exploration des voies de l'inflammasome a été entreprise par une méthode de PCR array. La comparaison de la transcription des gènes impliqués dans les voies de l'inflammasome chez les hDCs co-incubées 24 h en absence et en présence de *M. hominis* PG21 a confirmé la surexpression des gènes codant pour l'IL-1 β , l'IL-6 et l'IL-12 β , sous-unité commune à l'IL-12 et l'IL-23. Les gènes codant pour le NF- κ B et la caspase 5 étaient surexprimés mais pas celui codant pour la caspase 1. Une inhibition de l'expression des gènes codant pour NLRP3 et la protéine adaptatrice ASC et une surexpression des gènes codant pour la cyclo-oxygénase COX-2 et des chemokines ont également été observées. Ces données suggèrent l'activation d'un inflammasome dépendant de la caspase 5 dont le récepteur reste à identifier ainsi qu'un possible contrôle de l'inflammation lors de la co-incubation des hDCs avec *M. hominis* PG21 pendant 24 heures.

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Les mycoplasmes et *Mycoplasma hominis*

1.1. Les mycoplasmes

Microorganismes ubiquitaires retrouvés chez l'homme, les animaux vertébrés, les arthropodes et les plantes, les mycoplasmes sont des bactéries aux propriétés originales. Le terme « mycoplasma » (grecque ; « mykes » = fungus et « plasma » = forme) a émergé dans les années 1950 et a remplacé le terme de PPLO (PleuroPneumonia-Like Organisms). Appartenant à la classe des *Mollicutes* (du latin *mollis cutis* : peau molle), ils sont dépourvus de paroi d'où leur aspect polymorphe et leur insensibilité totale aux bêta-lactamines. Ce sont les plus petits procaryotes capables de se multiplier de façon autonome. Certains ont été pris pour des virus. C'est le cas de *M. pneumoniae*, cultivé en 1944 sur oeuf embryonné (Eaton *et al.*, 1944) et identifié comme un mycoplasme en 1962 seulement, après culture en milieu acellulaire (Chanock *et al.*, 1962). Récemment, c'est à partir d'un mycoplasme, *M. genitalium*, qu'a été fabriqué en 2007, *M. laboratorium*, première bactérie construite par génie génétique autour d'un chromosome de synthèse (Gibson *et al.*, 2008). Bien que le terme de mycoplasme ne s'applique plus sur le plan taxonomique qu'à un seul genre, le genre *Mycoplasma*, il continue à être utilisé pour désigner l'ensemble des mollicutes ; c'est l'usage qui en sera fait dans cette thèse.

Les mycoplasmes sont largement répandus dans la nature. Chez l'homme, ils colonisent les muqueuses respiratoires et génitales. Dix-huit des 107 espèces connues chez les mycoplasmes ont été isolées chez l'homme. Elles sont classées selon leur site d'isolement ; on distingue ainsi les mycoplasmes respiratoires et les mycoplasmes génitaux. La plupart des mycoplasmes respiratoires n'ont pas de pouvoir pathogène connu (*M. salivarium*, *M. orale*, *M. buccale*, *M. faucium*, *M. lipophilum*, *M. primum*, *A. laidlawii*). Seul *M. pneumoniae* colonise les voies respiratoires basses et possède un pouvoir pathogène certain. Parmi les mycoplasmes génitaux, *Ureaplasma* spp. *M. hominis* et *M. genitalium* ont un pouvoir pathogène avéré. Leur rôle est reconnu dans les infections génito-urinaires. Le diagnostic microbiologique est souvent difficile du fait du caractère fastidieux de la croissance de certaines espèces ou en raison de problèmes d'interprétation.

1.2. *Mycoplasma hominis*

1.2.1. Phylogénie et Taxonomie

Les mycoplasmes sont membres de la classe des Mollicutes remaniée en 1993 sur la base d'études phylogénétiques et phénotypiques (Tully *et al.*, 1993), et qui comprend actuellement 4 ordres, les Mycoplasmatales, Entomoplasmatales, Acholeplasmatales et Anaeroplasmatales séparés d'après leur habitat naturel, leur exigence en stéroïdes et un certain nombre d'autres propriétés. Leur classification a toujours été difficile en raison de

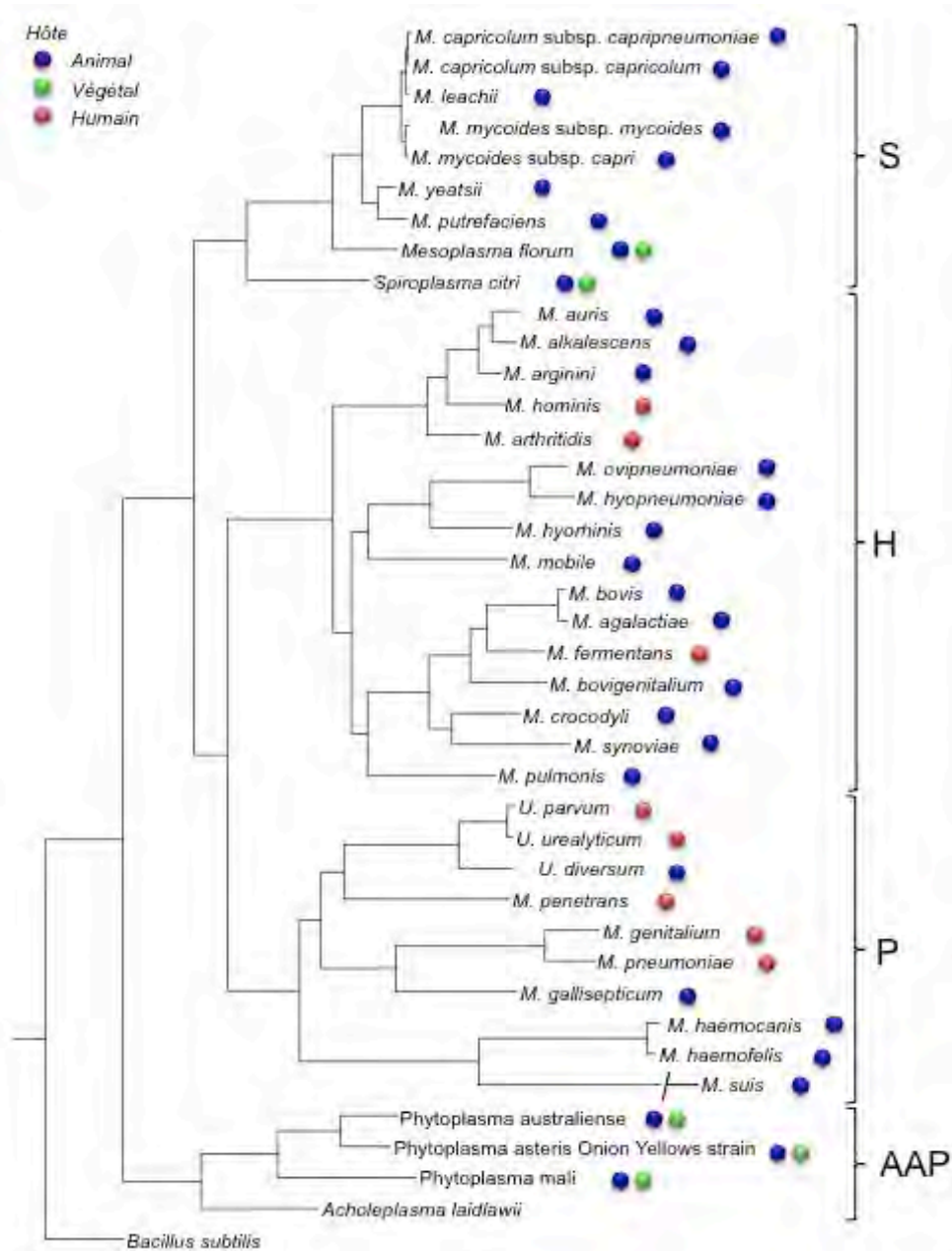


Figure 1. Arbre phylogénétique des mollicutes (adapté de Grosjean *et al.*, 2014). L'arbre phylogénétique a été réalisé par la méthode du maximum de vraisemblance à partir des alignements multiples concaténés de 79 protéines codées par des gènes présents en une copie dans chaque génome. Les principaux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

leurs exigences culturelles et de leur absence de réaction au colorant de Gram. Les mycoplasmes humains appartiennent en très grande majorité à l'ordre des Mycoplasmatales, famille des *Mycoplasmataceae*, qui comprend le genre *Mycoplasma* et *Ureaplasma*.

L'hypothèse de leur évolution à partir d'une bactérie primitive qui aurait existé avant le développement du peptidoglycane n'est plus retenue. L'étude des séquences d'ARN ribosomique (ARNr) 16S permet de penser qu'au contraire les mycoplasmes sont des formes très évoluées, dérivées de bactéries à Gram positif à faible teneur en guanine plus cytosine (G+C%), tels que certains Clostridia, *Clostridium innocum* et *C. ramosum* (Weisburg *et al.*, 1989, Woese *et al.*, 1980) qui sont les espèces les plus proches phylogénétiquement. Les mycoplasmes auraient évolué à partir de ces ancêtres par un processus de réduction de leur génome et de pertes successives de gènes, ayant pour conséquence une perte de leur paroi.

Selon les séquences des ARNr 16S, les Mollicutes sont divisés en cinq groupes phylogénétiques, le groupe Anaeroplasma (plus communément appelé le sous-groupe AAP pour Acholeplasma et Anaeroplasma), le groupe Spiroplasma, le groupe Hominis, le groupe Pneumoniae et le groupe Asteroleplasma (Figure 1) (Weisburg *et al.*, 1989). *M. hominis* appartient au groupe phylogénétique Hominis (Johansson & Pettersson, 2002).

1.2.2. Caractéristiques du génome

Les mycoplasmes se caractérisent par la très petite taille de leur génome dont la séquence complète est connue pour de nombreuses espèces parmi lesquelles tous les mycoplasmes pathogènes pour l'homme. Ainsi, le génome de *M. genitalium* est le plus petit avec 580 kilopaire de bases (kpb) avec une capacité de codage pour 482 gènes (Fraser *et al.*, 1995). Le génome de *M. hominis* PG21 (ATCC 23114), issu d'un portage rectal, a été entièrement séquencé par le laboratoire en 2009 (Pereyre *et al.*, 2009) et possédait le deuxième plus petit génome après *M. genitalium*. Il comprend 665 kpb et code pour seulement 537 gènes : 345 ont une fonction connue, 86 codent pour des protéines conservées hypothétiques, 106 pour des protéines hypothétiques et 14 sont des pseudogènes. Parmi ces gènes, 45 gènes codent pour des lipoprotéines putatives. Le génome présente une teneur en G+C de 27,1%.

L'espèce *M. hominis* apparaît hétérogène. Des analyses par électrophorèse en champ pulsé avaient montré des écarts de taille de génome de plus de 15% selon les souches, allant de 704 à 825 Kpb (Ladefoged & Christiansen, 1992). Les souches de *M. hominis* LBD-4 (ATCC 27545) issue d'hémoculture et de *M. hominis* Sprott (ATCC 33131) issue d'une uréthrite non gonococcique ont été séquencées en 2015 (Calcutt & Foecking, 2015b, Calcutt & Foecking, 2015a). Elles présentent respectivement un génome

de 695 et 715 kpb avec une capacité de codage de 615 et 620 gènes. En 2015, Allen-Daniels *et al.* ont également séquencé trois souches de *M. hominis* (AF1, AF3 et PL5) responsables de chorioamniotites et associées à des naissances prématurées (Allen-Daniels *et al.*, 2015). Leurs génomes ont des tailles allant de 680 à 722 kpb pour 576 à 627 cadres ouverts de lecture. Cette variation de taille pourrait s'expliquer par la présence d'éléments génétiques mobiles tels que des prophages et des séquences d'insertion (IS). Ainsi le génome de la souche de *M. hominis* LBD-4 contient un prophage de 15,9 kpb désigné MHoV-1 apparenté à *M. fermentans* MFV-1 ou *M. arthritidis* MAV-1 (Calcutt & Foecking, 2015a). Le génome de *M. hominis* AF1 contient également une séquence codant pour un prophage hypothétique de 15,2 kpb qui présente une homologie avec le prophage phiMFV1 de *M. fermentans* MFV-1 (Allen-Daniels *et al.*, 2015). Le génome de *M. hominis* PL5 arbore des gènes codant pour un transposon putatif de 26,6 kpb qui partage 96% d'homologie avec un transposon de *Streptococcus agalactiae* (Allen-Daniels *et al.*, 2015). Le génome de la souche Sprott possède des gènes tronqués codant pour des transposases et deux éléments conjugatifs intégratifs (Calcutt & Foecking, 2015b). Le génome des souches AF3 et PG21 ne présente pas de prophage et celui de PG21 ne contient également pas d'IS (Allen-Daniels *et al.*, 2015, Pereyre *et al.*, 2009). Il faut noter que la présence de séquences répétées peut également être à l'origine de la variation de taille des génomes de ces souches.

La composition du génome minimal nécessaire à la survie des mycoplasmes a été évaluée par la comparaison du génome de *M. hominis* PG21 avec celui de *M. genitalium* et de *U. parvum* (Pereyre *et al.*, 2009). Ces trois espèces sont des bactéries pathogènes urogénitales de l'homme présentant des petits génomes. Elles partagent un groupe de gènes communs constituant un « core » de 247 gènes codant pour des protéines intervenant dans les grandes fonctions cellulaires comme le métabolisme de l'ADN, la synthèse des protéines, la synthèse des nucléotides, des systèmes de transports, la capture de substrats et du métabolisme des acides gras et des phospholipides. La plupart de ces 247 gènes communs sont susceptibles d'être essentiels. En effet, 213 de ces 247 gènes (86,2%) ne pouvaient pas être inactivés par mutagenèse aléatoire chez *M. genitalium* (Glass *et al.*, 2006). Les gènes spécifiques de *M. hominis*, *M. genitalium*, et *U. parvum* codent essentiellement pour les enzymes intervenant dans les voies métaboliques et énergétiques telles que l'hydrolyse de l'arginine pour *M. hominis*, l'hydrolyse du glucose pour *M. genitalium* et l'hydrolyse de l'urée pour *U. parvum*. De plus, un certain nombre de gènes impliqués dans la virulence et la cytoadhérence de *M. hominis* ont été retrouvés dans le groupe de gènes spécifiques de cette espèce. Ce sont les lipoprotéines P120, P120', Vaa et les lipoprotéines de la famille des *large membrane proteins* (Lmp).

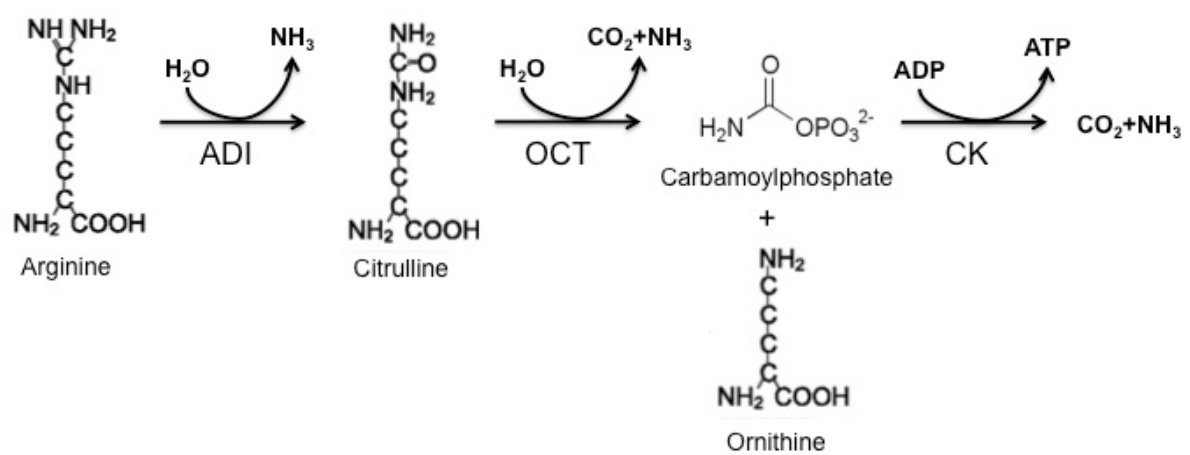


Figure 2. Métabolisme de l'arginine chez *M. hominis*. ADI, arginine déiminase ; OCT, ornithine carbamoyl transférase ; CK, carbamate transférase.

Des gènes auraient été échangés avec l'espèce *U. parvum* par transfert horizontal de gènes (Pereyre *et al.*, 2009). En effet, cinq clusters de gènes sont communs avec cette espèce phylogénétiquement éloignée de *M. hominis*. Il faut noter que ces deux bactéries colonisent toutes deux le tractus urogénital humain. Ainsi le partage de cette même niche naturelle pourrait expliquer le transfert horizontal de gènes comme cela a déjà été démontré pour d'autres mycoplasmes (Sirand-Pugnet *et al.*, 2007a, Sirand-Pugnet *et al.*, 2007b).

1.2.3. Métabolisme énergétique carboné

M. hominis possède un génome minimal et a une capacité métabolique minimale. Il fait partie des mycoplasmes non fermentants, incapables de métaboliser le glucose. L'analyse de son génome a révélé que les voies des pentoses phosphates, du glucose et du fructose sont incomplètes. *M. hominis* PG21 produit son énergie principalement par hydrolyse de l'arginine, qui est considérée comme son nutriment essentiel (Hahn & Kenny, 1974, Johansson & Pettersson, 2002). Ce métabolisme le distingue des autres mycoplasmes urogénitaux, *M. genitalium* et *Ureaplasma* spp., qui respectivement, fermentent le glucose et hydrolysent l'urée. Cette voie d'hydrolyse de l'arginine est mise à profit pour l'identification de l'espèce *M. hominis*. Elle est composée de trois enzymes, l'arginine déiminase (ADI, MHO_0690), l'ornithine carbamoyl transférase (OCT, MHO_0640) et la carbamate kinase (CK, MHO_0630) (Figure 2). L'ADI catalyse la transformation de l'arginine en citrulline par la modification du groupement guanidium. Elle est catabolisée par l'OCT en carbamoyl-phosphate et ornithine. Le carbamoyl-phosphate est dégradé par la CK en CO₂ et NH₃ avec production d'une molécule d'ATP. De plus, une N-diméthylarginine diméthylaminohydrolase (MHO_2540) a été identifiée dans le génome de *M. hominis* PG21 (Pereyre *et al.*, 2009). Cette enzyme pourrait compléter cette voie énergétique en permettant l'utilisation d'un deuxième substrat, la diméthylarginine, qu'elle convertirait en citrulline. Cette enzyme n'est pas présente chez *U. parvum* et *M. genitalium*.

L'inhibition de l'ADI par la canavanine, inhibiteur compétitif, empêche la multiplication de *M. hominis* en milieu de culture liquide (Pereyre *et al.*, 2009). L'arginine est fournie dans ses formes libre et liée à des peptides. L'acide aminé libre pourrait pénétrer dans la cellule par l'intermédiaire d'un transporteur putatif de l'arginine (MHO_5040) qui a été identifié par séquençage de la souche *M. hominis* PG21 (Pereyre *et al.*, 2009). Des gènes codant pour un système de transport potentiel de type Oligopeptide permease protein (Opp) (MHO_1510-1550, MHO_1740 et MHO_1750) ont aussi été mis en évidence dans le génome de *M. hominis* PG21. Ce système permettrait le transport d'oligopeptides contenant de l'arginine, source alternative possible d'arginine.

1.2.4. Ecologie et présence à l'état commensal

La présence à l'état commensal de *M. hominis* et *Ureaplasma spp.* dans les voies génitales basses rend leur 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 (Taylor-Robinson, 2007, Waites & Talkington, 2005). Pour *M. hominis*, le taux de colonisation des femmes au niveau vaginal reste faible, généralement inférieur à 10 %, alors que pour *Ureaplasma spp.* il peut atteindre près de 50 % (Bébéar & Bébéar, 2007). 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.

Des études récentes ont montré que *M. hominis* peut avoir une relation symbiotique avec *Trichomonas vaginalis*, un autre micro-organisme urogénital (Rappelli *et al.*, 1998, Dessi *et al.*, 2005, Dessi *et al.*, 2006, Rappelli *et al.*, 2001, Xiao *et al.*, 2006). Cette relation symbiotique est la première décrite impliquant deux parasites humains obligatoires. Les deux micro-organismes sont indépendamment capables de causer des infections génitales chez l'Homme. Il a été observé que la plupart des infections à *T. vaginalis* sont associées à des co-infections à *M. hominis* (van Belkum *et al.*, 2001). Rappelli *et al.* (Rappelli *et al.*, 2001) ont montré que *T. vaginalis* est capable de transmettre *M. hominis* à des souches de *T. vaginalis* dépourvus de mycoplasmes et à des cellules épithéliales humaines *in vitro*. De plus, Dessi *et al.* (Dessi *et al.*, 2005) ont démontré que *M. hominis* peut se multiplier dans le parasite. *T. vaginalis* pourrait ainsi être un vecteur de la bactérie *in vivo*. *T. vaginalis* et *M. hominis* partagent également un caractère biochimique commun : ils possèdent tous deux la voie de l'arginine dihydrolase (ADH). Dans des conditions d'anaérobiose, *T. vaginalis* peut exploiter la voie de l'ADH pour fournir jusqu'à 10 % de son énergie totale (Yarlett *et al.*, 1996). Des cultures de *T. vaginalis* infectées par *M. hominis* présentent une augmentation de l'activité de la voie ADH par rapport à des cultures non infectées (Morada *et al.*, 2010). Cette relation métabolique et symbiotique permettrait notamment l'échappement aux défenses immunitaires innées de l'hôte. En effet, l'arginine est utilisée par les cellules phagocytaires pour la synthèse d'oxyde nitrique. Sa consommation par *T. vaginalis* et *M. hominis* dans l'environnement vaginal la rendrait indisponible pour cette synthèse (Fiori *et al.*, 2013, Noh *et al.*, 2002, Dillon *et al.*, 2002). D'autre part, cette relation symbiotique permettrait à *M. hominis* d'être protégé de la pression environnementale (Dessi *et al.*, 2005) et d'obtenir des molécules qu'il n'est pas capable de synthétiser, telle que la putrescine. Cette dernière est

Tableau 1. Association des mycoplasmes génitaux à différents tableaux cliniques (d'après Bébéar et al., 2007 et Waites et al., 2013).

| Pathologie | <i>M. hominis</i> | <i>Ureaplasma spp</i> ^a | <i>M. genitalium</i> |
|---|-------------------|------------------------------------|----------------------|
| <u>Infections génitales masculines</u> | | | |
| UNG ^b | - | + | + |
| Epididymites, prostatites | - | ± | ± |
| Infertilité | - | ± | - |
| <u>Infections gynécologiques</u> | | | |
| Vaginose bactérienne | + | - | ± |
| Cervicites | - | - | + |
| Endométrites | + | - | + |
| Salpingites | + | - | + |
| <u>Troubles de la reproduction</u> | | | |
| Chorioamniotites | ± | + | ? |
| Fièvres, endométrites post-partum | + | + | ? |
| Avortement spontané | ± | ± | ± |
| Retard de croissance intra-utérin | - | ± | ? |
| <u>Atteintes néonatales</u> | | | |
| Prématurité - Faible poids de naissance | - | + | ± |
| Infections respiratoires, neurologiques, bactériémies, abcès | + | + | ? |
| Maladie pulmonaire chronique | - | ± | ? |
| <u>Infections extragénitales</u> | | | |
| Arthrites septiques | + | + | + |
| Arthrites réactionnelles | - | + | + |
| Pyélonéphrites | + | - | - |
| Autres localisations (surinfection de plaies sternales, abcès rétropéritonéaux, abcès du cerveau, septicémies...) | + | + | - |

+, association certaine ou rôle causal démontré ; ±, association significative mais rôle causal non démontré ; -, pas d'association ; ?, non déterminé ; ^a Comprend 2 espèces, *U. urealyticum* (ancien biovar 2) et *U. parvum* (ancien biovar 1) ; ^b UNG, urétrite non gonococcique.

synthétisée à partir d'ornithine hydrolysée par l'ODC de *T. vaginalis* absente chez le mycoplasme (Morada *et al.*, 2010).

Cette symbiose aurait également des conséquences cliniques. L'association symbiotique de *T. vaginalis* et de *M. hominis* provoquerait une augmentation synergique des cytokines pro-inflammatoires par les macrophages humains *in vitro* (Fiori *et al.*, 2013), générant un effet cytopathogène plus important (Vancini *et al.*, 2008). Il a été suggéré que la symbiose est associée à une résistance *in vitro* au métronidazole, traitement de première intention dans les trichomoniasés, chez des souches chinoises de *T. vaginalis* (Xiao *et al.*, 2006). Le mécanisme de cette résistance n'a pas été démontré. Une analyse de souches américaines de *T. vaginalis* infectées par *M. hominis* a infirmé cette corrélation (Butler *et al.*, 2010).

1.2.5. Manifestations cliniques des infections à *M. hominis*

1.2.5.1. Infections urogénitales

M. hominis est le mycoplasme le plus souvent en cause dans les infections féminines (Tableau 1). Bien que n'étant pas l'agent de la vaginose bactérienne, *M. hominis* y est fortement associé. Il fait partie des bactéries qui prolifèrent au cours de ce syndrome caractérisé par un déséquilibre de la flore vaginale. *M. hominis* est retrouvé avec des charges plus élevées (jusqu'à 10 000 fois plus) chez deux tiers des patientes atteintes de vaginose bactérienne, contre moins de 10 % chez les femmes indemnes (Pereyre & Bébéar, 2012, Rosenstein *et al.*, 1996). Les mycoplasmes sont naturellement résistants au métronidazole, antibiotique de première intention efficace dans le traitement des vaginoses bactériennes. Cet antibiotique s'avère pourtant efficace dans l'élimination de *M. hominis*. Ceci peut s'expliquer par le fait que *M. hominis* prospère dans les conditions créées par les autres bactéries, et lorsque celles-ci sont éradiquées, il l'est aussi. La présence de mycoplasmes en quantité importante peut être le point de départ d'infections des voies génitales hautes ou d'infection pendant la grossesse (Cf. 1.2.5.2 Infections durant la grossesse). *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 (Taylor-Robinson *et al.*, 1999).

Chez l'homme, la présence de *M. hominis* au niveau urogénital est seulement le reflet d'une colonisation. *M. hominis* est parfois suspecté dans les cas d'urétrites non gonococciques mais sa responsabilité n'est pas démontrée, contrairement à *M. genitalium* et *Ureaplasma* spp. (Srugo *et al.*, 2003, Zdrodowska-Stefanow *et al.*, 2006). C'est également le cas pour les épидидymites. Ainsi Ito *et al.* (Ito *et al.*, 2012) ont étudié l'étiologie infectieuse d'épididymites aiguës chez 56 patients masculins japonais de moins de 40 ans. *Chlamydia*

trachomatis, dont la pathogénicité est reconnue, était le premier agent pathogène responsable (28 patients sur 56). *M. hominis* a été identifié chez six patients mais son rôle dans la pathologie n'était pas clairement défini.

M. hominis serait responsable d'un petit nombre de cas de pyélonéphrites aiguës chez des sujets immunocompétents et sa détection devrait être effectuée quand la recherche de bactéries banales est négative et que les patients présentent des symptômes urinaires (Nassar *et al.*, 2008, Waites & Talkington, 2005, Waites *et al.*, In press). Une obstruction ou un geste invasif au niveau du tractus urinaire peut être un facteur prédisposant (Pereyre & Bébéar, 2012).

1.2.5.2. Infections durant la grossesse

M. hominis peut coloniser le tractus génital humain et être associé à des infections pendant la grossesse où la morbidité et la mortalité néonatale sont importantes. *M. hominis* est souvent associé à *Ureaplasma* spp. dans ces complications. Cependant, comme cette bactérie peut résider dans la flore vaginale normale, son véritable rôle durant la grossesse a longtemps été controversé. Il est aujourd'hui accepté mais la présence seule de ce micro-organismes dans la flore vaginale est considérée comme insuffisante pour expliquer les pathologies (Capoccia *et al.*, 2013). Lors de la grossesse, les changements immunologiques et hormonaux affectent la colonisation du tractus urogénital par *M. hominis*. L'influence des oestrogènes a été démontrée chez la souris comme augmentant cette colonisation (Furr & Taylor-Robinson, 1993). Mais cette notion doit être mise en relation avec les facteurs intervenant dans la prévalence de *M. hominis* chez la femme tels que l'origine ethnique, le niveau socio-économique et l'activité sexuelle. En effet, la prévalence est très variable de 1 à 24% (Choi *et al.*, 2012, Donders *et al.*, 2009, Kacerovsky *et al.*, 2009, Lamont *et al.*, 1987).

M. hominis, ainsi que *Ureaplasma* spp., sont avec certitude responsables de chorioamniotites (Johansson & Pettersson, 2002) et de prématurité. La pénétration des bactéries se fait par voie ascendante à partir du tractus génital. L'atteinte initiale du chorion peut évoluer vers une invasion de la cavité amniotique et une infection du fœtus, responsables d'avortements spontanés. La culture de mycoplasmes à partir du liquide amniotique malgré des membranes intactes était positive chez 13% des femmes ayant eu un travail spontané prématuré (Taylor-Robinson & Lamont, 2011). Les infections à *M. hominis in utero* sont plus fréquentes après une rupture prématurée des membranes. Parmi les femmes qui se présentent avec une rupture prématurée des membranes, la culture était positive dans 32% des cas à l'admission, et augmentait jusqu'à 75% au moment du travail (Taylor-Robinson & Lamont, 2011). Plus l'avortement spontané apparaît tôt pendant la grossesse, plus la fréquence de positivité des cultures de liquide amniotique est élevée, caractérisant le pouvoir pathogène des mycoplasmes.

Les taux d'isolement de mycoplasmes génitaux au niveau du col utérin des femmes à leur première visite prénatale, du nez et de la gorge des nouveau-nés sont inversement proportionnels au poids de naissance. Cependant plusieurs études ont suggéré que les uréaplasmes seuls ont un lien significatif avec une hypotrophie à la naissance particulièrement lorsqu'il y a une infection du liquide amniotique (Dammann *et al.*, 2003, Kirchner *et al.*, 2007, Paul *et al.*, 1998, Kim *et al.*, 2003, Bayraktar *et al.*, 2010). Il est suggéré que la vaginose bactérienne soit plus fortement corrélée au faible poids de naissance que la présence de *M. hominis* (Di Musto *et al.*, 1973, Hillier *et al.*, 1995, Romano *et al.*, 1976).

M. hominis est responsable de fièvre du post-partum ou du post-abortum (Tableau 1) dont la cause la plus commune est une endométrite (Neman-Simha *et al.*, 1992, Waites *et al.*, 2009). La recherche des mycoplasmes génitaux dans le sang plutôt qu'au niveau vaginal est probablement la meilleure façon d'établir une relation avec la fièvre (Taylor-Robinson & Lamont, 2011). Plusieurs études montrent l'isolement dans le sang de *M. hominis* 24 heures ou plus après l'accouchement chez des femmes présentant une fièvre du post-partum (Wallace *et al.*, 1978). En effet, lors du travail, des décharges bactériémiques peuvent survenir. La propagation de *M. hominis* à un site extra-génital est rare mais un retentissement sur l'enfant est plus souvent décrit. Le mycoplasme présent dans le sang de la mère peut être retrouvé dans le prélèvement endotrachéal du bébé (Neman-Simha *et al.*, 1992, Waites *et al.*, 2009).

Des complications du postpartum ont été rapportées. Un cas d'abcès retro-péritonéal a été décrit (Barbera *et al.*, 1995) après accouchement. Des infections à *M. hominis* postopératoires après une césarienne ou une hystérectomie ont été observées. Il s'agit d'infections survenant sur le site de l'incision utérine avec formation d'un abcès ou d'un hématome (Yagihashi *et al.*, 2011, Muin *et al.*, 2015, Koshiba *et al.*, 2011, Yamaguchi *et al.*, 2009). Des localisations extra-génitales à point de départ génital ont également été décrites. Un cas d'arthrite septique en postpartum, une semaine après une césarienne, a été rapporté (Phuah *et al.*, 2007) ainsi que des cas d'empyèmes sous-duraux survenant après un accouchement (Hos *et al.*, 2015, Zheng *et al.*, 1997) ou après curetage utérin (Al Masalma *et al.*, 2011).

1.2.5.3. Infections chez le nouveau né

La colonisation des nouveau-nés par les mycoplasmes génitaux peut se produire *in utero* mais elle est plus fréquente au moment de l'accouchement par voie basse où le nouveau-né se contamine lors du passage vaginal.

M. hominis n'est pas l'agent unique responsable de syndrome de détresse respiratoire du nouveau-né (Taylor-Robinson & Lamont, 2011). Sa présence dans les voies respiratoires peut le faire considérer comme un contributeur de la pathologie quand il est

associé à d'autres mycoplasmes ou à des bactéries responsables de vaginose. En revanche, *M. hominis* peut être responsable de pneumonies chez le nouveau-né (Waites *et al.*, 2005). *M. hominis* est aussi responsable de bactériémies chez les prématurés qui ont été décrites comme secondairement responsables de pneumonies et de méningites (Waites *et al.*, 2005). Peu d'études ont été menées sur *M. hominis*. La plupart des travaux effectués ont porté sur les ureaplasmes dont la présence dans le tractus respiratoire des enfants de faible poids de naissance a été associée avec des pneumonies congénitales évoluant vers une infection pulmonaire chronique et occasionnellement la mort.

M. hominis a été isolé de liquide céphalo-rachidien ou de prélèvement cérébraux d'enfants ayant une infection présumée *in utero* ou ayant été colonisés à la naissance. Ainsi, de nombreux cas de méningites (Hata *et al.*, 2008, Wealthall, 1975, Siber *et al.*, 1977, Gewitz *et al.*, 1979, Hjelm *et al.*, 1980, Kirk & Kovar, 1987, McDonald & Moore, 1988, Waites *et al.*, 1990, Alonso-Vega *et al.*, 1997, Waites *et al.*, 1988), de méningo-encéphalites (Alonso-Vega *et al.*, 1997) et d'abcès cérébraux (Rao *et al.*, 2002) ont été rapportés.

M. hominis est impliqué dans des infections cutanéomuqueuses du nouveau-né. Un abcès du scalp a été rapporté (Abdel-Haq *et al.*, 2002). Le rôle de *M. hominis* dans les conjonctivites néonatales n'a pas été prouvé.

1.2.5.4. Infections extragénitales

Chez l'adulte immunocompétent, les infections extragénitales et systémiques à *M. hominis* sont rares. Elles sont de découverte fortuite. Elles sont évoquées et recherchées lors de l'échec d'une antibiothérapie empirique. Parmi les mycoplasmes urogénitaux, *M. hominis* est l'espèce la plus en cause dans les infections disséminées (Pereyre & Bébéar, 2012). Les infections extragénitales à *M. hominis* comprennent ostéomyélites, abcès rétropéritonéaux et péritonites, surinfections d'hématome, infections vasculaires et sur cathéter, surinfections de plaies sternales avec médiastinite après chirurgie thoracique, infections oculaires, pneumonies, endocardites, péricardites, ventriculites, méningites et abcès du cerveau, habituellement par extension hématogène (Bébéar & Bébéar, 2007, Waites & Talkington, 2005). Ces infections à *M. hominis* surviennent le plus souvent chez les patients immunodéprimés ou transplantés mais non exclusivement. Les sujets dont les barrières anatomiques ont été rompues par traumatisme ou chirurgie peuvent également être touchés (Pailhories *et al.*, 2014, Whitson *et al.*, 2014), même s'ils sont immunocompétents (Mechai *et al.*, 2006).

Des cas d'infections extragénitales à *M. hominis* chez des patients immunodéprimés ont été rapportés (Tableau 1). La mise en cause de l'agent infectieux s'est souvent déroulée rétrospectivement au diagnostic clinique, en l'absence d'autres étiologies ou lors d'échec de l'antibiothérapie mise en place. Les arthrites à *M. hominis* doivent absolument être

considérées chez les patients présentant un déficit partiel ou total en immunoglobulines, congénital ou associé à un traitement immunosuppresseur (Steuer *et al.*, 1996, Sato *et al.*, 2012, Wynes *et al.*, 2013). Des cas d'infections extragénitales à *M. hominis* surviennent dans d'autres types d'immunodépression tels que le lupus érythémateux disséminé (Clough *et al.*, 1992), la transplantation rénale (Mian *et al.*, 2005), les lymphomes (MacKenzie *et al.*, 2010) ou la drépanocytose (Neumayr *et al.*, 2003). Chez ces patients, des cas d'arthrites septiques sont surtout décrits. Quarante pour cent des cas d'arthrites chez ces patients immunodéprimés seraient dus aux mycoplasmes (Pereyre & Bébéar, 2012). La présence de *M. hominis* a été démontrée par culture ou par biologie moléculaire, mais les *Ureaplasma* spp. constituent les espèces les plus fréquemment retrouvées (Pereyre & Bébéar, 2012). La pathologie articulaire peut devenir systémique. Ainsi Sato *et al.* (Sato *et al.*, 2012) ont décrit un cas de méningite secondaire à une pathologie articulaire chez un patient hypogammaglobulinémique. Le diagnostic différentiel des polyarthrites chez les patients atteints d'hypogammaglobulinémie doit donc rechercher une infection à mycoplasmes par culture et méthodes de biologie moléculaire.

1.2.6. Diagnostic bactériologique des infections à *M. hominis*

La présence des mycoplasmes à l'état commensal au niveau du tractus urogénital rend difficile l'appréciation de leur pouvoir pathogène. Le diagnostic biologique a donc pour objectif de mettre en évidence les mycoplasmes responsables d'un état pathologique en tenant compte de leur présence à l'état commensal. Une appréciation quantitative aide à l'interprétation des résultats bactériologiques (Bébéar & Bébéar, 2007). Cette analyse quantitative repose sur la culture en milieu liquide ou solide adapté. Cette technique est aujourd'hui renforcée par l'utilisation d'outils de biologie moléculaire.

1.2.6.1. Prélèvements

Les fluides biologiques, les écouvillonnages et les biopsies de tissus sont appropriés à la recherche et à la culture de mycoplasmes. Il est important de noter que les mycoplasmes sont des bactéries qui adhèrent aux cellules. Tout prélèvement par écouvillonnage doit donc ramener des cellules. *M. hominis* peut être recherché à partir de prélèvements vaginaux, cervicovaginaux, endométriaux, brossage tubaire, liquide de Douglas, liquide amniotique, placenta, prélèvements endotrachéaux (chez le nouveau-né notamment) mais aussi liquide céphalorachidien (LCR), liquides articulaires, biopsies synoviales, prélèvements cutanéomuqueux ou sang (Pereyre & Bébéar, 2012).

Les mycoplasmes sont très sensibles à la dessiccation et la culture doit être réalisée sans délai. Si l'ensemencement ne peut s'effectuer rapidement, le prélèvement doit être placé en milieu de transport adapté directement au lit du malade. Le milieu saccharose-phosphate enrichi de 5% de sérum de veau fœtal, sans antibiotique ou le milieu de transport

universel UTM conviennent à la fois à la mise en culture et aux PCR (Waites *et al.*, 2011, Waites *et al.*, 2001).

Les échantillons liquides ne nécessitent pas de milieu de transport spécial si la culture peut être effectuée dans l'heure et s'ils sont protégés de l'évaporation. Les tissus et biopsies, placés en flacons stériles clos, doivent être transmis sans attente au laboratoire sinon ils doivent être placés en milieu de transport. Les milieux classiques pour hémocultures contiennent des anticoagulants (Sodium Polyanétholsulfonate SPS 0,035% w/v : flacon Bactec Aérobie) qui ont un effet inhibiteur sur la croissance des mycoplasmes. Leur utilisation est donc conditionnée par un repiquage systématique sur milieux adaptés aux mycoplasmes dès leur arrivée au laboratoire (Neman-Simha *et al.*, 1992, Waites *et al.*, 2001). Il est préférable d'ensemencer directement le sang sur des milieux adaptés à la culture de mycoplasmes.

Les échantillons peuvent être conservés à +4°C pendant 48 heures maximum, et au delà, à -80°C (Bébéar & Quentin, 2015). La congélation limite la perte de viabilité et minimise la contamination bactérienne si le prélèvement est issu d'un site non stérile.

1.2.6.2. Culture et identification

Les milieux de culture sont complexes et rendus sélectifs par addition d'une β -lactamine et parfois de polymyxine ou d'amphotéricine B. *M. hominis* croît sur milieu de Hayflick modifié (Bébéar & Quentin, 2015, Waites *et al.*, 2001) contenant 20% de sérum de poulain ou sur le milieu commercialisé SP-4, plus complexe, renfermant du sérum de veau fœtal (Bébéar & Quentin, 2015, Waites *et al.*, 2001). Les milieux liquides, à pH 7,0-7,2, renferment de l'arginine et un indicateur coloré, le rouge de phénol. *M. hominis* peut occasionnellement croître sur gélose au sang, donnant de très petites colonies dont les bactéries ne sont pas colorables au Gram. Il se développe aussi sur les milieux plus acides utilisés pour *Ureaplasma* spp. tel que le milieu de Shepard contenant de l'urée (Bébéar & Quentin, 2015, Waites *et al.*, 2001).

En pratique de laboratoire, des cultures liquides et solides sont entreprises en parallèle. En milieu liquide, la détection de la croissance se fait en 18 à 48 h par virage de l'indicateur coloré. *M. hominis* hydrolyse l'arginine en ammoniaque entraînant une alcalinisation du milieu de culture et le virage de l'indicateur coloré de l'orange au rose framboise. Le prélèvement est dilué en série dans du milieu Hayflick pour la quantification. La positivité de la culture 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 μ m 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 (Figure 3). L'aspect des colonies peut néanmoins être variable.



Figure 3. Aspect des colonies de *M. hominis* sur gélose (Waites *et al.*, 2009).

L'identification de l'espèce se fonde sur les propriétés métaboliques et l'aspect des colonies sur les milieux solides. *M. hominis* se distingue des autres mycoplasmes par sa capacité à hydrolyser l'arginine et à alcaliniser le milieu alors que les *Ureaplasma* spp. hydrolysent l'urée et forment des colonies noires ponctiformes sur milieux solides.

Différentes troupes commerciales existent pour la détection et la quantification de *Ureaplasma* spp. et *M. hominis* à partir des prélèvements génitaux. Elles donnent généralement des résultats comparables aux méthodes standard de culture en milieu liquide ou gélosé.

1.2.6.3. Interprétation des résultats

L'interprétation est facile pour les prélèvements normalement stériles où la présence de *M. hominis* confirme l'infection. Elle s'avère plus délicate pour les prélèvements en contact avec une flore commensale tels que les prélèvements urétraux, les prélèvements cervico-vaginaux, l'urine et les prélèvements périphériques du nouveau-né. Une appréciation quantitative peut aider à l'interprétation et permet de distinguer colonisation et infection. Si la présence de *M. hominis* chez l'homme n'est que le reflet d'une colonisation, cette évaluation quantitative est nécessaire chez la femme. La présence de *M. hominis* en quantité $\geq 10^4$ UCC/ml dans un prélèvement cervicovaginal est fréquemment retrouvé au cours des vaginoses bactériennes mais peut aussi évoquer une infection des voies génitales hautes.

Chez le nouveau-né, la présence de mycoplasmes dans des prélèvements périphériques peut être due à une simple contamination. L'isolement de *M. hominis* à partir d'un prélèvement endotrachéal ou d'un liquide gastrique en quantité élevée (10^4 UCC/ml) est plus significatif.

1.2.6.4. Diagnostic moléculaire

Pour *M. hominis*, la PCR n'a que peu d'intérêt pour les échantillons à partir desquels la bactérie est facile à cultiver. Par contre elle est utile pour certains échantillons tels que les prélèvements génitaux hauts ou les échantillons articulaires où elle présente une meilleure sensibilité que la culture (Férandon *et al.*, 2011). Plusieurs techniques de PCR ont été décrites. Actuellement, les PCR développées sont des PCR en temps réel présentant différentes méthodes de lecture (hybridation sur membrane, fluorescence, hybridation sur billes Luminex, électrophorèse capillaire). Elles ciblent principalement l'ARNr 16S (Blanchard *et al.*, 1993, Pascual *et al.*, 2010, Stellrecht *et al.*, 2004, Takanashi *et al.*, 2015) et le gène *gap* (glyceraldehyde-3-phosphate deshydrogenase) (Baczynska *et al.*, 2004) mais des variabilités de séquences de ces gènes entre les souches limitent la sensibilité de ces techniques. En 2011, notre laboratoire a mis au point une PCR en temps réel ciblant le gène conservé *yidC*, codant pour une translocase membranaire (Férandon *et al.*, 2011). Cette PCR, plus sensible que la technique de culture conventionnelle, est corrélée avec cette dernière pour la détermination des quantités de *M. hominis* dans les prélèvements urogénitaux.

M. hominis étant souvent associées aux infections sexuellement transmissibles, les PCR monoplex ont été supplantées par des PCR multiplex syndromiques commercialisées pour la détection simultanée de *C. trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *M. genitalium*, *U. urealyticum*, *T. vaginalis* et *Herpes simplex* notamment (Choe *et al.*, 2013). Un panel multiplex pour la vaginose bactérienne est également décrit avec la détection de 19 micro-organismes potentiellement impliqués (Malaguti *et al.*, 2015). Le développement de PCR array (Cao *et al.*, 2015) et de puces à ADN (Kweon *et al.*, 2015) est également en cours. La comparaison des performances de ces différentes techniques entre elles est peu évaluée mais celles-ci ont montré leur équivalence aux PCR monoplex, et leur intérêt par rapport aux méthodes conventionnelles (Choe *et al.*, 2013, Lee *et al.*, 2012, Samra *et al.*, 2011, Redelinghuys *et al.*, 2013, Diaz *et al.*, 2010, Stellrecht *et al.*, 2004).

1.2.6.5. Diagnostic indirect

Diverses techniques ont été proposées pour la recherche d'anticorps au cours des infections à *M. hominis*. Les résultats sont difficilement interprétables en raison de l'absence d'informations sur le taux d'immunité de la population générale. Dans l'état actuel des connaissances, ces sérologies ne sont pas à conseiller.

Tableau 2. Ecart des concentrations minimales inhibitrices en µg/ml de différents antibiotiques vis-à-vis des mycoplasmes urogénitaux ne possédant pas de résistance aux antibiotiques étudiés (d'après Waites et al., 2013).

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

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

1.2.7. Etude de la sensibilité aux antibiotiques

1.2.7.1. Méthodes d'étude de la sensibilité aux antibiotiques

En raison des exigences nutritionnelles des mycoplasmes et tout particulièrement de *M. hominis*, les méthodes d'études de la sensibilité aux antibiotiques sont très différentes des conditions standard recommandées pour les autres bactéries. Ces dernières années, la résistance acquise à une ou plusieurs classes d'agents antimicrobiens a émergé dans les principales espèces de mycoplasmes et d'uréaplasmes, d'où la nécessité d'établir des méthodes précises et reproductibles de mesure de l'activité antimicrobienne *in vitro*. Ainsi, le Clinical and Laboratory Standards Institute a établi et publié des protocoles standardisés (Waites *et al.*, 2011) qui fournissent des directives pour la réalisation et l'interprétation des antibiogrammes. Ils incluent également les souches de référence contrôles à utiliser, les concentrations minimales inhibitrices attendues pour ces dernières, ainsi que les concentrations critiques nécessaires à la catégorisation des principaux antibiotiques actifs sur *M. hominis*.

Les tests de sensibilité aux antibiotiques peuvent être réalisés par des méthodes de dilution en milieu liquide et gélosé (Waites *et al.*, 2011). Elles utilisent un milieu adapté à *M. hominis*, éventuellement supplémenté en arginine, de pH 7,2 à 7,4 avec une incubation à 35-37°C sous 5% de CO₂ pour les milieux gélosés pendant 48 à 72 h. Un inoculum de départ de 10⁴ à 10⁵ UCC/ml est recommandé (Waites *et al.*, 2011).

1.2.7.2. Résistances naturelles et antibiotiques actifs

Du fait de leur absence de paroi, tous les organismes de la classe des Mollicutes sont résistants aux inhibiteurs de la synthèse de la paroi comme les β-lactamines, les glycopeptides et la fosfomycine. Ils résistent également aux polymyxines, sulfamides, triméthoprime, acide nalidixique et rifampicine (Bébéar, 2006, Bébéar & Kempf, 2005).

Les résistances naturelles liées à l'espèce concernent le groupe macrolides-lincosamides-streptogramines et kétolides (MLSK). *M. hominis* résiste aux macrolides ayant un cycle à 14 et 15 chaînons tels que l'érythromycine ou l'azithromycine. La résistance intrinsèque de *M. hominis* à l'érythromycine serait liée à une transition G→A en position 2057 de la boucle peptidyltransférase du domaine V de l'ARNr 23S (numérotation *Escherichia coli*) entraînant une diminution de la fixation de l'érythromycine aux ribosomes (Pereyre *et al.*, 2002). Cette transition présente au niveau des deux opérons ribosomiques de *M. hominis* a été associée à une résistance aux macrolides chez d'autres bactéries. Elle est absente chez *M. pneumoniae*, espèce naturellement sensible à l'érythromycine. *M. hominis* est sensible à certains macrolides à 16 chaînons tel que la josamycine mais pas à la spiramycine. A l'inverse de *Ureaplasma* spp., *M. hominis* est sensible aux lincosamides mais résiste à la télithromycine (Tableau 2).

Tableau 3. Résistance acquise aux antibiotiques chez *M. hominis* (adapté de Waites et al., 2013).

| Famille d'antibiotiques | Résistance | | Mécanisme | Écarts de CMI pour les isolats résistants (µg/ml) |
|-------------------------|-----------------|----------------|---|---|
| | <i>In vitro</i> | <i>In vivo</i> | | |
| MLSK ^a | Oui | Oui | Mutations de l'ARNr 23S en 2610, 2611, 2057, 2059, et 2062 ^b | 16-64 clindamycine |
| Tétracyclines | Oui | Oui | Protection ribosomique par le gène <i>tet(M)</i> | 8 - > 64 tétracycline |
| | Oui | Non | Mutations de l'ARNr 16S en 346, 965, 966, 967 et 1054 | 2-8 tétracycline |
| Fluoroquinolones | Oui | Oui | Mutations au niveau des QRDR des gènes <i>gyrA</i> , <i>gyrB</i> , <i>parC</i> ou <i>parE</i> | 2 - 32 lévofloxacine 4 – 64 ofloxacine |
| | Oui | Non | Efflux actif augmentant les CMI de la ciprofloxacine et de la norfloxacine ^c | 1 – 16 sparfloxacine |

^a Macrolides, lincosamides, streptogramines et kétolides ; ^b Numérotation chez *Escherichia coli* ; ^c QRDR, quinolone resistance determining region.

Les antibiotiques potentiellement actifs sur *M. hominis* et utilisés en thérapeutique sont les tétracyclines, les antibiotiques du groupe des MLSK et les fluoroquinolones (Bébéar, 2006, Bébéar & Kempf, 2005) (Tableau 2). Seules les fluoroquinolones ont un effet bactéricide potentiel. Les fluoroquinolones les plus récentes telles que la lévofloxacine et la moxifloxacine sont plus actives *in vitro* que l'ofloxacine et la ciprofloxacine. La tigécycline est aussi active que la tétracycline sur les souches sauvages de *M. hominis* mais présente l'avantage de conserver une activité sur les souches ayant acquis une résistance aux tétracyclines (Bébéar & Kempf, 2005). Les aminosides et le chloramphénicol peuvent être actifs sur les mycoplasmes mais ne sont qu'exceptionnellement utilisés.

1.2.7.3. Résistances acquises

M. hominis peut acquérir des résistances aux trois grandes classes d'antibiotiques utilisées en thérapeutique (Bébéar, 2006, Bébéar & Kempf, 2005). Cette résistance repose principalement sur une modification de la cible ou sur sa protection. Deux types de supports génétiques ont été décrits chez les mycoplasmes, des mutations chromosomiques avec une fréquence de mutation élevée car il manque un système de réparation de l'ADN chez *M. hominis* ou des transferts de gènes portés par des transposons. L'existence de plasmides de résistance n'a jamais été démontrée. L'ensemble des mécanismes de résistance est répertorié dans le Tableau 3.

Tétracyclines

La résistance acquise la plus fréquente est la résistance aux tétracyclines due à la présence du déterminant *tet(M)* situé sur un transposon conjugatif. Ce gène code pour la protéine Tet(M) qui protège la sous-unité 30S du ribosome de l'action des tétracyclines (Waites *et al.*, 2014). Il confère une résistance de haut niveau à toutes les tétracyclines. Les glycylicyclines telles que la tigécycline conservent une activité contre *M. hominis* possédant le déterminant *tet(M)*. La prévalence de la résistance acquise aux tétracyclines varie selon les pays et l'exposition de la population aux antibiotiques. Elle était de 19% en France entre 1999 et 2002 (Dégrange *et al.*, 2008). Elle concerne actuellement 15% des souches cliniques isolées dans notre laboratoire.

Macrolides

Les résistances acquises aux macrolides sont peu connues et probablement très rares, sauf peut-être en Chine, où des rapports récents suggèrent qu'elles peuvent être fréquentes, sans doute en raison de la pression sélective liée à l'utilisation répandue des macrolides (Waites *et al.*, 2014).

Fluoroquinolones

Des mutations dans les gènes cibles de l'ADN gyrase, *gyrA* et *gyrB*, et de la topoisomérase IV, *parC*, sont les principaux mécanismes conférant une résistance aux fluoroquinolones. Cette résistance est généralement croisée entre toutes les fluoroquinolones. Le niveau de résistance est fonction du nombre et des positions des mutations. Les nouvelles fluoroquinolones comme la moxifloxacine restent les plus efficaces contre les mutants bien qu'elles perdent leur activité bactéricide *in vitro* (Waites *et al.*, 2014). La prévalence de la résistance aux fluoroquinolones chez les mycoplasmes génitaux est inconnue, mais est certainement très faible. Des souches cliniques de *M. hominis* hautement résistantes aux fluoroquinolones ont été décrites (Bébéar *et al.*, 2003). Elles proviennent de sujets le plus souvent immunodéprimés, traités par des fluoroquinolones. Il est indispensable chez ces patients de tester l'activité des antibiotiques *in vitro*.

1.2.8. Traitement

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

Le traitement des infections urogénitales de l'adulte ne présente pas de caractéristiques spécifiques par rapport au traitement des infections à chlamydiae auxquelles les mycoplasmes peuvent être associés. Les recommandations proposées par les différentes instances et sociétés savantes tiennent compte de ces associations. Les tétracyclines sont le traitement de première intention des infections urogénitales à *M. hominis* de l'adulte. Des échecs thérapeutiques liés à des résistances aux tétracyclines chez *M. hominis* peuvent être observés. La clindamycine est un traitement de deuxième intention, efficace sur les souches résistantes à la tétracycline. Malgré l'apparente sensibilité *in vitro* des mycoplasmes vaginaux, les traitements à base de tétracyclines ou de clindamycine n'arrivent pas toujours à éliminer le microorganisme. Enfin les fluoroquinolones constituent une alternative en fonction des résultats de sensibilité (Waites & Bébéar, 2013).

Si le traitement des infections à *M. hominis* est relativement simple lorsqu'il s'agit d'infections bénignes, il devient beaucoup plus complexe et difficile lorsqu'il s'agit d'infections survenant chez des immunodéprimés, nécessitant alors un traitement antibiotique et une correction de l'immunodépression. Il convient alors de vérifier l'éradication des microorganismes, souvent difficile à obtenir.

Le traitement des infections néonatales pose des problèmes en l'absence d'activité sur les mycoplasmes des antibiotiques habituellement utilisés chez le nouveau-né. Des tétracyclines parentérales ont été prescrites le plus souvent pour traiter les méningites néonatales à mycoplasmes (Sarlangue & Bébéar, 1999, Waites & Bébéar, 2013) en dépit

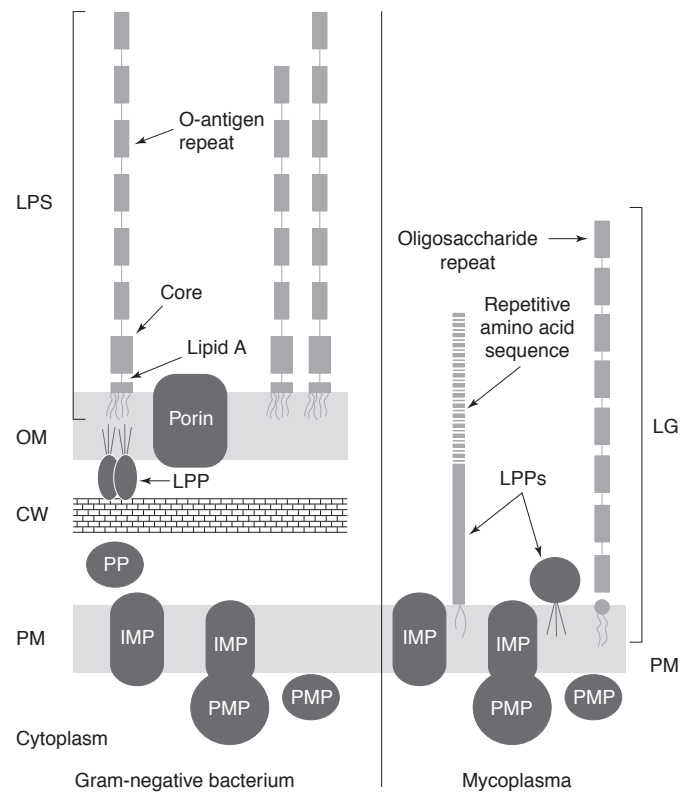


Figure 4. Comparaison de l'organisation moléculaire des enveloppes des bactéries à Gram négatif et de la membrane plasmique des mycoplasmes (Chambaud *et al.*, 1999). LPP, lipoprotéines ; CW, cell wall ou peptidoglycane ; IMP, integral membrane protein ; LG, lipoglycane ; LPS, lipopolysaccharide ; OM, membrane externe ; PM, membrane plasmique ; PMP, protéine de la membrane plasmique ; PP, protéines périplasmiques.

des contre-indications, mais la clindamycine ou le chloramphénicol ont aussi été utilisés avec succès (Waites & Bébéar, 2013). Les indications sont comparables à celles proposées chez l'adulte avec adaptation au poids et utilisation de la voie intraveineuse pour les infections systémiques sévères. La moxifloxacin constitue une option thérapeutique dans les infections du système nerveux également chez l'enfant (Hata *et al.*, 2008, Watt *et al.*, 2012, Bébéar *et al.*, 2008).

Aucune publication ne compare à ce jour l'efficacité clinique des différents traitements antibiotiques pour les infections néonatales et les infections extragénitales de l'adulte. Les recommandations de traitement sont essentiellement fondées sur les données de sensibilité *in vitro* et les publications de cas cliniques (Waites & Bébéar, 2013).

2. Structure membranaire des mycoplasmes et de *M. hominis*

2.1. Caractéristiques des membranes des mycoplasmes

La caractéristique principale des mycoplasmes et de *M. hominis* est l'absence de paroi et de peptidoglycane (Pereyre & Bébéar, 2012). De ce fait, leur membrane plasmique est directement exposée au milieu extérieur (Figure 4). L'architecture membranaire obéit au modèle général de la mosaïque fluide de Singer et Nicholson qui décrit à la fois la composition et le comportement dynamique des membranes biologiques. La membrane est organisée en bicouche lipidique (majoritairement des phospholipides) dans laquelle les protéines membranaires peuvent se mouvoir dans le plan de la membrane. Comme c'est le cas chez les eucaryotes, la présence d'une grande proportion de stérols et de sphingolipides pourrait permettre la formation de « lipid raft », domaines plus solides et mobiles de la membrane enrichis en protéines et lipoprotéines spécifiques (Simons & Ikonen, 1997). Cette plasticité membranaire confère aux mycoplasmes une certaine malléabilité qui leur permet d'être polymorphes.

Bien que dépourvue de peptidoglycane, la membrane des mycoplasmes présente des similitudes avec les autres bactéries concernant notamment les éléments qui y sont ancrés (Figure 4). A la surface de la membrane externe des bactéries à Gram négatif, des hétéropolysaccharides, oligoglycane et LPS sont ancrés grâce à un composant lipidique comme le lipide A pour le LPS. De façon similaire, des hétéropolysaccharides et des oligoglycane sont également observés à la surface de la membrane plasmique des mycoplasmes. De nombreuses lipoprotéines (LP) sont également présentes dans ces membranes, implantées par un groupement lipidique.

Les lipoprotéines sont des protéines qui présentent une liaison covalente avec un ou plusieurs acides gras. Cette modification lipidique facilite l'ancrage de protéines hydrophiles dans le cœur hydrophobe de la membrane des bactéries. Le groupement acyle hydrophobe

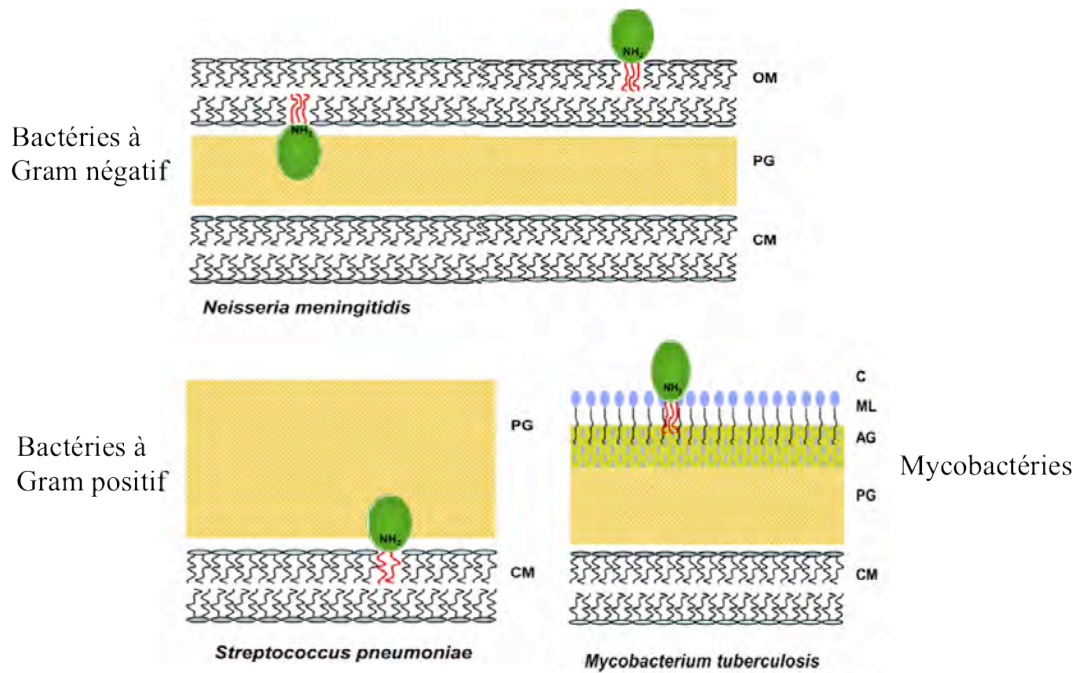


Figure 5. Localisation des lipoprotéines bactériennes (d'après Kovacs-Simon *et al.*, 2011). Rond vert, partie peptidique des lipoprotéines ; traits rouges, chaînes acylées des lipoprotéines, NH₂, extrémité N-terminale des lipoprotéines ; PG, peptidoglycane ; CM, membrane cytoplasmique ; OM, membrane externe ; ML, acide mycolique ; C, capsule ; AG, arabinogalactane.

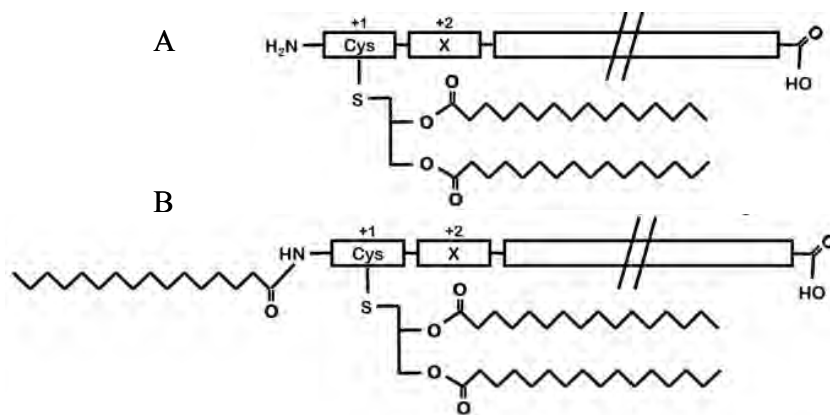


Figure 6. Structure des lipoprotéines (Hutchings *et al.*, 2009). (A) Lipoprotéine diacylée. (B) Lipoprotéine triacylée.

s'insère au sein de la bicouche phospholipidique des membranes. Ces lipoprotéines ne sont pas localisées au même niveau de la paroi des bactéries selon qu'il s'agit de bactéries à Gram négatif, à Gram positif, de mycobactéries ou de mycoplasmes. Chez les bactéries à Gram négatif, l'ancrage des lipoprotéines se fait dans le feuillet interne ou externe de la membrane externe (Figure 5). Les bactéries à Gram positif et les mycoplasmes présentent des lipoprotéines dans le feuillet externe de leur membrane cytoplasmique. D'autres bactéries telles que les mycobactéries arborent des lipoprotéines dans la couche d'acide mycolique de leur paroi.

Ces lipoprotéines ancrées dans le feuillet externe de la membrane plasmique des mycoplasmes y exercent de nombreuses fonctions qui seront abordées ultérieurement.

2.2. Les lipoprotéines membranaires des mycoplasmes

2.2.1. Structure des lipoprotéines bactériennes

La modification covalente d'une protéine par des lipides a été en premier lieu identifiée en 1969 pour une protéine de membrane externe de la bactérie *E. coli* (Braun & Rehn, 1969), la lipoprotéine de Braun, dont la composition chimique a été élucidée en 1973 par Braun (Hantke & Braun, 1973). Depuis ces travaux pionniers, le nombre de lipoprotéines bactériennes caractérisées ne cesse d'augmenter.

Leur structure est caractérisée par une extrémité N-terminale portant un résidu cystéyle lié de manière covalente à un groupement diacylglycérol grâce à une liaison thioéther (Figure 6.A) (Chambaud *et al.*, 1999). Ce groupement est composé de deux acides gras, liés par des liaisons ester à un glycérol dont la troisième fonction est elle-même éthérifiée avec la chaîne latérale sulfhydryle (SH) du résidu cystéine. Cette modification permet ainsi l'obtention de lipoprotéines diacylées. Cette forme est principalement retrouvée chez les bactéries à Gram positif et les mycoplasmes. Les lipoprotéines peuvent être également présentes sous forme triacylée. En effet, une N-acylation du résidu cystéine en N-terminal confère alors à la lipoprotéine une troisième chaîne d'acide gras. Une structure N-acyl S-diacylglycéryl est alors décrite (Figure 6.B). Ces lipoprotéines sont essentiellement retrouvées chez les bactéries à Gram négatif mais elles ont été également décrites chez les mycoplasmes. Les lipoprotéines peuvent être schématiquement représentées par une tête hydrophile protéique et deux à trois queues lipidiques hydrophobes, ce qui leur confère un caractère amphiphile.

La composition en acides gras des lipoprotéines a été démontrée comme étant identique à celle des phospholipides des membranes (Kovacs-Simon *et al.*, 2011) qui sont considérés comme des donneurs de groupements lipidiques lors de la biogenèse des lipoprotéines.

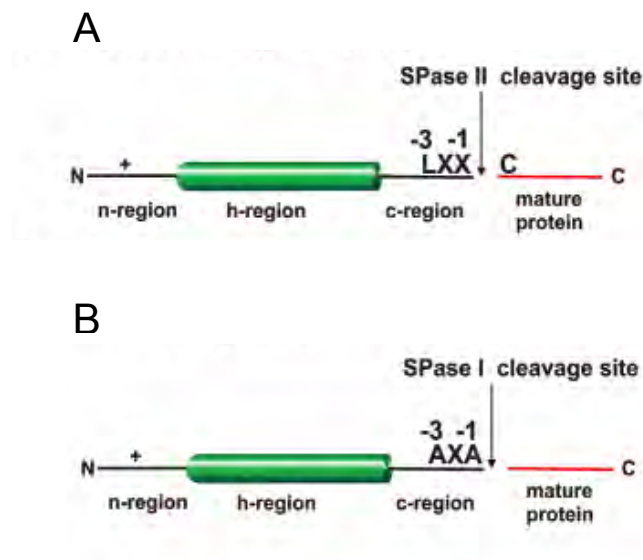


Figure 7. Peptide signal chez les bactéries (d'après Paetzel *et al.* 2002). **(A)** Peptide signal des lipoprotéines bactériennes. Le motif lipobox de ce peptide signal est reconnu par la signal peptidase de type II (Spase II). Il permet l'adressage à la membrane par le système de translocation Sec présent notamment chez les mycoplasmes. **(B)** Peptide signal TAT. Le motif consensus double arginine est reconnu par la signal peptidase de type I (SPase I). Ce signal peptide permet l'adressage à la membrane des protéines chez les bactéries à Gram négatif par le système de translocation TAT, twin arginin protein transport. Ce système n'est pas présent chez les mycoplasmes.

2.2.2. Biosynthèse des lipoprotéines

2.2.2.1. Structure et rôle du peptide signal

Les lipoprotéines bactériennes sont synthétisées par la machinerie ribosomique sous la forme d'un précurseur, une pré-prolipoprotéine (pré-proLP) présentant un peptide signal d'une vingtaine d'acides aminés en N-terminal (Inouye *et al.*, 1977). Ce peptide signal joue un rôle dans la maturation, l'adressage et le transport à la membrane des lipoprotéines (cf. paragraphe 2.2.2.3).

L'analyse de séquences de peptides signaux de différentes lipoprotéines a permis de révéler une séquence consensuelle tripartite qui porte divers déterminants de maturation et de transport des lipoprotéines (Hutchings *et al.*, 2009). Le domaine N-terminal du peptide signal (région N) (Figure 7) possède obligatoirement 1 à 3 acides aminés chargés positivement. Le domaine central H (hydrophobe) est constitué d'acides aminés hydrophobes. Il doit être suffisamment long, environ 15 acides aminés, pour former une hélice alpha susceptible de traverser la membrane. Il ne doit pas être interrompu par des acides aminés chargés. Ces deux domaines présentent peu de similarité de séquence entre les différentes lipoprotéines. Le domaine C-terminal, plus conservé, porte un motif caractéristique et spécifique appelé lipobox. Bien que très proches, il existe des différences dans la composition en acides aminés de ce motif lipobox chez les bactéries à Gram positif et négatif. Falquet *et al.* (Falquet *et al.*, 2002) ont précisé le motif lipobox mais celui-ci a été optimisé par Sutcliffe et Harrington (Sutcliffe & Harrington, 2002) comme suit {DERK(6)-[LIVMFWSTAG](2)-[LIVMFYSTAGCQ]-[AGS]-C. Ce motif lipobox des pré-proLP joue un rôle important dans la maturation des lipoprotéines. Il correspond à un site de clivage reconnu spécifiquement par une peptidase de type II qui exerce son activité au niveau du résidu cystéine (Sankaran & Wu, 1994). Les acides aminés adjacents à la cystéine en +2, +3 et +4 jouent également un rôle dans la maturation et la localisation cellulaire de la lipoprotéine (Hutchings *et al.*, 2009). Cette organisation des acides aminés autour du site de clivage a été nommée par Gunnar Von Heijne « loi du -3, +1 ». Leur rôle sera développé dans le paragraphe 2.2.2.2. Chez les mollicutes, la plupart des peptides signaux sont similaires à ce profil à l'exception notable de la lipoprotéine Vpma de *M. agalactiae* qui présente un site de clivage atypique avec un acide aminé chargé (lysine) en position -1 par rapport au résidu cystéine (Glew *et al.*, 2000b).

2.2.2.2. Modifications post-transcriptionnelles

La biosynthèse des lipoprotéines correspond à un processus de maturation qui comprend un ensemble d'étapes conduisant à la lipoprotéine mature à partir d'une pré-proLP. Cette maturation reposerait sur deux étapes chez les bactéries à Gram positif et les

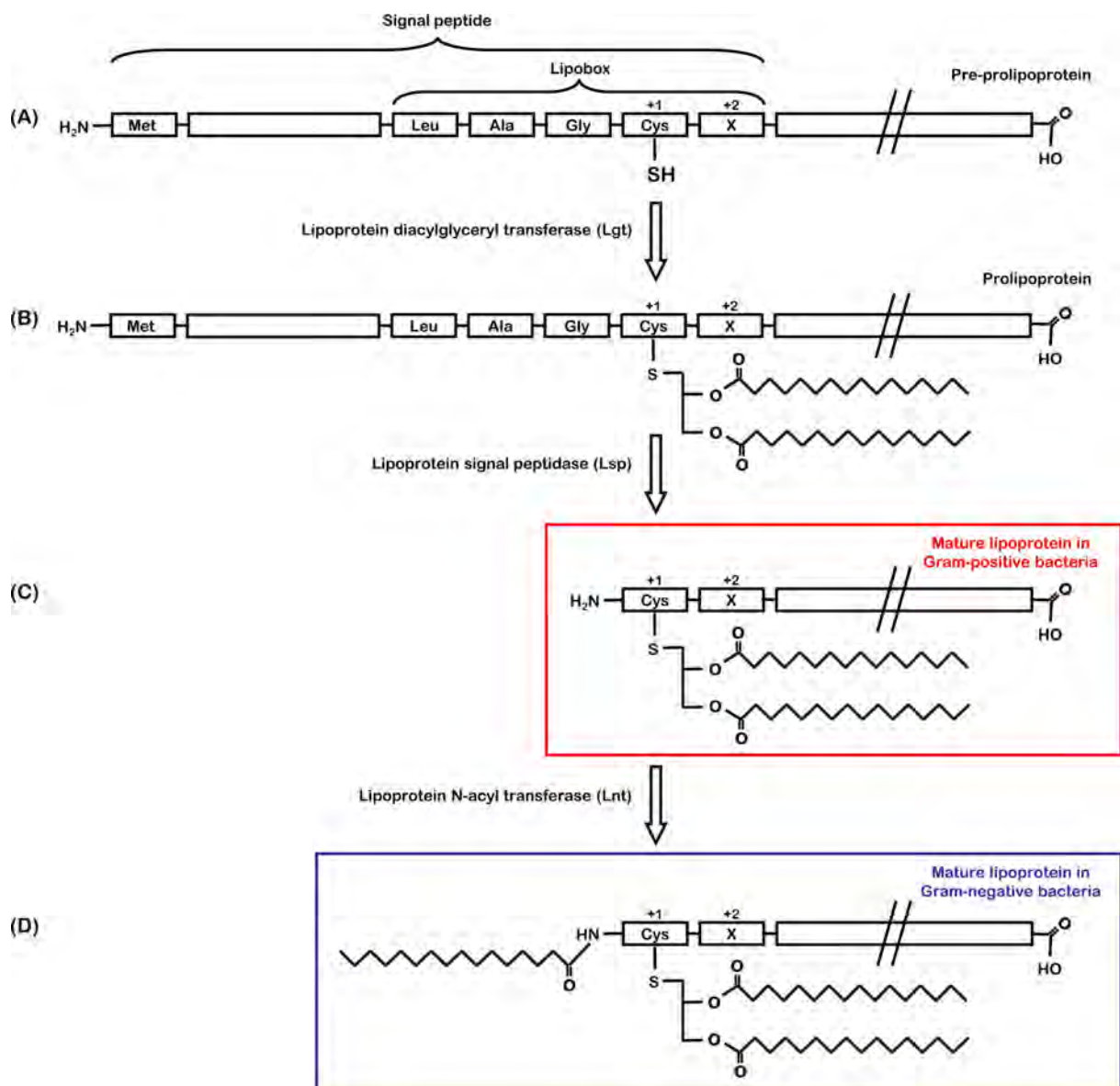


Figure 8. Biosynthèse des lipoprotéines bactériennes (Kovacs-Simon *et al.*, 2011). (A à C) Biosynthèse en deux étapes chez les bactéries à Gram positif et les mycoplasmes. (A à D) Biosynthèse en trois étapes chez les bactéries à Gram négatif. (A) La pré-prolipoprotéine, précurseur des lipoprotéines, présente un peptide signal à son extrémité N-terminale qui possède une séquence consensus appelée Lipobox. (B) Pendant la maturation, le groupement thiol de la cystéine invariable est modifié par l'addition d'un groupement diacylglycéryl par la Lipoprotéine diacylglycéryl transférase (Lgt) pour obtenir une prolipoprotéine. (C) La Lipoprotéine signal peptidase (Lsp) clive le peptide signal, libérant la cystéine qui constitue alors l'extrémité N-terminale de la lipoprotéine mature chez les bactéries à Gram positif et les mycoplasmes. (D) Chez les bactéries à Gram négatif, la lipoprotéine mature possède un acide gras additionnel sur le résidu cystéine en N-terminal lié par la Lipoprotéine N-acyl transférase (Lnt).

mycoplasmes et sur une étape supplémentaire chez les bactéries à Gram négatif. Ces étapes se déroulent dans un ordre strict. La lipobox va subir une première modification majeure par la liaison covalente d'un groupement diacylglycérol transféré d'un phosphatidylglycérol sur le thiol de la chaîne latérale du résidu cystéine (Hutchings *et al.*, 2009, Inouye *et al.*, 1977, Kovacs-Simon *et al.*, 2011, Selvan & Sankaran, 2008) (Figure 8.B). Cette réaction est catalysée par une enzyme, la lipoprotéine diacylglycéryl transférase (Lgt) qui permet la formation d'une prolipoprotéine (proLP). La Lgt est une enzyme critique dans la génération des lipoprotéines. Contrairement aux bactéries à Gram positif, elle a été démontrée comme essentielle pour la viabilité des bactéries à Gram négatif (Petit *et al.*, 2001).

Après liaison du groupement diacylglycérol, une lipoprotéine signal peptidase de type II (Lsp ou SPase II) clive le peptide signal au niveau du résidu cystéine (Figure 8.C). Le résidu cystéine constitue alors la partie N-terminale de la future lipoprotéine. Cette lipoprotéine diacylée correspond à la forme mature des lipoprotéines observées chez les bactéries à Gram positif et chez les mycoplasmes. La lipoprotéine signal peptidase est une enzyme transmembranaire qui appartient à la famille des protéases possédant deux résidus aspartyl qui catalysent la réaction enzymatique. Cette enzyme, qui exerce son action dans l'espace périplasmique des bactéries à Gram négatif est absente chez les eucaryotes. Bien que la Lsp ait été initialement décrite comme ne clivant que les précurseurs ayant déjà une chaîne lipidique, il a été démontré que cette dernière n'était pas nécessaire à son action chez *Listeria monocytogenes* et *Streptococcus agalactiae* (Kovacs-Simon *et al.*, 2011).

Dans le génome de l'ensemble des mycoplasmes, il n'existe qu'une unique copie du gène codant pour la Lsp alors que un ou deux gènes codant pour la Lgt peuvent être observés (Braun & Wu, 1994). *M. hominis* PG21, Sprott et LBD-4 ne présentent qu'une copie des gènes *lgt* et *lsp*. Les séquences codantes (CDS) des souches AF1, AF3 et PL5 ne sont pas encore disponibles sur les bases de données publiques.

Chez les bactéries à Gram négatif, la proLP clivée subit une modification supplémentaire par la liaison d'un acide gras sur le résidu cystéine de l'extrémité N-terminale. Cette réaction est catalysée par une lipoprotéine N-acyltransférase (Lnt) ou apolipoprotéine transacylase (Figure 8.D) initialement décrite chez *E. coli*. Des analyses de séquences ont permis de mettre en évidence des homologues de cette Lnt chez les bactéries à Gram négatif, chez les mycobactéries et les bactéries à Gram positif présentant un haut rapport en G+C%. Aucun gène codant pour la Lnt n'a été mis en évidence chez *M. hominis* PG21 (Pereyre *et al.*, 2009), LBD-4 (Calcutt & Foecking, 2015a) et Sprott (Calcutt & Foecking, 2015b). Ceci ne signifie pas que les lipoprotéines n'existent que sous forme diacylée chez les mollicutes. Parmi les mollicutes, *A. laidlawii* ne présente que des lipoprotéines sous une forme triacylée (Driessen *et al.*, 2001). Deux premières études sur le

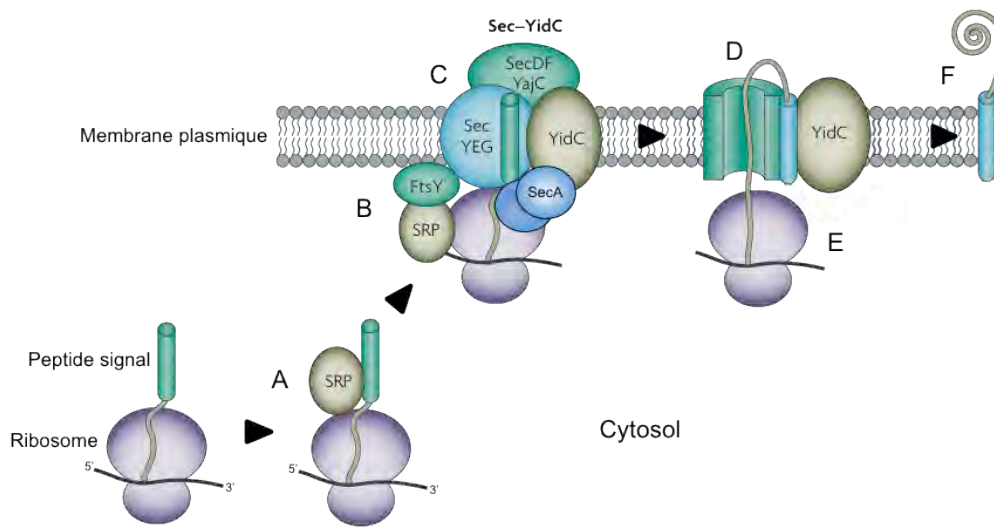


Figure 9. Mécanisme de translocation co-traductionnel de *M. hominis* PG21 déduit de l'annotation du génome (adapté de Xie & Dalbey, 2008). (A) Liaison du SRP au peptide signal. (B) Adressage du complexe ribosome/pré-lipoprotéine/SRP au récepteur FtsY. (C) Prise en charge de la pré-lipoprotéine par SecA et translocation dans le PCC SecYEG. (D) Sortie du canal de translocation de la région hydrophobe du peptide signal et stabilisation dans la membrane par l'insertase YidC. (E) Elongation de la pré-lipoprotéine et passage au travers du PCC pour son expression hors de la cellule. (F) Pré-lipoprotéine ancrée dans la membrane plasmique de *M. hominis* PG21 par le peptide signal.

ratio de liaisons N-amide et O-ester chez *M. gallisepticum* du groupe phylogénétique Pneumoniae et *M. mycoides* chez les Spiroplasma (Jan *et al.*, 1995) indiquent la présence de lipoprotéines diacylées et triacylées. La résistance à la dégradation de Edman des protéines de *M. mycoides* indique également la présence de la N-acylation. Des études récentes suggèrent que la N-acylation se produit aussi chez les bactéries qui ne possèdent pas de gène évident codant pour cette Lnt (Asanuma *et al.*, 2011, Kurokawa *et al.*, 2009, Kurokawa *et al.*, 2012, Serebryakova *et al.*, 2011).

La Lgt et la Lsp sont des enzymes propres aux procaryotes. Ce sont des cibles potentielles pour le développement de nouvelles molécules antibiotiques. En effet, de nombreuses études (Hutchings *et al.*, 2009) *in vitro* et *in vivo* montrent que leur absence d'expression affecte la quantité et la fonctionnalité des lipoprotéines exprimées à la surface bactérienne et affecterait la virulence des bactéries.

2.2.2.3. Translocation des pré-prolipoprotéines du cytoplasme à la membrane plasmique chez *M. hominis*

L'adressage et le transport des lipoprotéines interviennent pendant la phase de maturation des lipoprotéines. Ils peuvent être considérés comme une étape de triage en vue de la localisation définitive des lipoprotéines. Pour permettre le passage des pré-proLP immatures à travers la membrane cytoplasmique, sans compromettre leur structure et leur fonction, deux mécanismes de transport prédominent, la voie principale dite de sécrétion générale Sec ou la translocation double arginine Tat (twin arginin protein transport) (Driessen *et al.*, 2001, Natale *et al.*, 2008). La première description des systèmes de sécrétion des mycoplasmes a été réalisée suite à l'analyse des génomes de *M. genitalium* par Fraser *et al.* en 1995 (Fraser *et al.*, 1995) et *M. pneumoniae* par Himmelreich *et al.* en 1996 (Himmelreich *et al.*, 1996). *M. hominis* n'exprime que les protéines nécessaires à la voie de translocation Sec et n'exprime pas les protéines du système Tat (Pereyre *et al.*, 2009).

Le système Sec se compose de plusieurs protéines comprenant des protéines de ciblage et un complexe protéique membranaire qui forme un pore de translocation (protein conducting channel PCC) au travers duquel les pré-proLP traversent la membrane cytoplasmique (Driessen *et al.*, 1998) (Figure 9). Le passage du pore est un phénomène actif permis par une translocase, protéine motrice SecA, liée au PCC et à l'activité ATPasique, qui interagit avec les charges positives de la région N du peptide signal. La translocation s'effectue par un mécanisme de ciblage co-translationnel. Elle repose initialement par la formation d'un complexe constitué du ribosome, de la protéine naissante et de la protéine de reconnaissance du peptide signal (SRP, Signal Recognition particle) (Driessen *et al.*, 2001, Natale *et al.*, 2008). Ce complexe est reconnu par le récepteur du SRP, FtsY (Figure 9).

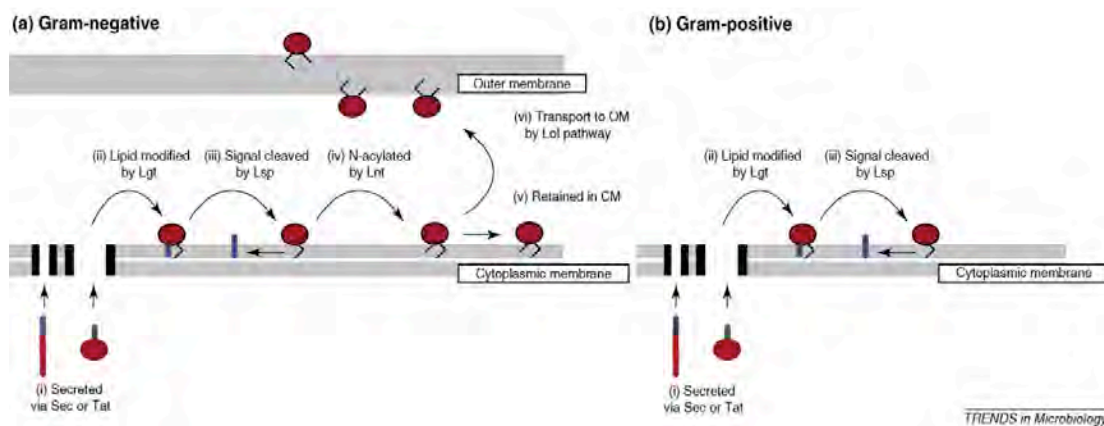


Figure 10. Biosynthèse et adressage des lipoprotéines chez les bactéries à Gram négatif (a) et les bactéries à Gram positif et les mycoplasmes (b) (Hutchings *et al.*, 2009). La lipobox va subir une première modification par la liaison d'un groupement diacylglycérol sur le résidu cystéine de l'extrémité N-terminale. Cette réaction est catalysée par une enzyme, la lipoprotéine diacylglycéryl transférase (Lgt) qui permet la formation d'une prolipoprotéine (proLP). Puis, une lipoprotéine signal peptidase de type II (Lsp) clive le peptide signal au niveau du résidu cystéine. Chez les bactéries à Gram négatif, la proLP clivée subit une modification supplémentaire par la liaison d'un acide gras sur le résidu cystéine. Cette réaction est catalysée par une lipoprotéine N-acyltransférase (Lnt) ou apolipoprotéine transacylase. Cette enzyme est absente chez les mycoplasmes.

L'élongation de la protéine s'effectue alors au travers du PCC. Le pore comprend une ouverture latérale dans la bicouche lipidique qui constitue un site d'insertion de la région H du peptide signal dans la membrane plasmique. Des protéines chaperonnes, YidC et SecDFYajC, favorisent l'insertion et la stabilisation membranaire du peptide signal dans la membrane. Le reste de la pré-proLP traverse le pore pour être exprimé à la surface de la membrane plasmique.

2.2.2.4. Devenir des pré-prolipoprotéines dans la membrane plasmique

Après transport des pré-proLP au travers de la membrane plasmique par le biais de la voie Sec, la lipobox dirige la protéine vers la machinerie de maturation. Elle rencontre alors la Lgt et la Lsp (Figure 10). Le groupement lipidique est lié au résidu cystéine pour la formation d'une proLP et le peptide signal est clivé donnant une lipoprotéine mature. Chez les bactéries à Gram positif et les mycoplasmes, ces lipoprotéines matures sont insérées dans le feuillet externe de la membrane cytoplasmique.

2.2.3. Fonctions des lipoprotéines des mycoplasmes

2.2.3.1. Les différentes fonctions

Les lipoprotéines bactériennes sont connues pour exercer de multiples fonctions chez les bactéries à Gram négatif et positif. Browning *et al.* (Browning *et al.*, 2011) suggèrent que, dans de nombreux cas, les lipoprotéines mycoplasmiques remplissent les fonctions des lipoprotéines des bactéries à Gram négatif. Dès 1999, Chambaud *et al.* (Chambaud *et al.*, 1999) avaient proposé quatre grandes catégories de fonctions pour les lipoprotéines mycoplasmiques : une fonction structurale, une fonction de transport (ABC transporteurs), une fonction d'adhésion et une fonction enzymatique. Il est aujourd'hui reconnu qu'elles exercent de plus nombreuses fonctions et interviendraient aussi dans le métabolisme des membranes, la division cellulaire, la transduction de signaux transmembranaires, la liaison de protéines extracytoplasmiques et la résistance aux antibiotiques. De plus, certaines lipoprotéines mycoplasmiques peuvent également participer à l'évasion du système immunitaire, induire la réponse immunitaire innée en agissant en tant que ligands des Toll-Like récepteurs (TLR) de type 2 et initier la réponse inflammatoire (Kovacs-Simon *et al.*, 2011). L'interaction des lipoprotéines avec le système immunitaire sera développée dans le paragraphe 3.4.2.

2.2.3.2. Fonctions des lipoprotéines de *M. hominis*

M. hominis possède 45 gènes pouvant coder pour des lipoprotéines (Pereyre *et al.*, 2009) ce qui constitue le plus grand pourcentage (8,3%) du génome codant pour des

lipoprotéines parmi les mollicutes (Krasteva *et al.*, 2014, Nouvel *et al.*, 2010, Pereyre *et al.*, 2009). La plupart de ces lipoprotéines sont de fonctions inconnues mais certaines sont aujourd'hui décrites.

Parmi les lipoprotéines, de nombreux gènes codent pour des transporteurs de type ABC (ATP binding cassette). Dans cette famille de transporteurs, OppA est une lipoprotéine bien caractérisée chez *M. hominis*. Elle aurait la capacité de lier des oligopeptides et faciliterait leur translocation dans la cellule (Henrich *et al.*, 1999). Elle pourrait aussi participer à la cytoadhérence (Hopfe & Henrich, 2004) et à l'induction de l'apoptose (Hopfe & Henrich, 2008) et possède une activité ATPase à la surface de la bactérie (Hopfe *et al.*, 2004). La lipoprotéine conservée P37-like, ABC transporteur initialement décrit chez *M. hyorhina*, intervient dans la liaison extracytoplasmique de la vitamine B1 et serait impliquée dans la transformation cancéreuse (Sippel *et al.*, 2009).

La lipoprotéine Vaa de *M. hominis* peut également assurer une fonction d'adhésion. Vaa est une lipoprotéine de surface abondante et variable qui a la particularité d'interagir avec les cellules épithéliales humaines de lignée HeLa (Zhang & Wise, 1997). En effet, des clones isogéniques n'exprimant pas Vaa adhéraient moins à ces cellules. Les Lmp-related proteins constituent une famille de lipoprotéines de taille variables (Ladefoged *et al.*, 1995, Ladefoged *et al.*, 1996). Allen-Daniels *et al.* (Allen-Daniels *et al.*, 2015) ont montré que les souches AF1, AF3 et PL5 possédant des gènes tronqués codant pour la Lmp1 (AF1_245, AF3_439, et PL5_1) et une Lmp-like (AF1_409, AF3_259, et PL5_148) présentaient une plus faible auto-agrégation et une plus faible adhérence aux tubes de culture par rapport à PG21 qui possède un gène complet pour ces deux Lmp. Ces Lmp pourraient ainsi jouer un rôle dans l'adhésion ; leur absence favorisant la dissémination de la bactérie.

Des lipoprotéines à activité nucléasique sont décrites chez plusieurs mycoplasmes du groupe Hominis (Cowen & Smith, 1972, Ilinskaya *et al.*, 2014, Luo *et al.*, 2009, Minion *et al.*, 1993, Schmidt *et al.*, 2007, Somarajan *et al.*, 2010) et des gènes codant pour des nucléases putatives et ayant les caractéristiques d'une lipoprotéine sont annotés dans le génome de *M. hominis* PG21 (MHO_0660, MHO_0730 et MHO_5110). Ces enzymes participeraient à la dégradation d'acides nucléiques et à l'incorporation de nucléotides. Elles sont généralement associées à la membrane. De plus, des lipoprotéines peuvent exercer des activités nucléotidase et peptidase. Le complexe membranaire P60/P80 (Hint) est connu pour hydrolyser des nucléotides chez *M. hominis* (Hopfe *et al.*, 2004). Deux potentielles peptidases (MHO_3200 et MHO_04970) sont décrites chez *M. hominis*. Celles-ci pourraient intervenir dans la dégradation de protéines pour l'assimilation de peptides. Elles pourraient également jouer un rôle dans la virulence. En effet, les peptidases bactériennes sont décrites

comme pouvant dégrader les molécules de défense du système immunitaire inné (Potempa & Pike, 2009).

Certaines lipoprotéines sont la cible du système immunitaire humoral et exercent ainsi des fonctions antigéniques. La lipoprotéine P120 est une lipoprotéine variable qui contient une région hypervariable à son extrémité N-terminale (Christiansen *et al.*, 1994, Nyvold *et al.*, 1997) et qui est la cible d'une forte réponse humorale chez l'hôte humain (Ladefoged & Christiansen, 1998). Son rôle n'a pas été clairement établi mais elle intervient dans la variation de phase (Nyvold *et al.*, 1997) et le camouflage d'antigènes (Zhang & Wise, 2001) (cf. paragraphe 2.2.4.2). Une protéine similaire appelée P120' a été décrite par Ladefoged *et al.* (Ladefoged & Christiansen, 1998). Elle a un poids moléculaire de 98 kDa, 20 kDa inférieur à celui de P120. Cette protéine est également exposée à la surface mais son extrémité N-terminale ne possède pas les caractéristiques des prolipoprotéines. Contrairement à P120 qui est reconnue par les sérums de patients séropositifs, P120' n'est que rarement reconnue. Sa fonction est inconnue.

Enfin, le rôle immunomodulateur des lipoprotéines est aujourd'hui établi chez de nombreux mycoplasmes. Cette notion sera développée dans le paragraphe 3.4.2.

2.2.4. Variations de l'expression des lipoprotéines membranaires chez les mycoplasmes

2.2.4.1. Généralités

La membrane des mollicutes constitue l'interface d'interaction directe du mycoplasme avec le milieu extérieur. Sa structure antigénique est caractérisée par une forte capacité de variabilité qui constitue une réponse adaptative à son environnement (Chambaud *et al.*, 1999). Cette variabilité repose sur deux événements. Le premier est une variation de phase ou variation antigénique qui aboutit à un phénotype hétérogène d'une population clonale, dans laquelle des cellules individuelles, soit expriment la lipoprotéine de phase variable ou non, ou expriment une des multiples formes antigéniques de la lipoprotéine. Le second est une variation de la transcription modulant l'expression de la lipoprotéine.

Variation de phase

Des familles multigéniques nées de la duplication d'un gène unique et codant pour des lipoprotéines de surface sont communément observées dans les génomes des mycoplasmes, et, dans de nombreux cas, elles ont été démontrées comme contribuant à une variation de phase des antigènes dominants (Browning *et al.*, 2011). La variation de la taille et du répertoire des protéines de surface a pour origine quatre mécanismes reposant sur un fonctionnement ON-OFF (Citti *et al.*, 2010). Ces variations d'expression des protéines

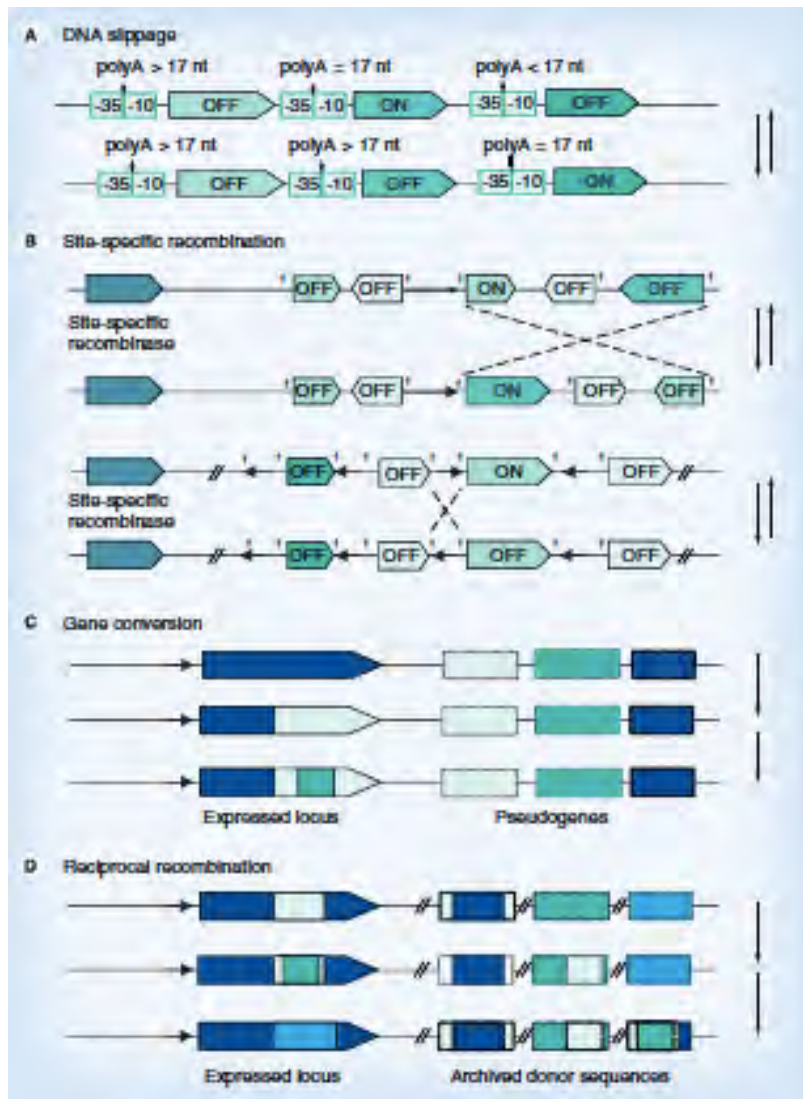


Figure 11. Mécanismes génétiques régissant la variation de phase des protéines de surface des mycoplasmes (Citti et al., 2010). (A) Mutations spontanées (insertion ou délétion d'un nucléotide) par mésappariements dans des zones de glissement d'ADN entraînant des régulations transcriptionnelles. La transcription des gènes *Vlp* de *M. hyorhinis* n'a lieu que lorsque le promoteur présente une séquence poly A de 17 nucléotides. Les promoteurs sont signalés par les flèches noires. (B) Réarrangement de l'ADN faisant intervenir une recombinase spécifique de site. Les systèmes *vsp*, *vsa* et *vpma* de *M. bovis*, *M. pulmonis* and *M. agalactiae* comprennent tous des groupes de gènes dans lesquels un seul gène est placé derrière un promoteur et est exprimé tandis que les autres ne le sont pas. Dans chaque système, une recombinase reconnaît des sites spécifiques et catalyse les réarrangements de l'ADN. † courtes séquences ciblées par la recombinase. (C) Variations antigéniques par recombinaisons unidirectionnelles (conversion de gène), comme cela se produit chez *M. synoviae*, entre un locus exprimé et des séquences réservoir situées en grappes relativement rapprochées. Les têtes de flèches noires représentent les promoteurs. Les lignes pointillées indiquent la recombinaison. (D) Variations antigéniques par recombinaisons réciproques, comme décrite chez *M. genitalium*, entre un locus exprimé et des séquences réservoir distribuées sur le chromosome.

peuvent survenir de manière intraclonale au sein d'une même population isogénique. Ainsi, des mutations spontanées (insertion ou délétion d'un nucléotide) par mésappariements dans des zones de glissement d'ADN entraînent des régulations transcriptionnelles ou traductionnelles. Ce mécanisme a été initialement décrit dans les promoteurs des gènes codant pour les lipoprotéines Vlp de *M. hyorhinis*, mycoplasme responsable d'infections chez le porc (Citti *et al.*, 2000, Yogev *et al.*, 1995). La transcription des gènes Vlp n'a lieu que lorsque le promoteur présente une séquence poly A de 17 nucléotides (Figure 11.A). Son allongement ou son raccourcissement inhibe la transcription. Le deuxième mécanisme moléculaire correspond à des réarrangements de l'ADN faisant intervenir une recombinaison spécifique de site. Par un mécanisme de « copier-coller » la recombinaison peut placer un gène silencieux derrière un promoteur fonctionnel (Figure 11.B.). Les systèmes vsp, vsa et vpma de *M. bovis*, *M. pulmonis* et *M. agalactiae* comprennent tous des groupes de gènes dans lesquels un seul gène est placé derrière le promoteur et est exprimé tandis que les autres ne le sont pas (Bhugra *et al.*, 1995, Glew *et al.*, 2002, Lysnyanski *et al.*, 1999, Lysnyanski *et al.*, 2001, Shen *et al.*, 2000). La recombinaison unidirectionnelle (conversion de gène) (Figure 11.C.) et la recombinaison réciproque (Figure 11.D.) constituent les deux derniers mécanismes. Un des systèmes les plus remarquables de variation de phase par recombinaison est celui de *M. synoviae*, un agent pathogène de la volaille (Noormohammadi *et al.*, 1998, Noormohammadi *et al.*, 2000). Ce mycoplasme est en mesure de générer un gène chimérique de la lipoprotéine VlhA par conversion génique dans des sites multiples à l'intérieur du gène codant. La famille des gènes *vlhA* est composée d'un gène unique *vlhA* et de plusieurs pseudogènes. La lipoprotéine variable VlhA est le résultat d'événements de recombinaison unidirectionnels survenus entre la copie fonctionnelle et les pseudogènes, avec duplication de la séquence du pseudogène et perte de la région correspondante dans le gène déjà exprimé. Les pseudogènes disponibles au sein du génome servent de réservoir pour la conversion génique, et les possibilités de combinaison suggèrent que plus de 600 000 variants de cette lipoprotéine peuvent être exprimés par cette espèce (Noormohammadi *et al.*, 2000). La diversité antigénique de *M. genitalium* repose notamment sur la recombinaison réciproque. Le génome de ce mycoplasme contient de multiples répétitions de séquences nommées MgPar qui ont des homologies avec *mgpB* et *mgpC*, deux gènes codant pour des protéines d'adhésion (Iverson-Cabral *et al.*, 2006, Iverson-Cabral *et al.*, 2007, Ma *et al.*, 2010). Ce système génère des recombinaisons entre ces deux gènes et le pool de gènes donneurs réparti sur l'ensemble du chromosome (Figure 11.D).

Cependant, bien que la variation de phase chez les mycoplasmes et les mécanismes moléculaires impliqués dans son contrôle soient de mieux en mieux connus, la compréhension de son rôle dans la pathogénicité est limitée. Il a été proposé que la variation

de phase permettrait aux mycoplasmes d'échapper à la réponse immunitaire de leurs hôtes et de faciliter ainsi l'infection chronique (Browning *et al.*, 2011). La preuve expérimentale d'un tel rôle reste non établie. Néanmoins, des études ont montré que la variation de phase de VlhA (précédemment nommée pGMA) chez *M. gallisepticum* S6 entraîne une réponse en deux phases avec un arrêt de l'expression de cette lipoprotéine dominante en présence d'anticorps polyclonaux ou d'un anticorps monoclonal spécifique MAb66, puis une restauration de l'expression de VlhA en l'absence de ces anticorps (Glew *et al.*, 1998, Markham *et al.*, 1998). En présence des anticorps, la souche exprime le polypeptide P82, un autre membre de la famille Vhla dont le gène est situé juste en aval du gène codant pour la protéine VlhA normalement exprimée. La variation de phase a été observée *in vivo* par l'infection de poulet par la souche virulente S6. Quarante-huit heures après l'infection, 40% des cellules avaient cessé l'expression de la protéine Vhla originale (pMGA1.1)(Glew *et al.*, 2000a). Cette inhibition était réversible *ex vivo*. L'expression de variants (pMGA1.2) était observée dans les infections prolongées de façon concomitante à l'acquisition de la répétition d'un motif trinuécléotidique (GAA)₁₂ en 5' du promoteur (Glew *et al.*, 2000a). Ceci renforce l'hypothèse que cette variation du répertoire des lipoprotéines permettrait la survie des mycoplasmes à long terme. Le mycoplasme est perçu par le système immunitaire de l'hôte comme une population exposant toujours des antigènes différents. Cette capacité permettrait aussi une adaptation à de nouvelles niches tissulaires.

Variation lors du contact avec les cellules hôtes

La variation de l'expression des lipoprotéines au contact des cellules de l'hôte a également été observée. Cette variation privilégierait l'expression de certaines lipoprotéines qui joueraient un rôle dans l'interaction du mycoplasme avec les cellules. Ainsi, Madsen *et al.* (Madsen *et al.*, 2008) ont montré par PCR array que l'expression de 79 gènes était régulée chez *M. hyopneumoniae* 232 après 18 jours d'infection pulmonaire chez le porc (*in vivo*) par rapport au mycoplasme maintenu seul en milieu de culture (*in vitro*). Un et deux gènes codant pour de potentielles lipoprotéines étaient respectivement sous-exprimés (*mhp170*) ou sur-exprimés (*mhp366* et *mhp371*). *Mhp170* est de fonction inconnue et n'a pas d'orthologue chez *M. hominis* PG21 et LDB-4. *Mhp371* est un précurseur de la protéine P37, un transporteur de type ABC (Sippel *et al.*, 2009). Cette protéine a un orthologue chez *M. hyorhinis* et deux chez *M. hominis* PG21 (MH0_3610 et MH0_3620). Chez *M. hyorhinis*, P37 a été décrite comme promouvant l'invasion de cellules cancéreuses de façon dose-dépendante et son effet est inhibé par un anticorps monoclonal spécifique (Ketcham *et al.*, 2005, Steinemann *et al.*, 1984). De plus, P37 pourrait favoriser la mobilité, la migration et l'invasion *in vitro* par l'activation de la matrix metalloproteinase-2 (MMP2) et l'induction de la

phosphorylation du récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR, epidermal growth factor receptor) (Gong *et al.*, 2008, Goodison *et al.*, 2007). Ainsi, ces gènes pourraient être impliqués dans l'invasion de la cellule hôte. Mhp366 est une lipoprotéine potentielle de fonction inconnue ne présentant pas d'orthologue chez les autres mycoplasmes.

Par micro-array, Cecchini *et al.* (Cecchini *et al.*, 2007) ont évalué la variation du transcriptome de *M. gallisepticum* souche R_{low} après contact avec des fibroblastes pulmonaires humains MRC-5. Ces auteurs ont montré que deux lipoprotéines étaient up-régulées. La première, MGA_993, était une lipoprotéine potentielle de fonction inconnue. La seconde était P47 qui est une protéine orthologue à MALP-404 de *M. fermentans* et P48 de *M. agalactiae*. L'hypothèse du rôle immunomodulateur de P47 sur des macrophages a été émise mais aucune étude ne l'a confirmée. Cependant, Markham *et al.* (Markham *et al.*, 2003) ont décrit que des mutants délétés en P47 ne présentaient pas de différence de pathogénicité avec des souches sauvages dans la pathogénicité sur des trachées de poulet. De plus, ces auteurs ont montré que P47 n'était pas nécessaire à l'attachement de *M. gallisepticum* aux cellules de l'hôte.

Enfin, par l'utilisation de qRT-PCR, Hallamaa *et al.* (Hallamaa *et al.*, 2008) ont observé que six gènes codant pour des lipoprotéines étaient significativement surexprimés après deux heures de contact de *M. pneumoniae* avec des cellules pulmonaires de lignée A549 (*mpn588*, *mpn199*, *mpn200*, *mpn456*, *mpn011* et *mpn411*). Seule la protéine MPN456 présente une homologie avec un composant d'un transporteur de type ABC décrit (COG4166) chez *M. genitalium* G37. Elle pourrait être impliquée dans l'adhésion ou dans les étapes initiales de l'infection.

2.2.4.2. Exemple de *M. hominis*

Plusieurs lipoprotéines de surface de *M. hominis* telles que l'adhésine Vaa, les Lmp et la P120 sont décrites dans la littérature pour leur variabilité. La première description de la variation de phase des protéines de surface de *M. hominis* a été réalisée en 1987 par Christiansen *et al.* par l'analyse de l'hétérogénéité génomique et protéique de 14 souches, dont PG21, issues d'habitats différents (Christiansen *et al.*, 1987). Olson *et al.* (Olson *et al.*, 1991a, Olson *et al.*, 1991b) ont ensuite évalué l'expression des protéines de surface de 14 souches de *M. hominis* obtenues successivement à partir de liquides synoviaux d'un unique patient atteint d'arthrite septique chronique. Des différences marquées dans l'expression des protéines de surface ont été déterminées par l'utilisation d'anticorps monoclonaux dirigés contre le premier isolat.

P120 a été caractérisée comme une lipoprotéine dès 1994 en raison de la présence d'un site de clivage d'une signal peptidase de type II (Christiansen *et al.*, 1994). La variation du gène *p120* a été décrite par Nyvold *et al.* en 1997 (Nyvold *et al.*, 1997). Cet antigène est reconnu par l'anticorps mAb 26.7D. Ce dernier a réagi avec 11 des 19 souches cliniques de *M. hominis* étudiées mais pas avec la souche de référence PG21 alors que l'ensemble des souches possédait le gène codant pour la P120. Lors de cette étude, le clonage et le séquençage du gène *p120* de *M. hominis* PG21 et de 6 isolats cliniques a révélé la présence d'un domaine hypervariable très hétérogène entre les souches. Pour analyser l'antigénicité, des protéines de fusion contenant ce domaine hypervariable de PG21 (aa 135-273) et de la souche 7488 (aa 137 à 271) ont été purifiées et utilisées comme antigènes en immunoblot avec des sérums de patients séropositifs. Les anticorps reconnaissaient le domaine hypervariable de P120 plus fréquemment et plus fortement chez la souche 7488 qui possède un gène *p120* relativement conservé par rapport à PG21. Il a été alors suggéré que cette variation permettait d'échapper au système immunitaire humoral. Zhang *et al.* (Zhang & Wise, 2001) ont montré que la protéine de surface P56 pouvait être masquée spécifiquement par la variation de phase de la lipoprotéine P120. Les clones exprimant des lipoprotéines P120 plus longues seraient résistants à l'effet inhibiteur d'anticorps dirigés contre la protéine P56. Des travaux similaires avaient été réalisés par Citti *et al.* (Citti & Wise, 1995). Ces auteurs ont montré que la longueur des Vlp de *M. hyorhinis* conditionne la survie du micro-organisme en présence de sérums de porcs infectés. Ils avaient déjà proposé que les Vlp plus longues pourraient masquer d'autres protéines de surface inconnues qui sont la cible des anticorps. La variation de la taille des lipoprotéines, en plus de limiter leur reconnaissance par des anticorps, potentialiserait l'échappement par le camouflage d'antigènes.

Zhang *et al.* (Zhang & Wise, 1996) ont montré la capacité de *M. hominis* 1620 à faire varier la longueur de sa lipoprotéine Vaa, une adhésine potentielle, par l'apparition de répétitions de petites sous-unités dans la séquence codante correspondante. Des allèles de *vaa* de taille variable codent pour différentes protéines de surface contenant une à quatre séquences répétées de 121 acides aminés dans sa région centrale. Le gain ou la perte de ces répétitions centrales donne lieu à des antigènes distincts dans des populations clonales de *M. hominis*. Les régions N-terminales et répétées de *vaa* contiennent des séquences hautement conservées, tandis que la région C-terminale, impliquée dans l'adhésion, est très variable et est différente entre les souches pathogènes. Ces données ont été approfondies par les travaux de Boesen *et al.* (Boesen *et al.*, 1998) qui ont suggéré une variation par recombinaison grâce à l'analyse de 42 souches cliniques de *M. hominis*. Ces auteurs ont montré l'existence de cinq catégories de gènes *vaa* avec une composition modulaire. Les

gènes codant pour Vaa sont constitués d'une région conservée correspondant à l'extrémité N-terminale suivie par un nombre variable de cassettes interchangeables codant pour environ 110 acides aminés avec des séquences conservées flanquant les cassettes. Le plus petit produit ne contenait qu'une seule cassette et le plus grand cinq. Cette structure du gène *vaa* qui est caractérisée par une quantité variable de cassettes homologues a été confirmée par Chernov *et al.* (Chernov *et al.*, 2005) chez 15 souches cliniques. Un second mécanisme moléculaire a été proposé grâce à une série de clones d'expression variable de Vaa issus d'une lignée isogénique. En effet, Zhang et Wise. (Zhang & Wise, 1997) ont montré qu'une mutation d'un unique nucléotide (insertion/délétion) dans une séquence de résidus adénines (poly-A) près de l'extrémité 5' de *vaa* créait un décalage du cadre de lecture (frameshift) entraînant soit une Vaa complète soit un codon stop UAG immédiatement en aval de la séquence promotrice poly-A. De plus, Boesen *et al.* (Boesen *et al.*, 1998) ont également observé deux mutations par des substitutions créant un codon stop et générant l'expression de protéines Vaa tronquées. L'antigène Vaa qui est exprimé *in vivo* est hautement immunogène. La variation de la taille de la région antigénique C-terminale par ces différents mécanismes pourrait affecter l'adhérence de *M. hominis* et favoriser l'évasion de l'immunité humorale, contribuant ainsi à la capacité d'adaptation de l'organisme dans l'hôte humain.

Parmi la famille des Lmp, la lipoprotéine variable Lmp1 a été initialement décrite chez *M. hominis* PG21 (Ladefoged *et al.*, 1990, Christiansen *et al.*, 1990). Cette lipoprotéine de surface est reconnue par un anticorps monoclonal Mab 552 et est codée par le gène *Imp1*. Le gène *Imp2* est situé juste en aval de *Imp1*. La première étude décrivant ces deux gènes (Ladefoged *et al.*, 1995) montrait qu'ils avaient respectivement 8 et 2 séquences répétées en tandem de 0,5 Kb. Un codon stop était présent dans la dernière répétition de *Imp1* empêchant la transcription de *Imp2* adjacent. Trois mutants de *M. hominis* PG21 qui présentaient des délétions des séquences répétées ont été décrits par Jensen *et al.* (Jensen *et al.*, 1995). Ces délétions de 0,5 kb ont été observées en réponse à l'utilisation de l'anticorps Mab 552 pendant trois mois. Quand la séquence répétée contenant le codon stop était délétée, le cadre ouvert de lecture était transcrit jusqu'à *Imp2*. Une agrégation spontanée des mutants était alors observée. Ladefoged *et al.* (Ladefoged *et al.*, 1996) ont montré la présence d'une seconde région *Imp3-Imp4* présentant la même organisation que *Imp1-Imp2* avec 9 éléments répétés de 0,5 kb. Ainsi, ces protéines Lmp de *M. hominis* sont soumises à une variation mutationnelle caractérisée par la perte ou le gain d'éléments répétés. Lors de l'annotation du génome de *M. hominis* PG21, huit Lmp-related proteins ont été décrites (MHO_0530, MHO_1640, MHO_0540, MHO_3070, MHO_3110, MHO_3730, MHO_4280 et MHO_4920). Leurs extrémités N-terminales présentaient un motif de 57 acides aminés répété une à 15 fois dans toutes les Lmp-related proteins à l'exception de

MHO_0530 and MHO_4280 (Pereyre *et al.*, 2009). La variation de la taille et du nombre de répétitions pourrait également favoriser l'échappement à l'immunité à médiation humorale.

3. Le système immunitaire inné humain et les mycoplasmes

3.1. Le système immunitaire inné

3.1.1. Définition

Le système immunitaire inné comprend les cellules et les mécanismes permettant la défense de l'organisme contre les agents infectieux de façon immédiate. Ses principales fonctions sont la constitution d'une barrière physique et chimique contre les agents infectieux, la détection des agents infectieux et le recrutement de cellules immunitaires sur le site de l'infection, l'activation de la cascade du complément permettant l'élimination de cellules mortes ou des complexes immuns, l'identification et l'élimination de corps étrangers par les leucocytes (natural killer, granulocytes et phagocytes dont les cellules dendritiques) et l'activation de l'immunité adaptative durable à travers la présentation antigénique. Cette thèse étudie l'interaction de *M. hominis* PG21 avec les cellules dendritiques qui appartiennent au système immunitaire inné.

3.1.2. Les cellules dendritiques

Les cellules dendritiques humaines (hDCs) doivent leur nom à la présence de longs prolongements cytoplasmiques appelés dendrites. Elles appartiennent au système réticulo-endothélial. Elles constituent une population rare (0,3% des cellules sanguines) et très hétérogène. Les cellules dendritiques ont été tout d'abord considérées comme toutes d'origine myéloïde et étroitement liées aux macrophages et aux granulocytes. Ceci est probablement encore le cas pour la majorité des cellules dendritiques, mais les données récentes indiquent une diversité d'origine, y compris une origine à partir de précurseurs lymphoïdes. Les cellules de Langerhans de la peau et des muqueuses, les hDCs interstitielles, les hDCs myéloïdes et les hDCs plasmacytoïdes constituent ainsi le pool des cellules dendritiques.

Les hDCs sont très présentes, à l'état immature, dans certains tissus comme les barrières cutanéomuqueuses, la peau ou l'intestin, où elles jouent un rôle de reconnaissance des constituants de surface des agents pathogènes, éléments structuraux conservés et répétés constituant les PAMPs (Pathogen Associated Molecular Pattern), ou des signaux de dangers émis par l'hôte lors de l'infection (danger-associated molecular patterns ou DAMPs) tels que les produits des cellules inflammées ou dégradées. Cette reconnaissance est établie par les récepteurs pour ces ligands, les PRR (Pattern-Recognition receptors) tels que les récepteurs membranaires appelés récepteurs Toll-like

Tableau 4. Toll-like récepteurs identifiés chez l'homme et la souris (d'après Botos et al., 2011 et Chatenoud et al., 2008).

| TLR | Expression chez l'homme | Expression chez la souris | Ligand(s) | Micro-organisme | Protéine(s) adaptatrice(s) | Localisation | Expression par les cellules dendritiques |
|--------|--------------------------------------|---------------------------|---|---|----------------------------|-----------------------------|--|
| TLR 1 | + | + | Triacyl lipopeptides Lipoprotéines | Bactéries | MyD88/MAL | Surface cellulaire | + |
| TLR 2 | + | + | Glycolipides Lipoprotéines Lipoprotéines Acide lipotéichoïque Zymosan (Béta-glucon de la paroi) | Bactéries, parasites Bactéries Bactéries Bactéries à Gram positif levures | MyD88/MAL | Surface cellulaire | + mDC |
| TLR 3 | + | + | ARN db | Virus | TRIF | Surface cellulaire | + |
| TLR 4 | + | + | LPS Heat shock protéines Endotoxines | Bactéries à Gram négatif Bactéries Bactéries | MyD88/MAL/ TRIF/TRAM | Surface cellulaire | + mDC |
| TLR 5 | + | + | Flagelline | Bactéries | MyD88 | Surface cellulaire | + |
| TLR 6 | + | + | Diacyl lipopeptides ADN sb | <i>Mycoplasma sp.</i> | MyD88/MAL | Surface cellulaire | - |
| TLR 7 | + | + | ARN sb | Virus | MyD88 | Compartment intracellulaire | + pDC |
| TLR 8 | + | - (forme inactivée) | ARN sb | Virus | MyD88 | Compartment intracellulaire | + |
| TLR 9 | + | + | Motifs CpG non méthylés de l'ADN, Sb ADN | Bactéries et virus | MyD88 | Compartment intracellulaire | + pDC |
| TLR 10 | + | - | Inconnu | | | | |
| TLR 11 | Forme tronquée probablement inactive | + | Profiline | <i>Toxoplasma gondii</i> | MyD88 | Compartment intracellulaire | - |
| TLR 12 | - | + | Inconnu | | | | - |
| TLR 13 | - | + | 23S ARNr | | | | - |

+, présence ; -, absence ; mDC, cellules dendritiques myéloïdes ; pDC, cellules dendritiques plasmacytoïdes ; MyD88, myeloid differentiation factor 88 ; TRIF, Toll/IL-1R (TIR) domain containing adaptor protein inducing IFN β ; MAL, MyD88 adaptor like et TRAM, TRIF-related adaptor molécule.

(TLR) ou des récepteurs cytoplasmiques tels que les NLR (nucleotide-binding and oligomerization domain (NOD)-like receptor). Elle provoque l'activation des hDCs et induit la capture des agents pathogènes par macropynocytose, endocytose ou phagocytose (Josien, 2008) afin de les dégrader dans les compartiments lysosomiaux, la production de cytokines inflammatoires et de facteurs du chimiotactisme ainsi que la polarisation de la réponse immunitaire adaptative.

3.1.3. Les Toll-like récepteurs

Treize TLRs (TLR1 à TLR13) ont été identifiés chez l'homme et la souris, et des formes équivalentes d'un grand nombre d'entre eux ont été décrites chez d'autres espèces de mammifères. Toutefois, les équivalents de TLRs humains ne sont pas présents chez tous les mammifères. Cette diversité complique le processus d'utilisation de modèles animaux pour l'étude de l'immunité innée de l'homme. Les lipoprotéines et les oligoglycanes des mycoplasmes, l'acide lipotéichoïque des Gram positif et le LPS de la membrane externe des Gram négatif constituent d'importants PAMPs reconnus par les TLRs. D'autres structures répétées telles que l'ADN bactérien présentant des motifs non méthylés de dinucléotides CpG non retrouvés dans l'ADN humain ou l'ARN viral peuvent être intégrés dans cette famille de ligands. Les TLR peuvent également reconnaître des signaux de danger émis par l'hôte (danger-associated molecular patterns ou DAMPs).

Il est important de comprendre qu'un agent pathogène donné peut présenter différents constituants qui seront reconnus simultanément par des TLRs distincts (Tableau 4). Par exemple, une bactérie à Gram négatif peut activer les TLR4 et TLR5 respectivement par le LPS et ses flagelles. Certains TLRs peuvent fonctionner sous forme de dimères. Le TLR2 peut former des hétérodimères avec TLR1 ou TLR6, chaque dimère ayant une spécificité de ligand différente (Figure 12). La sensibilité d'un ligand pour le TLR peut aussi dépendre d'autres co-récepteurs, comme dans le cas de la reconnaissance du LPS par le TLR4 qui se fait par l'intermédiaire de la protéine LBP (LPS Binding Protein) et du CD14 (Aderem & Ulevitch, 2000). A la différence des TLRs de surface cellulaire, tels que les TLR1, TLR2, TLR4 et TLR6, les TLRs situés dans les endosomes tels que les TLR7-9, TLR11 et TLR13, constituent un sous-groupe de TLRs détectant la présence de micro-organismes à l'intérieur des cellules.

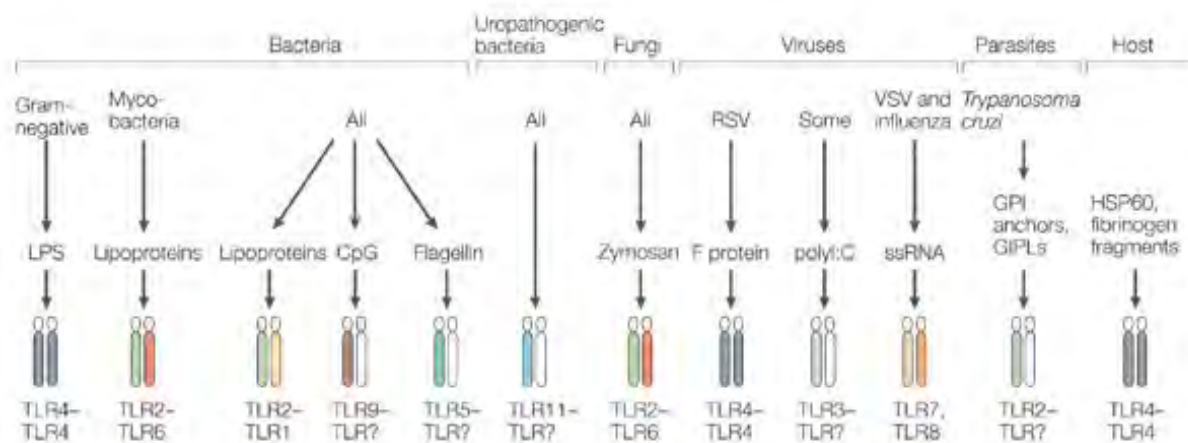


Figure 12. Affinité des récepteurs Toll-like (TLRs) pour les constituants des agents pathogènes ou PAMPs (Pathogen Associated Molecular Pattern) (Liew *et al.*, 2005). Les bactéries sont détectées par différents TLRs chez l'Homme. Le lipopolysaccharide (LPS) est le principal ligand de TLR4. L'acide lipoteichoïque et les lipoprotéines diacylées sont détectés par le dimère TLR2–TLR6 alors que les lipoprotéines triacylées le sont par le dimère TLR2–TLR1. Les motifs non méthylés de dinucléotides CpG non retrouvés dans l'ADN humain sont reconnus par le TLR9. La flagelline est reconnue par le TLR5. Le TLR11 est impliqué dans la réponse aux bactéries uropathogènes chez la souris mais son rôle chez l'homme n'est pas déterminé. Pour la réponse antifongique, le dimère TLR2–TLR6 détecte le zymosane, un complexe de protéines et de glucides de la membrane des cellules de levure. Cinq TLRs sont impliqués dans la réponse anti-virale en reconnaissant notamment des protéines virales, de l'ARN double brin, de l'ARN simple brin (ssRNA) ou de l'ADN. Les glycopeptides des protozoaires comme le glycosylphosphatidylinositol (GPI) est détecté par le TLR2. Finalement, les produits des cellules inflammées ou dégradées peuvent également être des ligands des TLR comme la heat-shock protein 60 qui est reconnue par le TLR4. Ce répertoire signifie que presque tous les agents pathogènes pour l'Homme seront détectés par les TLR. RSV, Virus respiratoire syncytial ; PolyI:C, ARN double brin ; VSV, virus de la stomatite vésiculaire.

Les TLRs ont une structure commune organisée en trois domaines, un domaine transmembranaire, un domaine extracellulaire et un domaine intracellulaire. Malgré le large éventail de ligands reconnus par les TLRs, les récepteurs partagent une structure extramembranaire commune en forme de fer à cheval, construite à partir de motifs répétés riches en leucine (LRR Leucine Rich Repeats), permettant la liaison des ligands (Botos *et al.*, 2011, Chatenoud, 2008). Ces motifs sont hautement conservés et varient selon les types de TLRs. Au niveau de leur domaine intracellulaire, tous les TLRs partagent le motif *Toll-Interleukine 1 receptor* (TIR) qui est essentiel à la transduction du signal cellulaire et qui, comme son nom l'indique est présent dans le domaine intracellulaire de l'IL-1. La signalisation intracellulaire, médiée par des molécules adaptatrices cytosoliques, diffère selon le TLR et la nature du PAMP en cause. Elle est présentée dans le paragraphe 3.2.1.

Tableau 5. Classification, structure et fonction des récepteurs NLR, nucleotide-binding domain et leucine-rich repeat containing (Motta et al., 2015).

| Subfamily | Protein Structure | Gene | Function | Activator | Human Disease |
|-----------|-------------------|--|---|----------------------------------|---|
| NLRA | | CIITA | MHC-II expression | IFN- γ | Bare lymphocyte syndrome |
| NLRB | | Naip | Control of <i>legionella pneumophila</i> infection | Flagelin | Spinal muscular atrophy |
| NLRC | | NOD1 | NF- κ B | DAP | Asthma; IBD |
| | | NOD2 | NK- κ B, autophagy, type1 Interferon production | MDP | Crohn's Disease, Blau syndrome |
| | | NLR3 | Negative regulator of T cell activation and response to LPS | Unknown | |
| | | NLR5 | Inflammatory response and MHC-I upregulation | IFN- γ , IFN- β | |
| | | NLR4 | Caspase 1 activation, cell death, phagosome maturation, | Rod proteins, flagellin | |
| NLRP | | NLRX1 | ROS production and antiviral response | Unknown | |
| | | NLRP1 | Response to anthrax bacteria | Lethal Toxin, MDP | Vitiligo, Type 1 diabetes |
| | | NLRP10 | Dendritic cell migration | Unknown | Beckwith-Wiedemann Syndrome |
| | | NLRPs 2-9,11-14 | | | |
| | | NLRP2 | Embryonic development, Caspase 1 activation | Unknown | Muckle-Wells, Familial Cold autoinflammatory syndrome |
| | | NLRP3 | Caspase 1 activation | ATP, Alum, Asbestos, Silica, ROS | |
| | | NLRP4 | Embryogenesis, type 1 interferon, autophagy | Unknown | |
| | | NLRP5 | Embryogenesis | Unknown | |
| | | NLRP6 | NF- κ B inhibition and caspase 1 activation | Unknown | |
| | | NLRP7 | Embryonic development, caspase 1 activation | Lipopeptides | Hydatiform mole |
| | NLRP12 | Inhibition of noncanonical NF- κ B, ERK and AKT pathway, activation caspase 1 | Yersinia | Hereditary periodic fever | |
| | NLRP14 | Spermatogenesis | | Spermatogenic failure | |



Les NLR composent une famille de récepteurs cytoplasmiques qui reconnaissent des composants bactériens et viraux ou des signaux cellulaires. Leur nomenclature a été unifiée par le HUGO Gene Nomenclature Committee en 2008. Les NLR ont une structure tripartite. Ils se subdivisent en 4 sous-familles selon la nature de leur extrémité N-terminale qui compose leur domaine effecteur et qui peut comprendre un motif CARD (caspase recruitment and activation domain), un domaine BIR (baculovirus IAP repeat), un domaine pyrine domain (PYD) ou un domaine de transactivation (TA). NLRC3, NLRC5, and NLRX1 n'ont pas de domaine effecteur défini. La partie centrale des NLR est composée du domaine NACHT important pour la liaison des NLR entre eux et leur extrémité terminale d'un domaine riche en leucine (LRR) servant de ligand aux différents agonistes. Les quatre sous-familles recrutent des caspases.

3.1.4. Inflammasomes

Un inflammasome est un complexe protéique cytosolique oligomérique impliqué dans l'immunité innée. Il contrôle l'activation des caspases inflammatoires (caspase 1, caspase 4 et caspase 5) qui induit la maturation par protéolyse des cytokines inflammatoires IL-1 β et IL-18 et la mort cellulaire inflammatoire appelée pyroptose, programme différent de l'apoptose (Latz *et al.*, 2013). Deux voies mènent à l'activation de l'inflammasome, une contenant un récepteur qui appartient à la famille des NLRs (nucleotide-binding and oligomerization domain (NOD)-like receptor) et une contenant un récepteur PYHIN composé d'un motif pyrine (death domain appelé PYD) et d'un motif HIN (hematopoietic expression, interferon inducible nature and nuclear localization).

Le génome humain contient 22 gènes codant pour des NLRs. Plusieurs récepteurs peuvent induire la formation d'inflammasomes tels que NLRP1, NLRP3, NLRC4 (NOD-LRR et CARD-containing 4 aussi appelé IPAF), NLRP6, NLRP7 et NLRP12. Ils sont caractérisés par leur structure tripartite (Tableau 5) avec un domaine central NOD (ou NACHT domain) qui a une fonction d'oligomérisation, une extrémité C-terminale avec un motif LRR et un domaine effecteur à son extrémité N-terminale qui peut être composé du motif PYD ou CARD (caspase-recrutement and activation domain), deux motifs death domains pouvant lier des motifs similaires. Le domaine LRR jouerait le rôle de détecteur de divers signaux tels que les PAMPs et les DAMPs. Mais il n'y a pas de preuve indiquant la capacité de ce domaine à se lier directement aux ligands.

AIM2 (absent in melanoma 2) et IFI16 (interferon-inducible protein 16), deux membres de la famille PYHIN, sont des récepteurs qui lient l'ADN double brin cytosolique respectivement par un ou deux domaines HIN présents à leur extrémité C-terminale. Ils possèdent une extrémité N-terminale présentant un motif PYD (Jin *et al.*, 2013). Ces deux récepteurs reconnaissent l'ADN double brin à partir de diverses sources (bactérien, viral, cellulaire), indépendamment de leur séquence ou de leur contenu en G+C%.

3.2. Activation des cellules dendritiques et voies engagées

3.2.1. Signalisation intracellulaire médiée par les TLRs

La fixation du ligand au dimère TLR induit l'activation des protéines adaptatrices cytosoliques. Celles-ci constituent le lien entre les TLRs et les kinases intracellulaires se trouvant en aval de la cascade d'activation et qui, à leur tour, vont activer le NF- κ B et des facteurs de transcription. A ce jour, cinq protéines adaptatrices appartenant à une même famille sont connues notamment MyD88 (myeloid differentiation factor 88) et TRIF (Toll/IL-1R (TIR) domain containing adaptator protein inducing IFN- β). Les signalisations cellulaires médiées par les TLRs sont divisées en deux voies distinctes, la voie MyD88-dépendante et

la voie TRIF-dépendante (Figure 13).

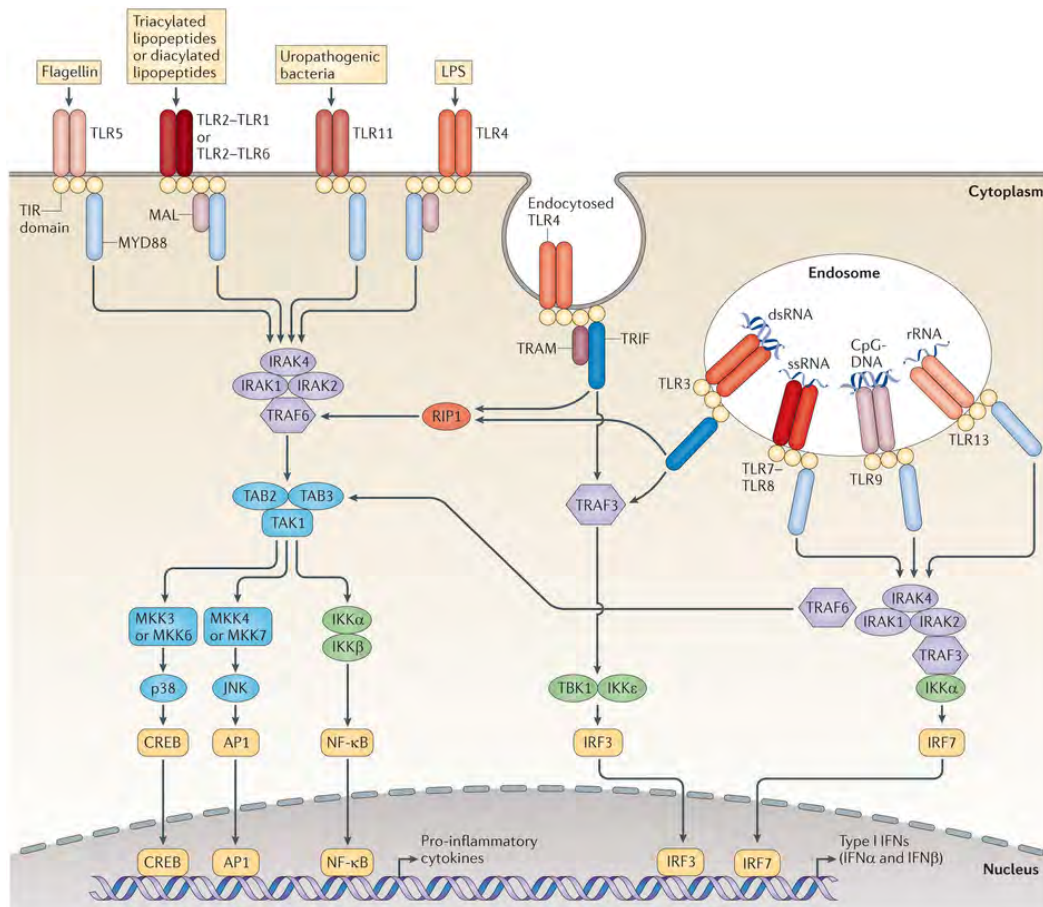


Figure 13. Signalisation intracellulaire médiée par les récepteurs Toll-like (TLRs) (O'Neill et al., 2013).

TLR5, TLR11, TLR4, et les hétérodimères de TLR2-TLR1 ou TLR2-TLR6 se lient à leurs ligands respectifs à la surface des cellules, alors que TLR3, TLR7-TLR8, TLR9 et TLR13 sont localisés dans les endosomes, où ils détectent notamment les acides nucléiques issus des agents pathogènes. TLR4 est situé à la fois au niveau de la membrane plasmique et des endosomes. La signalisation médiée par les TLRs est initiée par la dimérisation des récepteurs induite par un ligand. Puis, le domaine intracellulaire Toll-IL-1-résistance (TIR) des TLRs engage les protéines contenant un domaine adaptateur au domaine TIR comme la protéine *myeloid differentiation primary-response protein 88* (MYD88) et les protéines MYD88-adaptor-like (MAL) ou les protéines TRIF (Toll/IL-1R (TIR) domain containing adaptor protein inducing IFN- β) et les TRIF-related adaptor molecules (TRAM). Le TLR4 est le seul TLR à pouvoir utiliser les deux voies de signalisation. L'engagement des molécules adaptatrices stimule les voies de signalisation en aval qui impliquent des interactions entre les IL-1R-associated kinases (IRAKs) et les TNF receptor-associated factors (TRAFs), et mène à l'activation des mitogen-activated protein kinases (MAPKs), JUN N-terminal kinase (JNK) et de p38, et ainsi à l'activation des facteurs de transcription. Deux grandes familles de facteurs de transcription sont activés par la signalisation des TLRs, le NF- κ B et le facteur de régulation d'interféron (interferon-regulatory factors, IRF), mais d'autres facteurs de transcription, tels le cyclic AMP-responsive element-binding protein (CREB) et la protéine activatrice 1 (AP1) sont également importants. La conséquence majeure de la signalisation TLR est l'induction de cytokines pro-inflammatoires. dsRNA, ARN double brin ; IKK, inhibitor of kappa kinase ; LPS, lipopolysaccharide ; MKK, MAP kinase kinase ; RIP1, receptor-interacting protein 1 ; rRNA, ARN ribosomique ; ssRNA, ARN simple brin ; TAB, TAK1-binding protein ; TAK, TGF β -activated kinase ; TBK1, TANK-binding kinase 1.

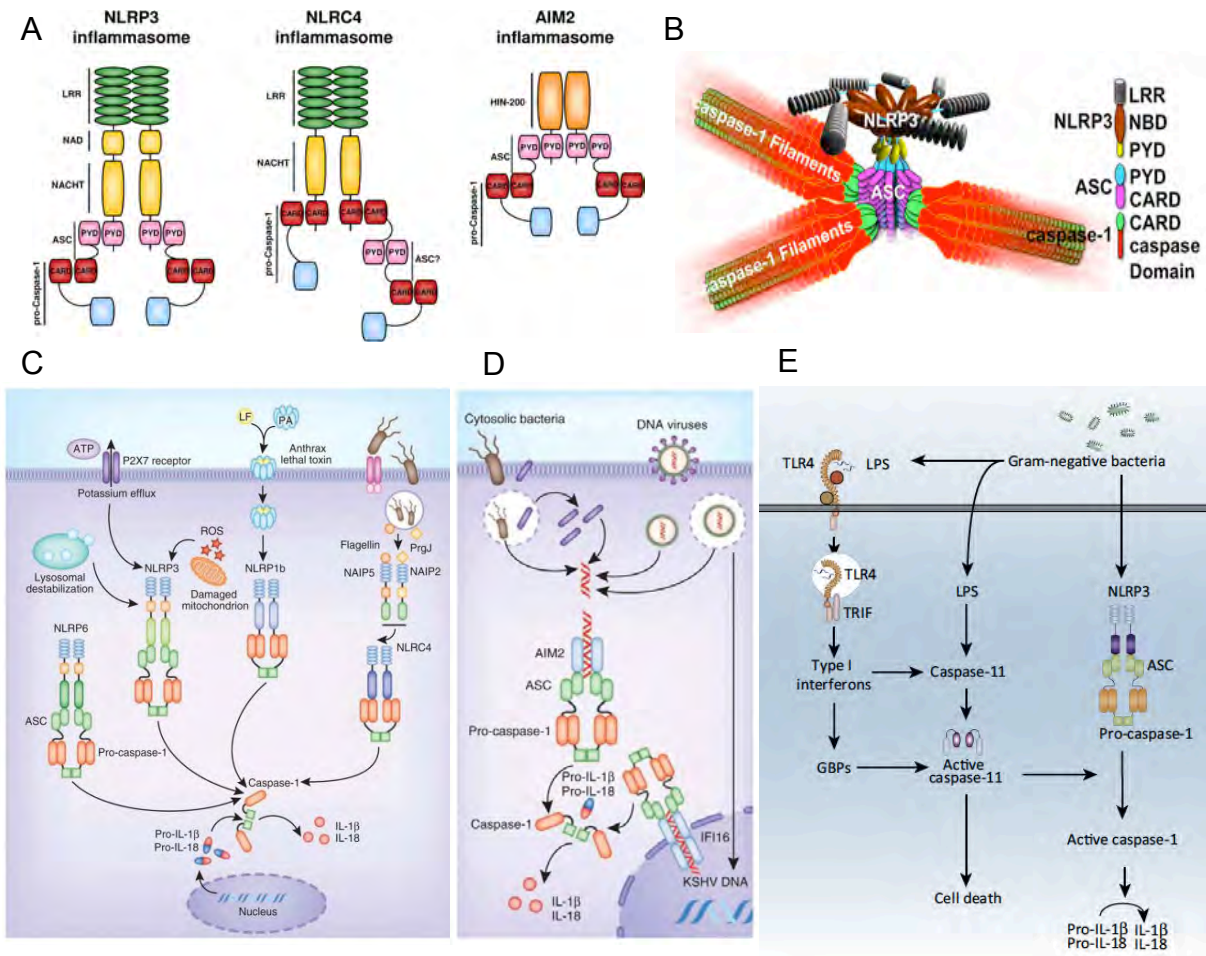


Figure 14. Activation des inflammasomes (d'après Eitel *et al.*, 2011, Lu *et al.*, 2014, Rathinam *et al.*, 2012 et Vanaja *et al.*, 2015). (A) Liaison des NLR activés aux protéines adaptatrices et/ou caspase. Les monomères des NLR ou PYHIN activés s'oligomérisent pour recruter les protéines adaptatrices ASC via leur domaine PYD. L'ASC lie les pro-caspases par le domaine CARD. NLRP3, NLRP6, NLRP12 et IFI6 sont constitués d'ASC et de caspase 1. NLRC4 et NLRP1 possèdent un domaine CARD qui leur permettent une liaison directe avec la caspase 1. Les protéines NAIP sont des protéines accessoire de NLRC4 qui jouent le rôle de récepteur des ligands bactériens. La liaison d'ASC avec NLRC4 et NLRP1 permettrait d'amplifier l'activation des pro-caspases. PYD, domaine pyrine. ASC, protéine adaptatrice. CARD, caspase recrutement and activation domain. HIN, domaine de liaison à l'ADN (hematopoietic expression, interferon inducible nature and nuclear localization). (Eitel *et al.*, 2011) (B) Structure du complexe oligomérique de l'inflammasome NLRP3. (Lu *et al.*, 2014) (C) Voie canonique des inflammasomes NLRP3, NLRP1, NLRP6, NLRP7 et NLRC1. (Rathinam *et al.*, 2012) (D) Activation des inflammasomes PYHIN, AIM2 et IFI16. AIM2 et IFI16 se lient directement à leur ligand, l'ADN. AIM2 est activé par l'ADN double brin cytosolique issu des virus à ADN et des bactéries. IFI16 est activé par l'ADN des herpes virus associé au sarcome de Kaposi (KSHV, Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus). (Rathinam *et al.*, 2012) (E) Voie non canonique de l'inflammasome activée par le LPS cytosolique. L'infection à bactérie à Gram négatif mène à l'activation de la voie TLR4-TRIF-IFN et de l'inflammasome NLRP3. L'IFN induit l'expression de la caspase 11. Celle-ci s'oligomérisent après liaison du LPS cytosolique puis clive la pro-caspase 1. (Vanaja *et al.*, 2015)

La réponse MyD88 dépendante est commune à tous les récepteurs TLRs à l'exception du TLR3. Son effet principal est l'activation du NF- κ B via l'activation de kinases IRAK, TRAF6 et TAK. Le TLR3 utilise uniquement la voie TRIF-dépendante. Cette voie est également utilisée par le TLR4 qui est le seul TLR à pouvoir utiliser les deux voies de signalisation. TRIF active IRF3, un facteur de transcription, via TBK1, permettant alors sa translocation dans le noyau et la production d'interféron. La signalisation des TLRs conduit finalement à l'induction ou la répression de l'expression de gènes qui orchestrent la réponse inflammatoire tels que TNF- α , IL-1, IL-6, IFN- α/β , prostaglandine E2 (PGE2).

3.2.2. Activation des inflammasomes

3.2.2.1. Voie canonique de l'inflammasome

L'inflammasome est un macrocomplexe protéique qui se forme dans le cytosol à la suite de la détection de pathogènes ou de signaux de stress cellulaire. Ce complexe a pour composants principaux les protéines de la famille des NLRs ou AIM2, une protéine adaptatrice ASC, et les caspases inflammatoires (caspase 1, 4 et 5). La voie canonique de l'inflammasome aboutit à la maturation et l'activation de la caspase 1 par clivage protéolytique. Sur les 22 membres de la famille des NLRs chez l'homme, plusieurs d'entre eux peuvent former des inflammasomes dans la cellule tels que NLRP1, NLRP3, NLRP6, NLRP7, NLRC4, AIM2 et IFI16.

L'inflammasome NLRP3 est le mieux caractérisé. Schématiquement, le récepteur NLRP3 est présent dans le cytoplasme sous la forme de monomères. Après activation par des PAMPs ou des DAMPs, NLRP3 change de conformation pour libérer l'accès au domaine NACHT afin de former des oligomères par rapprochement de ces domaines entre eux (Figure 14.A). Dans cette conformation, les domaines PYD servent de plateforme de recrutement pour les protéines adaptatrices ASC qui se lient aux NLRP3 par leur propre domaine PYD. En effet, NLRP3 n'a pas la capacité de lier directement la pro-caspase 1. Par son domaine CARD, l'ASC recrute des monomères de pro-caspase 1. Un complexe protéique discal se forme alors (Figure 14.B). La proximité des caspases induit l'autoprotéolyse des pro-caspases. Celles-ci sont clivées en 2 fragments, la sous-unité p10 et p35 contenant le CARD. Puis p35 est clivée à nouveau en CARD et une sous-unité p20. Deux sous-unités p20 et deux sous-unités p10 forment un hétérotétramère composant une caspase 1 active. La caspase 1 est une acide aspartique-spécifique cystéine protéase qui clive la pro-IL-1 β et la pro-IL-18. Les formes actives des cytokines sont relâchées par la cellule et exercent leur action pro-inflammatoire. De plus, la caspase 1 active possède d'autres fonctions telles que l'induction de la mort cellulaire programmée appelée « Pyroptose », la régulation de synthèse lipidique et le clivage d'enzymes du métabolisme.

La transcription de la pro-IL-1 β est induite par l'activation des TLRs via le facteur de transcription NF- κ B alors que la production d'IL-18 est constitutive mais son expression est augmentée après l'activation cellulaire (Latz *et al.*, 2013).

Plusieurs micro-organismes tels que *Staphylococcus aureus*, *L. monocytogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *N. gonorrhoeae*, *Candida albicans* et le virus de la grippe *Influenza virus A* activent NLRP3. De plus, NLRP3 est activé par une pléthore de signaux endogènes de danger dont l'ATP extracellulaire, l'acide hyaluronique et les cristaux d'acide urique (Rathinam *et al.*, 2012a) ou de cholestérol. Le mécanisme exact par lequel NLRP3 est activé n'est pas établi en raison de l'absence de preuve de la liaison de ces différents ligands au NLRP3. Trois mécanismes ont été décrits comme participant à l'activation de NLRP3 : l'efflux de potassium qui peut être induit par des cytotoxines bactériennes comme les hémolysines qui forment des pores dans la membrane et par l'ATP extracellulaire qui ouvre le pore cationique P2X7, la génération de radicaux libres oxygénés au niveau mitochondrial et une déstabilisation lysosomale après digestion des micro-organismes pathogènes (Rathinam *et al.*, 2012a).

Parmi les inflammasomes canoniques, NLRP3, NLRP6, NLRP12, AIM2 et IFI16 sont associés à l'ASC et la caspase 1 (Figure 14.C et 14.D). NLRP6 interviendrait dans le maintien du microbiote. Le rôle de NLRP12 dans les infections bactériennes n'est pas clairement établi.

NLRP4 et NLRP1 possèdent un domaine CARD qui leur permet un recrutement direct de la pro-caspase-1 (Figure 14.A). L'inflammasome NLRP4 joue un rôle dans les infections à bactéries à Gram négatif et répond principalement à la flagelline et au complexe PrgJ, un système de sécrétion de type III (Figure 14.C) (Zhao *et al.*, 2011). Les protéines NAIP sont des protéines accessoires de NLRP4 qui jouent le rôle de récepteur des ligands bactériens. NLRP1 est activé par la toxine léthale de *Bacillus anthracis*.

3.2.2.2. Voie non canonique de l'inflammasome

La voie non canonique de l'inflammasome (Figure 14.E) correspond à l'activation de la caspase 11 murine et des caspases 4 et 5 humaines (Shi *et al.*, 2014). La caspase 11 murine est la plus étudiée à ce jour. L'activation de la voie non canonique de l'inflammasome menant à l'activation de la caspase 11 a été observée en réponse à de nombreuses bactéries à Gram négatif (*Citrobacter rodentium*, *E. coli*, *Vibrio cholerae*, *Salmonella typhimurium*), mais pas chez les bactéries à Gram positif (Rathinam *et al.*, 2012b). Le LPS induirait la production d'IFN- β par la stimulation de la voie TLR4-TRIF. L'IFN- β sécrété agirait alors de façon autocrine sur le récepteur IFN- $\alpha\beta$ (IFNAR) activant la transcription de la caspase 11 qui est exprimée faiblement à l'état basal. La caspase s'oligomériserait après

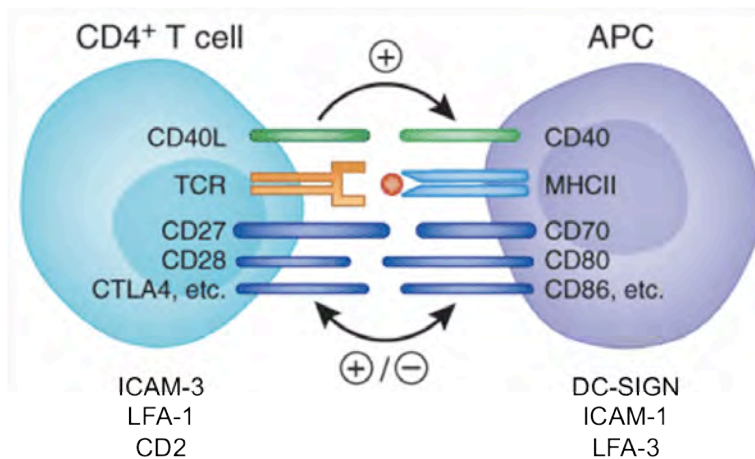


Figure 15. Interactions entre la cellule présentatrice d'antigène et le lymphocyte T (d'après Haanen & Schumacher, 2007). APC, cellule présentatrice d'antigène. L'interaction du complexe CMH-II/peptide et du TCR est de faible affinité. Elle est renforcée par les molécules d'adhésion qui permettent une stabilisation de la liaison pendant le temps nécessaire à l'activation des cellules T. Celles-ci appartiennent à la famille des intégrines (LFA-1, CD11b) ou à la superfamille des immunoglobulines (CD2, CD45/ICAM-1, CD58/LFA-3). Certaines cellules dendritiques comme les cellules dendritiques myéloïdes expriment un récepteur de type lectine appelé DC-SIGN qui a une haute affinité pour ICAM-3 exprimé à la surface du lymphocyte T. L'activation de la cellule T naïve nécessite un signal de co-stimulation, présent à la surface des CPA. Ainsi, les cellules dendritiques matures expriment à leur surface de fortes quantités de molécules de co-stimulation CD80 et de CD86 qui interagissent avec le CD28 du lymphocyte T. La sécrétion d'interleukine par la cellule dendritique (IL-6, IL-12, IL-23 et TGF β par exemple) constitue le troisième signal d'activation des lymphocytes T naïfs. Lors de l'activation de la cellule T, les cellules dendritiques reçoivent en retour des signaux d'activation par l'intermédiaire de molécules de la superfamille du TNF comme le CD40L (CD154) dont le récepteur CD40 est situé sur la cellule dendritique. Cette stimulation en retour induit une augmentation de l'expression des molécules de co-stimulation et la production d'interleukines amplifiant la réponse immunitaire.

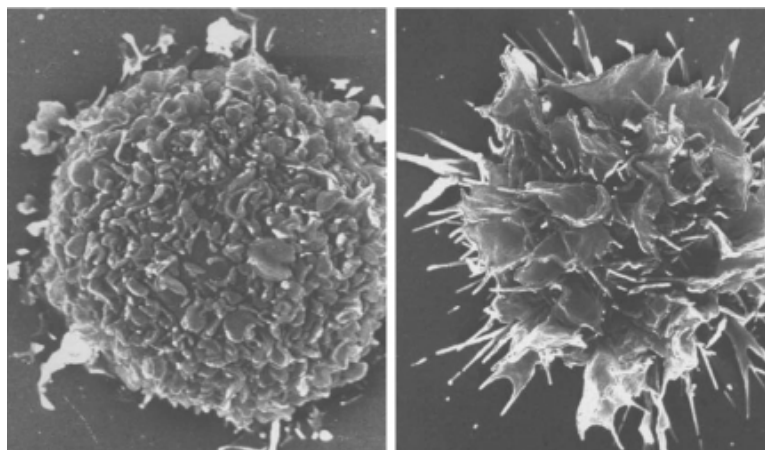


Figure 16. Cellule dendritique immature (à gauche) et mature (à droite) en microscopie électronique (Steinman *et al.*, 2007). Les changements morphologiques des cellules dendritiques sont induits par la reconnaissance et la capture des agents pathogènes. Ils incluent une réorganisation du cytosquelette avec l'apparition de projections cytoplasmiques très mobiles favorisant les contacts entre la cellule dendritique et le lymphocyte T et une diminution de l'adhérence.

liaison directe au LPS cytosolique issu des bactéries (Hagar *et al.*, 2013, Kayagaki *et al.*, 2013, Shi *et al.*, 2014) et contrôlerait le clivage de la caspase 1 selon un mécanisme non élucidé. Une étude récente a montré que les caspases 4 et 5 peuvent lier directement le LPS et induire la mort cellulaire par pyroptose selon le même mécanisme que la caspase 11 (Shi *et al.*, 2014).

3.2.3. Maturation phénotypique des cellules dendritiques

Les cellules dendritiques sont présentes à l'état immature dans les tissus. Elles doivent subir une étape de maturation qui correspond à l'ensemble des modifications phénotypiques et fonctionnelles transformant de façon coordonnée une cellule immature aux propriétés uniques de capture en cellule dendritique mature capable de migration vers les organes lymphoïdes et d'apprêtement des peptides antigéniques pour induire efficacement les lymphocytes T composants de l'immunité adaptative.

A l'état immature, les cellules dendritiques expriment fortement les TLRs caractérisant leur grande aptitude de capture. Cette disposition est diminuée considérablement pendant la maturation. L'expression des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de type II (CMH-II) est augmentée en raison de l'accroissement transitoire de leur synthèse associé à leur exportation vers la surface cellulaire. Une augmentation des molécules de co-stimulation (CD80, CD86, CD40, RANK) et d'adhésion (CD54, CD58) est observée. L'apparition du CD83 à la surface affirme le statut mature de ces cellules mais son rôle reste pour l'instant peu connu (Lechmann *et al.*, 2002a, Lechmann *et al.*, 2001, Lechmann *et al.*, 2002b). Les cellules dendritiques acquièrent des capacités de migration par l'expression de CCR7 sensible aux chémokines. Elles deviennent également sensibles au MIP-3 α exprimé dans les zones T des organes lymphoïdes où sont attirées les cellules dendritiques matures (Banchereau & Steinman, 1998). Cette migration est contemporaine de la maturation.

Après capture de l'agent infectieux, les courts peptides antigéniques issus de la dégradation par les protéases endosomales sont associés au CMH-II. Ils sont présentés aux lymphocytes T naïfs CD4+ pour activation de l'immunité adaptative après migration des cellules dendritiques dans les organes lymphoïdes. Au niveau du ganglion, elles vont pouvoir stimuler les lymphocytes T naïfs via leurs molécules de co-stimulation, de présentation et d'adhésion exprimées à leur surface (Figure 15). Lors de la maturation, les changements morphologiques des DC incluent une réorganisation du cytosquelette avec l'apparition de projections cytoplasmiques très mobiles (Figure 16) favorisant les contacts entre la cellule dendritique et le lymphocyte T et une diminution de l'adhérence. Ces modifications peuvent être observées *in vivo* et *in vitro*.

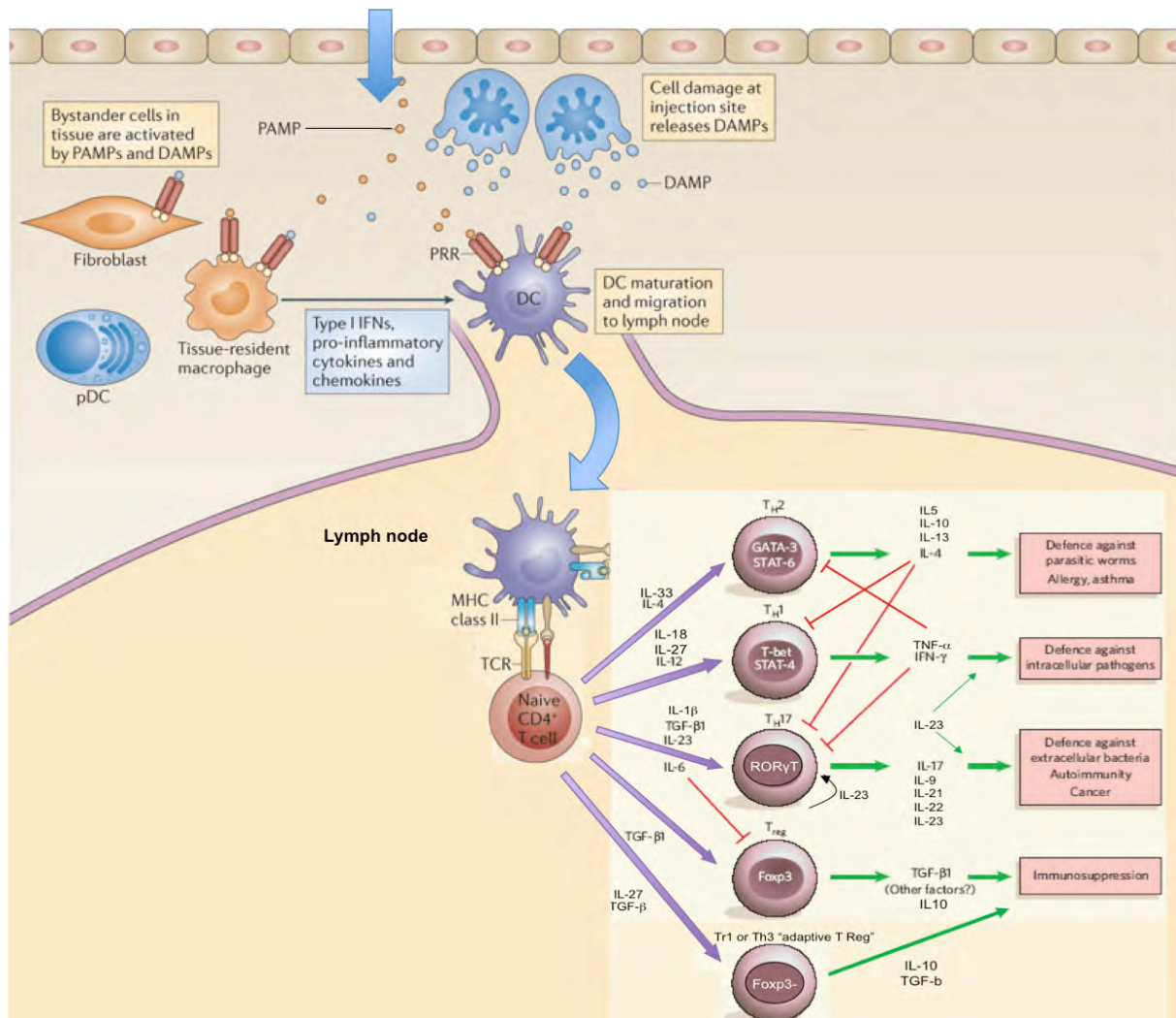


Figure 17. Polarisation de l'immunité adaptative (d'après Eisenbarth *et al.*, 2009, Chakir *et al.*, 2003, Rengarajan *et al.*, 2000, Manel *et al.*, 2008, Josefowicz *et al.*, 2012). Les cellules T CD4⁺ se différencient en quatre sous-ensembles, les cellules T-helper 1 (Th1), les Th2, les Th17 et les cellules T à l'activité régulatrice (T régulateurs ou Treg) qui sont caractérisées par des profils distincts d'expression de cytokines et de récepteurs. Ainsi, les lymphocytes T CD4⁺, après la liaison du TCR au complexe CMH-II/peptide présentation du complexe peuvent se différencier en lymphocytes Th1, Th2, Th17 ou Treg selon les cytokines sécrétées par la cellule dendritique et le lymphocyte lui-même et selon le facteur de transcription activés. Il s'agit du *T-box expressed T-Cells* (T-bet) pour la voie Th1, du *GATA binding protein* pour la voie Th2 (GATA-3), du *Retinoid-related Orphan Receptor gamma T* (ROR γ T) pour la voie Th17 et du Forkhead box Protein 3 (Foxp3) pour les cellules Treg. Les lymphocytes Th1, qui produisent de manière préférentielle de l'IL-2, de l'IFN- γ et du TNF- α , sont impliqués dans l'activation macrophagique, les réactions d'hypersensibilité retardée et l'élimination des pathogènes intracellulaires par l'activation de l'immunité cellulaire. Les lymphocytes Th2, qui produisent préférentiellement de l'IL-4, de l'IL-5, de l'IL-10, de l'IL-13 et de l'IL-25, favorisent la prolifération et la différenciation des lymphocytes B et la production d'anticorps (immunité humorale). Les cellules Treg par la production de cytokines immunosuppressives (IL-10, TGF- β ou IL-35) et la consommation d'IL-2, ont la propriété d'inhiber la prolifération des autres lymphocytes T effecteurs. Elles sont nécessaires au maintien de la tolérance immunitaire et participent donc au maintien de l'homéostasie. Les lymphocytes Th17 qui produisent de l'IL-9, l'IL-17A, l'IL-17F, l'IL-21, l'IL-22 et l'IL-23 intervient dans l'élimination des agents infectieux extracellulaires (bactéries, levures) et a un rôle dans l'auto-immunité. APC, cellule présentatrice d'antigène.

3.3. Polarisation du système immunitaire adaptatif

Les cellules dendritiques matures sont les seules cellules présentatrices d'antigènes (CPA) capables d'activer les lymphocytes Th CD4⁺ naïfs *in vitro* et *in vivo*. Après contact avec les PAMPs, les CPA polarisent le système immunitaire adaptatif par trois signaux qui sont : la reconnaissance par un TCR lymphocytaire d'un peptide antigénique apprêté par le CMH-II, l'interaction de molécules de co-stimulation (ou co-récepteurs) et la sécrétion d'interleukines (Figure 17). Ces signaux s'effectuent au niveau la synapse immunologique entre la CPA et le lymphocyte (Figure 15).

Des travaux effectués dans notre laboratoire ont montré que *M. hominis* PG21 polarise de la réponse immunitaire adaptative vers la voie Th17 *via* la sécrétion d'IL-23 par les hDCs (Truchetet *et al.*, 2011). Les mécanismes d'activation de la voie Th17 sont complexes et tous les auteurs ne sont pas d'accord à propos des cytokines impliquées dans la voie Th17 chez l'homme (Terhune *et al.*, 2013). Pour Volpe *et al.* (Volpe *et al.*, 2008), le TGF- β , l'IL-23, l'IL-6 et l'IL-1 β sont indispensables à la différenciation des cellules Th17 (Figure 17). L'IL-6 activerait notamment le signal STAT3 (pour Signal *Transducer and Activator of Transcription* 3). Celui-ci active à son tour l'IRF-4 et le facteur de transcription Runx1, pour un engagement total des précurseurs de la lignée IL-17. Ce signal augmente l'expression du facteur de transcription ROR γ t qui agit en coopération avec le facteur ROR α pour favoriser l'expression de l'IL-9, l'IL-17A, l'IL-17F, l'IL-21, l'IL-22 et l'IL-23.

3.4. Stimulation du système immunitaire inné par *M. hominis*

3.4.1. Stimulation du système immunitaire inné par *M. hominis* entier

L'un des rôles du système immunitaire inné est de recruter de cellules immunitaires sur le site de l'infection grâce à la production de facteurs chemo-attractant par les cellules infectées. Peu d'études ont analysé la réponse des cellules épithéliales à l'infection par *M. hominis*. Les premières études menées ont montré que *M. hominis* PG21 entier ou inactivé par la chaleur induisait la production d'IL-8 et du peptide d'activation des neutrophiles (CXCL5 ou ENA-78) par les cellules épithéliales pulmonaires A549 (Kruger & Baier, 1997). Ces molécules seraient responsables de l'afflux de polynucléaires neutrophiles observé dans les bronchodysplasies des enfants nés prématurément et colonisés *in utero* par *M. hominis*. De plus, Baier *et al.* (Baier & Kruger, 2000) ont démontré que *M. hominis* PG21 entier ou inactivé par la chaleur induisait l'expression de façon temps et dose dépendante de MCP-1 (aussi appelé CCL2), un facteur du chimiotactisme des macrophages, par les cellules épithéliales pulmonaires. Hopfe *et al.* (Hopfe *et al.*, 2013) ont montré que 4h après l'infection de cellules épithéliales HeLa par *M. hominis* PG21, les gènes

codant pour les cytokines IL-1 β et IL-6 et pour les facteurs du chimiotactisme CXCL1 et CXCL2 étaient régulés à la hausse.

La reconnaissance de *M. hominis* par les cellules dendritiques induit leur maturation et la production de cytokines. En 1998, Crouse *et al.* (Crouse *et al.*, 1998) avaient observé que *M. hominis*, vivant ou traité par la chaleur, stimulait une production dose-dépendante de TNF- α et de monoxyde d'azote (NO \cdot) par des cellules macrophagiques murines. En 2011, notre équipe a mis en évidence la capacité d'induction de l'expression de cytokines (IL-23, IL-10 et TNF- α) par des hDCs lors d'une co-culture de *M. hominis* PG21 entier ou inactivé par la chaleur (Truchetet *et al.*, 2011). Ces travaux ont permis de montrer une augmentation significative de l'expression des marqueurs CD80, CD86, CD83, CD40, et du HLA-DR à la surface des hDCs, indiquant leur maturation phénotypique. Ces travaux ont confirmé les données publiées par Scott *et al.* en 2005. Ces auteurs avaient décrit que *M. hominis* PG21 entier ou inactivé par fixation au paraformaldéhyde entraînait une maturation des hDCs. Ces deux travaux ont permis de comprendre que *M. hominis* PG21 induisait donc fortement la production de TNF- α , d'IL-10 et d'IL-23 et faiblement d'IL-12 (Scott *et al.*, 2005, Truchetet *et al.*, 2011). Ces résultats ont été confirmés par la détection des ARNm de l'IL-23 chez des hDCs stimulées (Truchetet *et al.*, 2011). Cet effet immunomodulateur sur les hDCs est dépendant du TLR2. En effet, l'utilisation d'un anticorps anti-TLR2 inhibe la production d'IL-23 (Truchetet *et al.*, 2011). Une sécrétion de TNF- α TLR2-dépendante a aussi été mise en évidence chez les monocytes humains de lignée THP-1 stimulés par *M. hominis* PG21 entier (Peltier *et al.*, 2005). En conséquence, le TLR2 peut être considéré comme un récepteur clé qui régule l'expression différentielle de l'IL-23 et de l'IL-12 chez *M. hominis* PG21 (Gerosa *et al.*, 2008, Truchetet *et al.*, 2011).

Enfin, des travaux effectués dans notre laboratoire ont montré que *M. hominis* PG21 entraîne la maturation des hDCs et la sécrétion de cytokines avec un rapport IL-23/IL-12 très en faveur de l'IL-23 (Truchetet *et al.*, 2011). Les lymphocytes T CD4 $^+$ cultivés en présence de hDCs infectées par *M. hominis* PG21 produisent de l'IL-17. Il y aurait ainsi une polarisation de la réponse immunitaire adaptative vers la voie Th17 *via* la sécrétion d'IL-23.

3.4.2. Stimulation du système immunitaire inné par les lipoprotéines membranaires des mycoplasmes du groupe Hominis

3.4.2.1. *M. hominis*

L'extraction de vésicules de membranes de *M. hominis* PG21 à l'aide du détergent non dénaturant TX-114 a montré que l'activité immunomodulatrice de la bactérie peut être principalement attribuée à la fraction contenant les lipoprotéines amphiphiles associées à la membrane (Peltier *et al.*, 2005, Truchetet *et al.*, 2011). Au sein de cette fraction

membranaire extraite au TX-114, Peltier *et al.* (Peltier *et al.*, 2005) ont partiellement purifié une lipoprotéine de 29 kDa pouvant activer la production de TNF- α chez des cellules macrophagiques de lignée humaine THP-1. Cette lipoprotéine a été nommée MSA pour Macrophage-stimulating activity. Peltier *et al.* ont montré par l'utilisation de cellules transfectées avec TLR2 et TLR4 que l'extrait membranaire TX-114 de *M. hominis* PG21 activait la transduction d'un signal TLR2 dépendant uniquement.

Hasebe *et al.* (Hasebe *et al.*, 2014) ont ensuite caractérisé, par l'extraction de vésicules membranaires de *M. hominis* H29 à l'aide d'octyl glucopyranoside (OG), une lipoprotéine de 40 kDa qui pouvait activer le production de TNF- α par les cellules THP-1 et les cellules macrophagiques murines RAW 247.7. Cette lipoprotéine appelée P50t correspondait à une forme tronquée de l'adhésine variable Vaa. L'activation des cellules THP-1 par cette lipoprotéine était TLR2 dépendante.

3.4.2.2. *M. arthritidis*

M. arthritidis est un pathogène naturel des rongeurs responsable de polyarthrites aiguës chez le rat et de polyarthrites chroniques prolifératives chez la souris. Il est proche phylogénétiquement de *M. hominis* (Figure 1). Il n'est pas pathogène pour l'homme, mais son implication dans la survenue de maladies inflammatoires chroniques chez la souris en fait un modèle d'étude de choix. *M. arthritidis* possède plusieurs facteurs de virulence dont le « *Mycoplasma Arthritidis* Mitogen » ou MAM, seul superantigène décrit à ce jour chez les mycoplasmes. Ses propriétés stimulatrices de cellules spléniques ont été découvertes en 1977 (Cole *et al.*, 1977). Ce superantigène est observé chez l'ensemble des souches de *M. arthritidis*. Il interagit directement avec le TLR2 et le TLR4 (Mu *et al.*, 2005) et entraîne la production d'IL-1 β et de TNF- α par les cellules monocytaires humaines THP-1 (al-Daccak *et al.*, 1994). Les lipoprotéines membranaires de *M. arthritidis* jouent également un rôle important dans la pathogénie de ce mycoplasme. En 2005, Cole *et al.* (Cole *et al.*, 2005) ont partiellement isolé et purifié de ce microorganisme trois facteurs de 24, 28 et 40 kDa stimulant la production de TNF- α par les macrophages murins RAW 264.7 et les cellules dendritiques murines XS52, et qui agiraient de façon synergique avec le MAM. Ces facteurs de stimulation ont été extraits de *M. arthritidis* par le TX-114. Ils induisent la maturation des cellules dendritiques via le TLR2 et le CD14. Par ailleurs, quatre lipoprotéines de 17, 34, 37 et 41 kDa, ont été isolées à partir d'extraction à l'OG. La production de TNF- α par les cellules péritonéales et macrophagiques murines par chacune de ces lipoprotéines était dépendante du TLR2 et du CD14. Ces quatre lipoprotéines sont toutes apparentées à la famille des protéines Mlp (murein lipoprotein) de *M. arthritidis*, de fonction inconnue.

3.4.2.3. *M. fermentans*

M. fermentans est un mycoplasme humain retrouvé au niveau du tractus uro-génital dont le pouvoir pathogène est mal connu. Le MDHM pour Mycoplasma-Derived High Molecular weight material, stimulateur de la production d'IL-1, d'IL-6, de TNF et de prostaglandines par des thymocytes murins, des macrophages murins et des monocytes humains issus du sang périphérique (Muhlradt *et al.*, 1991, Quentmeier *et al.*, 1990, Quentmeier *et al.*, 1994), a été isolé de fractions membranaires (non extraites par des détergents) et correspondrait à un mélange de lipoprotéines (Muhlradt *et al.*, 1996).

Mühlradt *et al.* ont caractérisé un lipopeptide membranaire de 2 kDa appelé MALP-2 (Macrophage-activating lipopeptide -2) qui, comme son nom l'indique peut favoriser de façon dose-dépendante la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-6, l'IL-8 et le TNF- α par les macrophages humains et murins (Muhlradt *et al.*, 1997). Cette stimulation est médiée par le TLR2 associé en hétérodimère au TLR6. MALP-2 induit la maturation phénotypique des hDCs caractérisée par une augmentation de l'expression du CD80, CD86, CD40 et la sécrétion d'IL-10 (Kruger & Baier, 1997). MALP-2 est une forme clivée d'une lipoprotéine mature, MALP-404, qui est soumise à protéolyse (Davis & Wise, 2000).

En 2012, Liu *et al.* (Liu *et al.*, 2012) ont montré que la fraction TX-114 de *M. fermentans* M64 a la capacité d'activer le NF- κ B chez des cellules macrophagiques RAW 264.7. Par SDS-PAGE et LC-MS/MS, ces auteurs ont identifié *in silico* un total de 21 lipoprotéines potentiellement immunomodulatrices, parmi lesquelles, des lipoprotéines variables comme OppA ainsi que MALP-404.

3.4.2.4. *Autres mycoplasmes du groupe Hominis*

Herbelin *et al.* (Herbelin *et al.*, 1994) ont montré que des lipoprotéines de membrane partiellement purifiées de *M. arginini* TUH-14 peuvent induire la sécrétion des cytokines IL-1, TNF- α et IL-6 par les monocytes humains.

Mühlradt *et al.* (Muhlradt *et al.*, 1998) ont décrit la capacité d'activation de macrophages péritonéaux de souris par les lipoprotéines VlpA, VlpC de *M. hyorhinis* et de leurs dérivés synthétiques.

Shibata *et al.* (Shibata *et al.*, 2000) ont également constaté que les lipoprotéines de *M. salivarium* peuvent activer des fibroblastes gingivaux humains (HGF) pour induire la production de cytokines inflammatoires et l'expression à la surface de l'ICAM-1. Ils ont purifié une lipoprotéine, LP44, de 44 kDa responsable de l'activité. La structure de la partie N-terminale de LP44 a été déterminée et un lipopeptide FSL-1 (fibroblast-stimulating lipopeptide, Pam₂-CGDPKHPKSF) correspondant à la LP44 avec une séquence en acides aminés tronquée a été synthétisé. FSL-1 se distingue de MALP-2 (Pam₂-CGNNDENISFKEK) par la séquence en acides aminés et la longueur de la partie

Tableau 6. Activation des TLRs humains par différentes fractions lipoprotéiques issues de différentes espèces de mycoplasmes.

| Groupe | <i>Hominis</i> | | | | <i>Pneumoniae</i> | | |
|-----------|--|------------------------------|---|--|---|-----------------------------------|---|
| | <i>M. hominis</i> | <i>M. arthritidis</i> | <i>M. fermentans</i> | <i>M. hyorhinis</i> | <i>M. pneumoniae</i> | <i>M. penetrans</i> | <i>M. genitalium</i> |
| Espèce | MSA, P50t, | MAM | LP | Myco, | MPPL-1 | LAMP | MG149 |
| Ligand | Extrait Triton X-114 | | MALP-2 | VlpA, VlpC | LP | LP | |
| TLR1 | - | - | - | - | - | + | - |
| TLR1/2 | - | - | - | - | - | - | + |
| TLR2 | + | + | - | - | + | + | - |
| TLR2/6 | - | - | + | - | - | - | - |
| TLR2/CD14 | - | - | - | - | - | - | + |
| TLR4 | - | + | - | + | + | - | - |
| TLR6 | - | - | - | - | - | - | - |
| Référence | (Peltier <i>et al.</i> , 2005, Hasebe <i>et al.</i> , 2014, Truchetet <i>et</i> <i>al.</i> , 2011) | (Mu <i>et al.</i> , 2006) | (Into <i>et al.</i> , 2004, Shimizu <i>et al.</i> , 2004) | (Duan <i>et al.</i> , 2014, Muhlradt <i>et</i> <i>al.</i> , 1998) | (Saraya <i>et al.</i> , 2011, Shimizu <i>et al.</i> , 2008, Shimizu <i>et al.</i> , 2014, Into <i>et al.</i> , 2007) | (Shimizu <i>et al.</i> , 2004) | (He <i>et al.</i> , 2009, Shimizu <i>et al.</i> , 2004) |

MSA, Macrophage-stimulating activity ; MAM, *Mycoplasma arthritidis* mitogen ; LP, lipoprotéines ; LAMP, Lipid Associated Membrane Protein (lipoprotéines membranaires) ; Myco, mycoplasme entier.

peptidique, mais ils contiennent tous les deux, deux acides gras liés au résidu cystéine par une liaison ester et une extrémité N-terminale libre. Okusawa *et al.* (Okusawa *et al.*, 2004) ont décrit un niveau d'activité de FSL-1 supérieur à celui de MALP-2 pour la production de cytokines par les HGF. Ce résultat indique qu'une différence dans la séquence d'acides aminés de la partie peptidique affectait l'activité. La relation structure activité des lipoprotéines sera développée au paragraphe 3.4.3.1.

Enfin, He *et al.* (He *et al.*, 2009) ont montré que l'extrait TX-114 de *M. genitalium* activait le NF- κ B par le biais des récepteurs TLR 1, 2 et 6 par une voie dépendante du CD14 et de MyD88. Shimizu *et al.* (Shimizu *et al.*, 2008a) ont étudié l'implication des TLRs dans l'activation de la réponse immunitaire par une lipoprotéine MG149 de *M. genitalium* isolé d'une phase TX-114. L'induction du NF- κ B par MG149 était dépendante de TLR1 et TLR2.

3.4.3. Interaction des lipoprotéines mycoplasmiques avec les TLRs

3.4.3.1. Affinité des lipoprotéines pour les TLRs

La reconnaissance des mycoplasmes par les cellules dendritiques se déroule notamment par l'intermédiaire de leurs lipoprotéines qui sont détectées par les TLRs (Tableau 6). Plus précisément, TLR1, TLR2, TLR4 et TLR6 ou les dimères TLR2/1 et TLR2/6 sont impliqués dans la reconnaissance des lipoprotéines de plusieurs souches de mycoplasmes. La discrimination des TLRs pour ces agonistes est liée à la structure de la lipoprotéine (cf paragraphe 3.4.3.2.).

3.4.3.2. Relation structure/activité des lipoprotéines bactériennes

De nombreuses données sur les structures minimales des lipoprotéines nécessaires à leur activité biologique sont disponibles. Ces données ont été acquises par l'analyse de la lipoprotéine de Braun, de lipoprotéines synthétiques et de lipopeptides synthétiques dérivés des lipoprotéines. Ainsi, l'activité de la lipoprotéine de Braun réside dans son fragment N-terminal. Il faut noter que l'association de la fraction lipidique au fragment peptidique est nécessaire à l'activité immunomodulatrice des lipoprotéines (Bessler *et al.*, 1985, Erdile *et al.*, 1993, Muhlradt *et al.*, 1996). Ainsi Shibata *et al.* (Shibata *et al.*, 2000) ont montré que la structure de FSL-1 native est indispensable à l'activation *via* le complexe TLR2/6. En effet, les fractions de FSL-1, le diacylglycérol-cystéine (Pam2Cys) et le peptide (CGDPKHSPKSF) ne permettaient pas la production de TNF- α par les cellules THP-1.

Concernant la partie peptidique, les lipopeptides dérivés de la lipoprotéine de Braun, comportant une séquence peptidique de deux à cinq acides aminés seulement présentent une activité de stimulation plus forte que la lipoprotéine entière sur les cellules lymphocytaires B (Bessler *et al.*, 1985). Néanmoins, la présence d'une structure minimale dipeptidique serait nécessaire pour l'expression de cette stimulation (Bessler *et al.*, 1985).

La présence de deux acides gras reliés par un ester serait un pré-requis pour l'activité biologique, tandis que l'acide gras lié à l'extrémité N-terminale serait inutile. En effet, la délipidation du fragment N-terminal n'inhibe pas la capacité de stimulation de cellules lymphocytaires par la lipoprotéine de Braun (Bessler *et al.*, 1985). Une lipoprotéine présentant une extrémité amino-terminale libre exercerait même une activité plus forte (Metzger *et al.*, 1995) ; ceci a été notamment démontré chez *M. hyorhinis* où l'induction de la libération d'oxyde nitrique par les cellules macrophagiques péritonéales murines C3H/HeJ par le lipopeptide synthétique Pam₂CSK4 (MALP-A) était diminuée sous la forme triacylée (Muhlradt *et al.*, 1998). L'activité du lipopeptide N-palmitoylé était inférieure à celle du lipopeptide présentant une extrémité N-terminale libre. De plus, les lipopeptides bioactifs FSL-1, MPPL-1 et MALP-2 sont diacylés. Cependant, les lipoprotéines triacylées ont été signalées comme étant reconnues par le TLR2 et le TLR1, alors que les lipoprotéines diacylées, comme MALP-2 de *M. fermentans*, sont reconnues par le TLR2 et le TLR6. Il est intéressant de noter que le MALP-2 artificiellement triacylé n'est pas reconnu par le TLR6 (Shimizu *et al.*, 2004). Shimizu *et al.* (Shimizu *et al.*, 2008a) ont également signalé que les lipoprotéines isolées de *M. pneumoniae*, ainsi que des lipopeptides synthétiques contenant trois chaînes acyles, peuvent induire l'expression de NF- κ B par le biais de TLR1 et de TLR2 mais aussi indépendamment des TLRs. Un dérivé synthétique de MG149 contenant trois chaînes acyles induisait également le NF- κ B par le biais de TLR1 et de TLR2, apportant la preuve qu'une lipoprotéine triacylée avait une activité immunomodulatrice (Shimizu *et al.*, 2008a). Ces données soutiennent aussi l'idée que les lipoprotéines triacylées sont bien présentes chez les mycoplasmes et sont détectées par les TLRs.

La discrimination des TLRs par les lipoprotéines agonistes et les lipopeptides est peu étudiée. Omueti *et al.* (Omueti *et al.*, 2005) ont montré qu'un stéréoisomère R de MALP-2 stimulait les cellules épithéliales de rein 293T exclusivement par le dimère TLR2/6 et non par le TLR1/2. La chiralité du carbone du groupement diacylglycérol jouerait un rôle déterminant pour l'agoniste. Cette discrimination est en partie effectuée par les domaines LRR des TLR1 et 6. La constatation selon laquelle FLS-2, dérivé de FSL-1 présentant une arginine hydrophobe en C-terminal, était plus actif sur les cellules HEK293 transfectées avec les TLR2/6 que FSL-1 et MALP-2 confirmait que la taille, ainsi que l'hydrophobie de la partie peptidique du lipopeptide, affectait la reconnaissance de ce dernier par le complexe TLR2/6.

La connaissance de cette structure minimale bioactive des lipoprotéines a permis de développer de nombreux lipopeptides synthétiques agonistes des TLRs utilisés comme adjuvant dans la stimulation des cellules dendritiques (Prajeeth *et al.*, 2010).

3.4.3.3. Interaction des lipoprotéines de *M. hominis* avec les TLRs

Deux facteurs de stimulation des cellules monocytaires THP-1 ont été partiellement purifiés à partir de la fraction membranaire extraite au TX-114 de *M. hominis* PG21 ou à l'OG de *M. hominis* H29, respectivement le MSA (Peltier *et al.*, 2005) et P50t (Hasebe *et al.*, 2014). Il a été montré que la stimulation des cellules THP-1 (Peltier *et al.*, 2005) ou des hDCs (Truchetet *et al.*, 2011) par l'extrait TX-114 dépendait du TLR2 et que les cellules macrophagiques péritonéales murines déficientes en TLR2 stimulées par P50t ne produisaient pas de TNF- α (Hasebe *et al.*, 2014), démontrant le rôle de TLR2 dans la reconnaissance des lipoprotéines de *M. hominis*. La structure du MSA et de P50t n'a pas été déterminée avec précision.

L'hydrolyse alcaline de P50t, utilisée pour éliminer les lipides estérifiés de l'extrémité N-terminale (Hantke & Braun, 1973), était responsable d'une diminution temps-dépendante de la production de TNF- α par les cellules THP-1, suggérant que la présence des chaînes acylées intervient dans la stimulation des cellules. Le nombre et la nature de chaînes acylées n'ont pas été déterminés. Une digestion totale de P50t par la protéinase K n'avait pas d'effet sur l'induction de la production de TNF- α . Le génome de H29 n'ayant pas été séquencé, une analyse *in silico* des sites de coupure de P50t par la protéinase n'est pas possible et ne permet donc pas de savoir si la structure dipeptidique minimale est conservée.

Chez *M. hominis* PG21, Peltier *et al.* (Peltier *et al.*, 2005) avaient montré que l'activité de l'extrait TX-114 de *M. hominis* PG21 était significativement diminuée après hydrolyse alcaline et digestion à la protéinase K. La partie protéique de la lipoprotéine jouerait en partie un rôle dans la stimulation. L'action de l'hydrolyse alcaline suggère la présence de chaînes lipidiques participant à la bioactivité de l'extrait.

3.4.4. Interaction des lipoprotéines mycoplasmaïques avec les inflammasomes

Shimizu *et al.* (Shimizu *et al.*, 2011) ont publié la première étude suggérant que les mycoplasmes activent les voies de l'inflammasome. Ces auteurs ont décrit que *M. pneumoniae* M129 cyto-adhérent aux cellules THP-1 induisait une forte production de TNF- α et d'IL-1 β en comparaison à des mutants non-adhérents ou à des souches traitées par la chaleur. Chez *M. pneumoniae* M129, l'utilisation d'un anticorps anti-TLR2 a montré une inhibition partielle de la production de ces cytokines inflammatoires démontrant une induction TLR2 indépendante. Il est aujourd'hui reconnu que la voie médiée par les TLRs induit la transcription des pro-IL-1 β et pro-IL-18 via le NF- κ B. Certains NLRs tels que NOD1, NOD2, NLRX1 et NLRP12 activent le NF- κ B qui induit la production de TNF- α (Ting *et al.*, 2010). Dans cette étude, ces auteurs ont montré que la transfection du lipopeptide FMA20

dérivés de *M. pneumoniae* induit la production de TNF- α par l'activation d'un récepteur cytoplasmique. Le mécanisme physiologique par lequel *M. pneumoniae* activerait ce récepteur n'est pas totalement élucidé, l'induction de la production de TNF- α étant indépendante de l'endocytose après traitement des cellules à la cytochalasine D. L'adhésion de M129 aux cellules THP-1 pourrait être responsable d'un efflux d'ATP activant l'inflammasome. En 2014, Bose *et al.* (Bose *et al.*, 2014) ont montré que la toxine CARDS (Community-Acquired Respiratory Distress Syndrome) de *M. pneumoniae*, qui présente une activité d'ADP ribosylation et de vacuolisation, activait l'inflammasome NLRP3 chez des cellules macrophagiques murines. Des mutants n'exprimant pas le motif CARDS et incapables d'internalisation par les macrophages n'activeraient pas NLRP3. La capacité d'induction d'une réponse inflammatoire (IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-17, TNF- α et IFN γ) de la toxine CARDS avait été démontrée précédemment chez la souris (Hardy *et al.*, 2009).

Khare *et al.* (Khare *et al.*, 2012) ont décrit l'activation de l'inflammasome NLRP7 chez des macrophages humains (THP-1 et MF) par des lipopeptides acylés. NLRP7 recrutait l'adaptateur ASC pour promouvoir l'activation de la caspase 1 et la maturation d'IL-1 β et d'IL-18. Ainsi, l'infection des cellules par *A. laidlawii* induit une redistribution de l'ASC dans le cytoplasme et la libération d'IL-1 β dans le surnageant de culture. Le traitement des cellules THP-1 par le lipopeptide FSL-1 et les lipopeptides synthétiques Pam₂CSK4 diacylé et Pam₃CSK4 triacylé induisait la libération d'IL-1 β via l'ASC, en l'absence d'IL-1 β détecté dans les surnageants des cellules THP-1 déficientes en ASC (THP-1^{shASC}). Par l'utilisation d'ARN interférents pour les NLRs, Kahre *et al.* ont identifié NLRP7 comme étant indispensable à la production d'IL-1 β par FSL-1, MALP-2, Pam₂CSK4 et Pam₃CSK4 et *A. laidlawii* entier. Par la même technique, ces auteurs ont montré que NLRP7 et NLRP3 détectaient les bactéries entières mais que seul NLRP7 pouvait détecter les lipopeptides acylés tel que FSL-1. Cependant, une liaison au TLR2 était indispensable pour induire la transcription de la pro-IL-1 β et de la pro-IL-18 via le NF- κ B.

Xu *et al.* (Xu *et al.*, 2013) ont montré que *M. hyorhinis* vivant, traité à la chaleur ou aux UV induisait la production d'IL-1 β et d'IL-18 chez des cellules THP-1 par l'activation de l'inflammasome NLRP3. Une induction dose-dépendante d'IL-1 β a également été observée par addition d'un extrait membranaire TX-114 sur les cellules THP-1 via l'activation du NLRP3. La voie de signalisation médiée par le TLR2 était impliquée dans cette induction, car l'utilisation d'un anticorps anti-TLR2 était associée à une diminution de la production d'IL-1 β . Ces auteurs ont également montré que l'ADN du mycoplasme pouvait activer AIM2 mais cette activation n'était que partiellement responsable de la production d'IL-1 β . L'activation du NLRP7 n'a pas été analysée dans cette étude.

Enfin, Sugiyama *et al.* (Sugiyama *et al.*, 2015) ont montré que *M. salivarium* ATCC 23064, vivant ou inactivé par la chaleur, pouvait induire la production d'IL-1 β et la pyroptose chez des cellules dendritiques XS106 murines par l'activation de NLRP3 et de la caspase 1. La capacité d'induction d'IL-1 β par *M. salivarium* chez des cellules humaines THP-1 a été aussi rapportée dans cette étude mais les voies de l'inflammasome n'ont pas été explorées.

CHAPITRE 1

CHAPITRE 1. LIPOPROTEOME DE SURFACE DE *MYCOPLASMA HOMINIS* PG21 ET EXPRESSION DIFFERENTIELLE APRES CONTACT AVEC LES CELLULES DENDRITIQUES HUMAINES

Surface lipoproteome of *Mycoplasma hominis* PG21 and differential expression after contact with human dendritic cells

Julien Goret, Chloé Le Roy, Arabella Touati, Jennifer Mesureur, Hélène Renaudin, Stéphane Claverol, Cécile Bébéar, Laure Béven[#] et Sabine Pereyre[#].

Ces auteurs ont participé à ce travail à part égale.

Article accepté le 19 octobre 2015 dans *Future Microbiology* (Impact factor 2014 : 4.275).

Ces travaux ont fait l'objet d'une communication orale au 20^{ème} congrès de l'International Organization for Mycoplasmology (IOM, Blumenau, Brazil, 1-6 June 2014).

CONTEXTE

Les lipoprotéines des mycoplasmes sont impliquées dans l'interaction avec les cellules de l'hôte. Des travaux effectués dans notre laboratoire ont montré que la fraction bioactive de *M. hominis* PG21 correspond à la fraction membranaire extraite au triton X114 (TX-114). Cette fraction entraîne la maturation des cellules dendritiques humaines (hDCs) et la sécrétion d'IL-23. Nous avons d'abord cherché à déterminer quelles sont les lipoprotéines contenues dans l'extrait TX-114. Ainsi nous avons caractérisé le lipoprotéome de surface de *M. hominis* PG21 par la réalisation d'une extraction des vésicules de membrane par le TX-114, suivie d'une séparation par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium (SDS-PAGE) et d'une identification par chromatographie liquide couplée à une spectrométrie de masse en tandem. Trente-six lipoprotéines ont été détectées sur les 48 annotées *in silico*, incluant trois nouvelles lipoprotéines putatives appartenant à la famille des Lmp-related proteins, soit 75% des protéines annotées *in silico*. Douze lipoprotéines n'ont pas été détectées par cette méthode mais celles-ci étaient toutes transcrites *in vitro* comme indiqué par transcription inverse et PCR quantitative (qRT-PCR).

Quelques études chez les mycoplasmes ont rapporté une régulation de l'expression des gènes codant pour les lipoprotéines après contact avec les cellules de l'hôte. Pour déterminer quelles lipoprotéines peuvent intervenir dans l'interaction avec l'hôte, les variations transcriptionnelles des gènes codant pour les 48 lipoprotéines de *M. hominis* PG21 ont été analysées par qRT-PCR après contact du mycoplasme avec les hDCs. Un panel de gènes de référence adaptés à la normalisation de l'expression des gènes a préalablement été déterminé. Une surexpression a été observée pour 21 gènes de lipoprotéines après 4 h ou 24 h de co-incubation. Parmi eux, sept gènes codant pour des lipoprotéines de fonction inconnue étaient spécifiques de *M. hominis* et six gènes étaient potentiellement associés à des fonctions d'adhésion et de capture de nutriments issus de l'hôte. *M. hominis* PG21 régule ainsi l'expression des gènes codant pour ses lipoprotéines lors du processus de colonisation de l'hôte et utiliserait des mécanismes spécifiques d'espèce.

Surface lipoproteome of *Mycoplasma hominis* PG21 and differential expression after contact with human dendritic cells

J. Goret^{1,2,3}, C. Le Roy^{1,2}, A. Touati^{1,2}, J. Mesureur⁴, H. Renaudin^{1,3}, S. Claverol⁵, C. Bébéar^{1,2,3}, L. Béven^{6,7*} #, S. Pereyre^{1,2,3*} #

* These authors contributed equally to this work.

¹ Université de Bordeaux, USC EA 3671 Mycoplasmal and chlamydial infections in humans, Bordeaux, France.

² INRA, USC EA 3671 Mycoplasmal and chlamydial infections in humans, Bordeaux, France.

³ Laboratoire de Bactériologie, Centre Hospitalier Universitaire de Bordeaux, Bordeaux, France.

⁴ INSERM, U1047, Nîmes, France.

⁵ Pôle Protéomique, Plateforme génomique fonctionnelle de Bordeaux, Université de Bordeaux, Bordeaux, France.

⁶ INRA, UMR 1332, Biologie du Fruit et Pathologie, Villenave d'Ornon, France.

⁷ Université de Bordeaux, UMR 1332, Biologie du Fruit et Pathologie, Bordeaux, France.

Corresponding authors:

Sabine Pereyre: USC EA3671 Infections Humaines à Mycoplasmes et Chlamydiae, Université de Bordeaux, 146 rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux, France. E-mail: sabine.pereyre@u-bordeaux.fr. Phone number: + 33 5 57 57 16 25. Fax number: +33 56 93 29 40.

Laure Béven, UMR 1332, Biologie du Fruit et Pathologie, INRA, 71 avenue Edouard Bourlaux, 33140 Villenave d'Ornon, France. E-mail: laure.beven@bordeaux.inra.fr. Phone number: + 33 5 57 12 23 62.

Running title: *Mycoplasma hominis* PG21 lipoprotein expression

Keywords: *Mycoplasma hominis*, lipoprotein, proteome, expression, qRT-PCR, normalization, reference genes, dendritic cells

ABSTRACT

Aim: To assess the lipoproteins that are involved in the interaction between *Mycoplasma hominis* and human dendritic cells (hDCs).

Material and methods: The surface lipoproteome of *M. hominis* PG21 was characterized using Triton X-114 extraction and liquid chromatography tandem mass spectrometry identification. The transcriptional changes in lipoprotein genes upon contact with hDCs were determined using reverse transcription quantitative PCR after identification of reference genes suitable for normalization.

Results: A large-scale overexpression of lipoprotein genes was observed with 21 upregulated transcripts. Seven genes of unknown function were *M. hominis* species-specific and six genes were putatively associated with increased nutrient capture from the host cell and adhesion.

Conclusion: *M. hominis* regulates lipoprotein gene expression and may use species-specific mechanisms during host colonization process.

INTRODUCTION

Bacterial lipoproteins play important roles in a wide variety of physiological processes. These proteins are characterized by the presence of a lipid moiety at their *N*-terminal end, allowing the hydrophilic polypeptidic part to anchor to bacterial cell membranes. They are involved in nutrient uptake, cell wall metabolism, cell division, transmembrane signal transduction, transport, extracytoplasmic folding of proteins and antibiotic resistance [1, 2]. Some lipoproteins are also known to play a direct role in virulence-associated functions in pathogenic bacteria. In addition, bacterial lipoproteins can participate in immune evasion or induce innate immune reactions by acting as ligands of Toll-like receptor 2 (TLR2) and initiate the inflammatory processes [2]. The distribution of lipoproteins varies among bacteria and they may have different subcellular localization. Lipoproteins are targeted to the outer lipid leaflet of the cytoplasmic membrane or to the outer membrane in Gram-negative bacteria, and to the extracellular side of the cytoplasmic membrane in Gram-positive bacteria, with the exception of *Mycobacteria*, in which lipoproteins are cell-surface-exposed and attached to the outer mycolic acid bilayer [2]. Mycoplasmas have no cell wall and are the smallest prokaryotes capable of self-replication *in vitro*. They have an obligate parasitic mode of life in nature. In mycoplasmas, lipoproteins are anchored to the extracellular side of the plasma membrane, thus, all lipoproteins are part of the frontline layer in direct contact with the host components. Several of these proteins are high-affinity substrate-binding units of ABC transporters and therefore have an essential role in uptake of nutrients provided by the host. Diverse mycoplasmal lipoproteins exert a lyolytic or nucleolytic function, allowing the degradation of host components. In addition, many mycoplasmal lipoproteins have been reported to be involved in adhesion to host cells and/or recognition by the host immune system [1]. The immunomodulatory potential of detergent extracts enriched in lipoproteins from *Mycoplasma hominis* [3], *M. arthritidis* [4], *M. fermentans* [5], *Ureaplasma parvum* [6] and *M. genitalium* [7, 8] was previously shown. In addition, upon contact with the host cells, increased and decreased expressions of mycoplasmal lipoprotein genes were reported, e.g., for *M. hyopneumoniae* after respiratory infection in pigs [9], for *M. gallisepticum* upon exposure to human lung fibroblasts [10] and for *M. pneumoniae* after contact with human lung cells [11]. Thus, mycoplasmas can regulate gene expression upon exposure to eukaryotic cells, revealing genes and pathways likely to be important for the host-bacterium interaction.

M. hominis PG21, which is a human urogenital pathogen involved in opportunistic infections [12], possesses a large number of genes predicted to encode lipoproteins (45) [13]. In this mycoplasma species, the ABC transporter OppA and the lipoprotein Variable

adherence-associated (Vaa) have been previously reported to promote cytoadherence [14, 15]. Surface proteins Vaa, P120 and Lmp-related proteins are recognized by the host humoral immunity [16-18]. Nevertheless, in *M. hominis* PG21, lipoproteins form a largely uncharacterized class of proteins.

It has been recently shown that *M. hominis* membrane proteins extracted by Triton X-114 (TX-114) could induce the maturation of human dendritic cells (hDCs), stimulate the pro-inflammatory cytokine production by hDCs and polarize the adaptive immune system by the IL-23/Th17 axis activation [3]. During co-incubation of *M. hominis* PG21 with hDCs, changes may also arise in the mycoplasma lipoprotein expression, and their study could be an important initial step to assess their role in the interaction with host cells. Indeed, as for other bacteria, genes having a variation of their expression level after contact with human cells may play a role in adhesion and/or invasion [2].

In this study, we assessed the set of *M. hominis* PG21 lipoproteins that are potentially involved in the interaction process between *M. hominis* and hDCs. We first characterized the *in vitro* surface lipoproteome of *M. hominis* PG21 using TX-114 extraction and liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) identification. We then determined whether lipoprotein genes were differentially expressed upon contact with hDCs using reverse transcription followed by real-time PCR (qRT-PCR).

MATERIALS AND METHODS

TX-114 extraction of *M. hominis* and LC-MS/MS

As previously described [3], *M. hominis* PG21 (ATCC 23114) membranes were separated into amphiphilic and hydrophilic fractions using the Triton X-114 partitioning method of Bordier [19] with slight modifications. Proteins from the detergent phase were concentrated by precipitation using iced acetone and then washed twice using iced acetone. A quantity of 200 µg detergent extract was heated for 3 min at 100°C and then separated on a 10% acrylamide SDS-PAGE. Two independent experiments were performed. Lanes were cut in 14 equal bands, and each band was digested with trypsin. Peptides were extracted from the gel, and peptide mixture was analyzed on an Ultimate 3000 nanoLC system (Dionex, Amsterdam, The Netherlands) coupled to an Electrospray LTQ-Orbitrap XL mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA).

Data were searched by SEQUEST through Proteome Discoverer 1.4 (Thermo Fisher Scientific Inc.) against an in-house *M. hominis* database consisting of 11 322 entries. Spectra from peptides higher than 5000 Dalton (Da) or lower than 350 Da were rejected. The search parameters were as follows: mass accuracy of the monoisotopic peptide precursor set to 10 parts-per million and peptide fragments tolerance set at 0.6 Da. Only b- and y-ions were considered for mass calculation. Oxidation of methionines (+16 Da) was considered as variable modification. Two missed trypsin cleavages were allowed. Only “high-confidence” peptides were retained corresponding to a 1% False Positive Rate at peptide level.

***In silico* analysis of *M. hominis* lipoproteins**

The PSORTdb 2.0 software (<http://db.psорт.org>) was used to determine the subcellular localization of the proteins identified in the TX-114 extract. The TMHMM Server v. 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) was used to predict the transmembrane helices.

Orthologs to all the identified *M. hominis* PG21 proteins were investigated using Molligen 3.0 (<http://www.cbib.u-bordeaux2.fr/outils/molligen/>) [20]. An e-value lower or equal to e^{-15} and a minimum of 30% sequence similarity were required for a protein to be considered as a homolog. Pairwise alignments were performed using EMBOSS Needle (www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle).

The determination of the presence of a signal peptide was performed using the ProSite software (<http://prosite.expasy.org>) describing protein domains, SignalP 4.1 server using the gram-positive option (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) detecting the

presence and the location of signal peptide cleavage sites, and the LipoP 1.0 Server predicting the presence of a signal peptidase I and II cleavage sites (<http://www.cbs.dtu.dk/services/LipoP/>).

Nucleic acid extraction and reverse transcription of *M. hominis* after co-incubation with hDCs

Human monocyte-derived DC generation was performed as described elsewhere, using magnetic CD14 microbeads (MiltenyiBiotec) [3]. After 5 days of culture, cells were checked for any mycoplasma contamination using an in-house PCR targeting the *Mycoplasma* genus [21]. Monocyte-derived DCs were transferred into 6-well plates at 5×10^5 cells per well along with *M. hominis* suspension at 10^8 CCU/ml with a multiplicity of infection of 50. The mixtures were incubated at 37°C for 4 and 24 hours. Three independent experiments were carried out. After exposition of hDCs to *M. hominis*, cells were pelleted by centrifugation for 15 min at 1300 g at room temperature and washed once in 1 ml of cRPMI. For the control time (t=0h), the hDCs and the mycoplasma culture were mixed extemporaneously and immediately harvested by centrifugation in the same conditions.

The pellet was then suspended in 600 µl of RLT buffer (Qiagen) with β-mercaptoethanol and homogenized by passing through a 20-gauge needle at least 5 times. Total RNA from *M. hominis* and hDCs was isolated using the RNeasy Plus Mini (Qiagen) following the manufacturer's instructions. DNase treatment was performed at 37°C for 30 min using the RNase-free DNase (Qiagen) and the RNeasy columns. RNA concentrations were determined using the NanoDrop 800 Spectrophotometer (Thermo Scientific). A quantity of 1 µg of total RNA was immediately submitted to reverse transcription (RT) using the RT² First Strand Kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. The absence of genomic DNA contamination, of inhibitors of reverse transcription and of PCR amplification were checked using the Human RT² RNA QC PCR array (Qiagen).

To ensure that *M. hominis* replication did not affect the interpretation of the assay, the number of bacteria measured as color-changing units (CCU)/ml in Hayflick broth medium was determined during co-incubation of *M. hominis* with hDCs at t=0h, t=4h and t=24h. In addition, to verify that the change of medium from Hayflick (initial culture medium of *M. hominis*) to cRPMI (coincubation medium) has no impact on *M. hominis* lipoprotein expression, the regulation of the lipoprotein genes was evaluated in *M. hominis* cultured alone in cRPMI between t=0h and t=4h and between t=0h and t=24h under the same technical conditions.

Primer design and real-time PCR

For the 12 candidate reference and the 48 lipoprotein genes, primers were designed from the *M. hominis* PG21 genome (GenBank NC_013511.1) [13] using the Primer 3 v.0.4.0 software (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) (Table S1). Primer-dimers and target specificity were checked with OligoCalc: Oligonucleotide Properties Calculator 2007 (<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/OligoCalc.html>) and confirmed using BLAST searches against the genomic sequence of *M. hominis* PG21 and the human genome. PCR efficiency of the reference candidate genes was determined using a ten-fold dilution series (from 10^{-1} to 10^{-7}) of *M. hominis* PG21 genomic DNA, and the resulting standard curves were obtained using the formula $E=10^{(-1/\text{slope})}$. All dilutions were tested in triplicate. The amplifications were performed on a LightCycler 480 real-time PCR System (Roche) in a final volume of 25 μ l using 1 μ l of DNA, 0.5 μ M of each primer and 12.5 μ l of RT² SybrGreen qPCR Mastermix (Qiagen). Amplification conditions were 10 min at 95°C followed by 45 cycles of 15 s at 95°C, 1 min at 60°C. The limit of detection and the cycle threshold (Ct) cut-off was determined for each gene. Candidate reference genes and lipoprotein genes were amplified in triplicates as described above using 4 μ l of cDNA. Expression levels were presented as individual Ct values determined from the second derivate of the amplification curve.

Analysis of gene expression data

Gene stabilities of the candidate reference genes were evaluated using the geNorm v3.4 software [22] according to the developer's instructions. Raw Ct values were transformed into linear scale expression quantities using standard curves. The geNorm program calculates the average pairwise variation for a candidate reference gene with all other tested genes and reports it as the gene expression stability measure M. High variability of a gene results in high M values and indicates low expression stability. The geNorm software also suggests the optimal number of required reference genes based on the pairwise variation of normalization factors with an increasing number of reference genes included for normalization factor calculation ($V_n/n+1$). The optimal number of reference genes is finally given when the addition of the next gene has no significant contribution to the newly calculated normalization factor. According to the geNorm developers, below the 0.15 cut-off, the addition of supplementary genes has no significant contribution.

The Normfinder v0.953 software [23] was used to confirm geNorm data. In addition to the overall expression level variation, Normfinder takes intra- and intergroup variation of the candidate normalization genes into account in order to assess the expression stability.

Expression ratios of *M. hominis* PG21 lipoprotein genes were calculated using the Profiler™ PCR Array RT² Data Analysis v3.5 software (Qiagen) (<http://pcrdataanalysis.sabiosciences.com/pcr/arrayanalysis.php>), which considers the expression level of the set of chosen reference genes. The analysis of the expression of the lipoprotein coding genes was performed according to the relative quantification method ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) [24]. Briefly, the quantities of cDNA of lipoprotein genes after interaction with hDC at t=4h and t=24h were normalized to the amount of cDNA obtained for the set of reference genes at the same time and then compared with the ratios obtained for the same genes at the control time (t=0h). The p values were calculated based on a Student t test of the ΔC_t values independently for each gene between t=4h and control time and between t=24h and control time. A p value lower than 0.05 was considered significant [25].

RESULTS

***In vitro* surface lipoproteome of *M. hominis* PG21**

M. hominis membranes were subjected to extraction using TX-114. Polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and LC-MS/MS were then used to separate and identify proteins and lipoproteins of the TX-114 extract. A total of 148 proteins with molecular weights ranging from 14 to 319 kDa were detected in the TX-114-enriched fraction (Table S2). Thirty-three lipoproteins were detected among the 45 lipoproteins (73.3%) predicted *in silico* during the genome annotation [13] and using the MicroScope website (<https://www.genoscope.cns.fr/agc/microscope/home/index.php>) (Table 1). Only a few lipoproteins such as OppA, Vaa, P120 or MHO_3610 and MHO_3620 had reported functions [14-18]. A total of nine lipoproteins were *M. hominis*-specific hypothetical proteins and fifteen lipoproteins were hypothetical proteins conserved among different *Mycoplasma* species. Among them, MHO_0730 was a putative nuclease, MHO_3200 and MHO_4970 were putative peptidases and MHO_2340 was a putative adhesin. Except for MHO_4970 and MHO_4990, all the conserved lipoproteins had orthologs in *M. arthritidis*, the phylogenetically closest species to *M. hominis*. MHO_4990 had orthologs in *M. synoviae* (MS53_0133), *M. agalactiae* (MAG4640), *M. bovis*, (MBOVPG45_0351), *M. anatis* (GIG_03188), *M. pulmonis* (MYPU_1930), *M. galisepticum* (MGA_0810) and *U. parvum* (UU260). These species all belong to the Hominis phylogenetic group. MHO_4970 had orthologs in *M. mycoides* (MSC_0322, MSC_0922 and MLC_8730).

Overall, twelve predicted lipoproteins out of 45, *i.e.*, 26.7% (MHO_0660, MHO_1590, MHO_2090, MHO_2260, MHO_2430, MHO_2450, MHO_2480, MHO_2500, MHO_3270, MHO_3280, MHO_4980 and MHO_5110), were not detected after TX-114 extraction and identification by LC-MS/MS. Their molecular weight ranged from 13 to 186 kDa. Due to potential technical drawbacks related to our strategy, we assessed whether these lipoprotein genes were transcribed in *in vitro* culture conditions or not. By qRT-PCR on a fresh culture of *M. hominis* PG21, we showed that all of these 12 lipoproteins genes and thus 100% of the *M. hominis*-predicted lipoprotein genes were transcribed *in vitro*. Nevertheless, lipoproteins MHO_0660, MHO_1590, MHO_3270 and MHO_4980 were weakly transcribed. Their Ct ranged from 31 to 35 while the other lipoprotein genes Ct values were under 30.

Three Lmp-related proteins are newly predicted lipoproteins

Among the 149 proteins detected in the TX-114-enriched fraction, seven were Lmp-related proteins, namely MHO_0530, MHO_0540, MHO_1640, MHO_3070, MHO_3110,

MHO_3730 and MHO_4280. Eight Lmp-related proteins were previously reported in the *M. hominis* PG21 genome and only the MHO_3070 protein had been annotated as lipoprotein. To assess whether the annotated Lmp-related proteins were lipoproteins which could have been missed during the initial annotation process, we analyzed their 35 N-terminal amino acid sequences (Table 2) to search for the characteristic patterns of prolipoproteins: (i) presence of a lipobox determining signal peptide processing and lipidation of an invariant cysteinyl residue, (ii) presence of a sequence that conforms to the Prosite position-specific pattern PS51257 (PROKAR_LIPOPROTEIN) (<http://prosite.expasy.org>), (iii) presence of an hydrophilic positively charged amino acid sequence within the 3 initial residues (MKK, MKR or MKN) and (iv) presence of at least 20 to 35 residues between the cysteine and the charged residues. Similarly to MHO_3070, the three Lmp-related coding sequence, *mho_1640*, *mho_3730* and *mho_4280*, could be considered as encoding for the lipoprotein patterns and could be considered as putative lipoproteins. All three were detected in the TX-114 extract.

Overall, after addition of the three newly predicted lipoproteins, 36 lipoproteins were detected in the *in vitro* lipoproteome of *M. hominis* PG21, *i.e.*, a percentage of 75% (36/48) of the predicted lipoproteins and 6.7% (36/537) of the predicted CDS. All 48 genes encoding putative lipoproteins were transcribed.

Determination of a set of reference genes for gene expression normalization in *M. hominis*

Due to the adhesion of *M. hominis* to its host cells [26] and its capacity to invade eukaryotic cells [27], TX-114 extraction and LC-MS/MS identification could not be considered to analyze *M. hominis* lipoproteome when in contact with hDCs. Indeed, it would not have been possible to retrieve *M. hominis* cells for protein extraction before LC-MS/MS. The extract would have been saturated by human proteins, which would have masked the mycoplasmal proteins. Consequently, the variation in expression of the 48 lipoprotein genes identified above was studied at the transcriptional level using qRT-PCR in *M. hominis* PG21 co-incubated with hDCs. First, a set of reference genes stably transcribed had to be defined for normalizing the transcription data. Candidate reference genes were selected from the literature, from articles related to gene expression in mycoplasmas [11], in *Clostridium* spp. [28, 29] and in *Bacillus cereus* [30], the two latter being Gram-positive species phylogenetically close to mycoplasmas. Twelve candidate reference genes were chosen (Table 3). For all candidate reference genes, primers were designed from the *M. hominis* PG21 genome (Table S1). RNA expression levels of the twelve candidate reference genes were resolved at three time points of incubation of *M. hominis* PG21 with hDCs (0 h, 4 h and

24 h). A low expression was observed for the candidate reference gene *rplL* with a Ct average below the limit of detection, *i.e.*, a Ct superior to 35. Thus, this gene was removed for further analyses. Ct values for the other eleven candidate reference genes ranged from 22 to 32.

Calculated stability values ranged from 0.275 to 0.775 according to the geNorm software (Figure 1A). The most stable genes were *tuf* and *gatB*, with the lowest stability values of 0.275 for both genes. These two genes were confirmed to be among the six most stable genes using the Normfinder software (Figure 1C). Using both software programs, the two less stable genes were *rpoB* and *gmk*.

The geNorm software determines the optimal number of required reference genes based on the calculation of the normalization factor ($V_n/n+1$). According to our data, the use of the two candidate reference genes *tuf* and *gatB* was required and was sufficient for a reliable normalization of the lipoprotein genes' expression upon contact with hDCs under our experimental conditions (Figure 1B). Indeed, $V_{2/3}$ (0.122) was below the 0.15 cut-off, and the addition of a supplementary reference gene had no significant contribution.

Differential expression of *M. hominis* PG21 lipoprotein genes upon contact with hDCs

The expression level of the lipoprotein coding genes was determined using qRT-PCR in *M. hominis* PG21 co-incubated with hDCs for 4h and 24h. Among the 48 lipoprotein genes, 10 had a Ct value over the limit of detection of 35—namely, *mho_0280*, *mho_0660*, *mho_2090*, *mho_2100*, *mho_2260*, *mho_2500*, *mho_2620*, *mho_3100*, *mho_3490* and *mho_4910* genes. Thus, the differential expression of these genes could not be determined accurately. Using the two reference genes selected for normalization, 21 genes were found to be significantly upregulated, representing 43.8% (21/48) of the predicted *M. hominis* PG21 lipoproteome (Table 4). To ensure that replication did not affect the interpretation of the assay, we verified that there was no difference in the number of bacteria before and after co-incubation of *M. hominis* with hDCs. In addition, there was no upregulation of *M. hominis* gene expression when *M. hominis* was cultured alone in cRPMI between t=0h and t=4h and between t=0h and t=24h. A total of 20 genes were overexpressed at 4h and only 4 genes (*mho_1440*, *mho_4980*, *mho_4990* and *mho_5110*) were overexpressed at 24h. The rate of overexpression was stable between 4h and 24h for the three-lipoprotein genes overexpressed at both time points. No lipoprotein-encoding gene was underexpressed, neither at 4h nor at 24h. Genes encoding OppA (*mho_1510*) and Vaa (*mho_3470*), known to be involved in adhesion, presented no variation in their expression. Similarly, the expression level of genes encoding P120 (*mho_3660*) and Lmp-related proteins showed no variation.

The highest overexpression was observed for the gene encoding the conserved hypothetical protein MHO_0790 with an 8.9-fold change at t=4h. A more than 8-fold and 6-fold overexpression were also found for the lipoprotein genes *mho_2340* and *mho_2450* at this time point, respectively. Overall, among the 21 overexpressed genes, eight were encoding conserved hypothetical proteins of unknown functions, seven were encoding *M. hominis*-specific hypothetical proteins with no identified functional domains and six were encoding proteins with putative functions all associated with increased nutrient capture from host cells (*mho_3200*, *mho_3610*, *mho_3620*, *mho_4970* and *mho_5110*) and adhesion (*mho_2340*).

DISCUSSION

M. hominis belongs to the mollicutes class, which is a group of bacteria with no cell wall. The membrane is the main interface mediating interaction between the mycoplasma and its environment. Moreover, the mollicutes class is considered as a group of minimal bacteria due to the massive losses of genetic material that occurred during evolution. Nevertheless, while genes encoding putative lipoproteins represent 1-3% in most bacteria [31], the membrane of mollicutes is highly enriched in lipoproteins, suggesting important roles for physiological processes. In agreement with this assumption, mycoplasmal lipoproteins have been shown to endorse a wide variety of functions ranging from nutrient uptake or hydrolysis of substrates to adhesion, virulence or immunomodulatory activity [1]. *M. hominis* PG21 has one of the smallest genome sizes (665 Kbp) among mollicutes. In this mycoplasma, predicted lipoproteins from the genome sequence, including the 45 putative lipoproteins previously annotated [13] and the three Lmp-related proteins reported in the present study, represent 8.9% (48/537) of the predicted total proteome.

In order to identify the lipoproteome in *M. hominis*, we chose to use the strategy that consists in extracting lipoproteins from the plasma membrane environment, separating the extracted components by SDS-PAGE and performing an LC-MS/MS analysis to identify the expressed proteins. The non-denaturing TX-114 has been shown to efficiently extract lipoproteins from biological membranes [19], and the successful implementation of this strategy demonstrated the immunomodulatory effect of mycoplasmal lipoproteins in previous studies [4, 6-8]. As expected, besides lipoproteins, several amphiphilic transmembrane proteins and polypeptides bound to transmembrane proteins, as well as highly abundant cytoplasmic proteins, were recovered in the TX-114 fraction from *M. hominis* membranes. Nevertheless, the detergent extract was highly enriched in predicted lipoproteins. The presence of 36 lipoproteins in the TX-114 fraction indicates that most lipoproteins encoded in *M. hominis* are expressed *in vitro*. Although it is difficult to compare results from analyses performed in different laboratories for different mycoplasma species, it is noticeable that the presently reported percentage of 75% of expressed proteins among the total predicted lipoproteins is much higher than those reported for other mycoplasmas, such as *M. fermentans* M64 (44%, 21/48) [5], *M. mycoides* PG1 (41%, 16/39) [32] and *M. agalactiae* PG2 (64%, 43/67) [33]. This may reflect the diversity of *M. hominis* lipoproteins involved in basal metabolism for growth *in vitro*.

Twelve predicted lipoproteins were not detected by mass spectrometry. A protein level under the detection limit for identification by mass spectrometry could explain this result. Moreover, the SDS-PAGE and LC-MS/MS strategy presents some limits in the

separation of high molecular weight proteins and in the detection of small proteins with a molecular weight below 20 kDa. These limits could explain the lack of detection of MHO_2430 (12.8 kDa), MHO_2450 (18.5 kDa), MHO_2260 (185.9 kDa) and of MHO_2090 (178.6 kDa). In addition, LC-MS/MS was performed on a TX-114 extract, which is a complex mixture of proteins. Thus, the signal of underrepresented lipoproteins may be masked by those of major proteins. This may be the case for MHO_0660, MHO_1590, MHO_3270 and MHO_4980, for which a low mRNA level was detected. For the four remaining proteins with a predicted molecular weight compatible with LC-MS/MS detection and a Ct lower than 30 in qRT-PCR analyses, one possible explanation for the absence of detection by mass spectrometry could be a low stability of the mRNA or of the protein. The 12 genes encoding the putative lipoproteins were all transcribed *in vitro*, as shown by qRT-PCR analyses. However, at present we cannot be sure that these genes are ultimately translated into lipoproteins in *M. hominis* cultivated in a rich medium.

The present study provided evidence of transcriptional regulation of *M. hominis* lipoprotein genes in response to contact with hDCs. We chose an early time point and a late time point to assess major differences in the transcriptional levels of the individual genes. No lipoprotein gene was down-regulated, which is consistent with results reported in the literature since no underexpression of lipoprotein genes was reported for *M. gallisepticum* [10] and *M. pneumoniae* [11] upon contact with host cells. Underexpression of a single lipoprotein gene (*mhp170*) was reported for *M. hyopneumoniae* [34]. This lipoprotein was of unknown function and had no ortholog in *M. hominis* PG21. Expression levels of several genes encoding proteins involved in host colonization processes (*vaa*, *oppA*, *Imp* genes) did not change upon contact with hDCs. On the contrary, twenty lipoprotein genes were upregulated after 4h contact with hDCs and 3 genes remained overexpressed at 24h. This overexpression at 4h suggests a prompt and acute response upon contact with hDCs and a rapid involvement of many lipoproteins in the initial step of adaptation to the hDCs' environment. In *M. hyopneumoniae* [9, 34] and *M. gallisepticum* [10], only three and one lipoprotein genes were regulated upon contact with their host cells, respectively. Although large differences in transcriptional regulation capacity in different mycoplasma species cannot be ruled out, the differences observed between previous reported studies and the present one are more likely due to the use of different technologies to assess changes in mRNA levels. Indeed, the microarray technology used in the studies cited above often underestimates changes in mRNA levels [35], and qRT-PCR is more sensitive in detecting small changes in gene expression [36]. In addition, the use of non-validated reference genes may lead to biased results. To date, reports of gene expression regulation in mycoplasmas had poor reference gene validation methods. In a *M. pneumoniae* gene expression study, three candidate reference genes, *tuf*, *gyrB* and *gap*, were evaluated [11]. The expression of

the *gyrB* gene was shown to be non-stable in one experimental condition, suggesting that the choice of reference genes for gene expression studies depends on the experiment conditions and has to be determined prior to each new experiment.

Among the upregulated lipoprotein genes in *M. hominis*, three encode putative enzymes—namely MHO_5110, a putative ribonuclease, and MHO_3200 and MHO_04970, two putative peptidases. Their overexpression may indicate a requirement for nucleotidic and amino-acid-based substrates in *M. hominis* in contact with hDCs. Indeed, mycoplasmas do not synthesize *de novo* the nucleic acid precursors and amino acids that are essential for their growth. Upon contact and colonization of hDCs, mycoplasmas could take advantage of substrates from the human cells compared to the noncompetitive environment of the growth medium. Many orthologs of MHO_5110 were found in other *Mycoplasma* species, but none of these orthologs has been characterized. MHO_5110 possesses a truncated domain found in extracellular Mg²⁺-activated ribonucleases, which hydrolyzes RNA into oligonucleotides with 5'-terminal phosphate encoded by the *bsn* gene in *Bacillus subtilis* [37]. In *M. hominis* a strong extracellular Bsn RNase activity could be measured [38]. The role of MHO_5110 in *M. hominis* cytopathic effects by scavenging nucleotides from RNAs found in the environment will have to be assessed in future studies. Alternatively, other roles for MHO_5110, notably in binding to and internalization into human cells, could be considered as such roles were shown for *M. pneumoniae* nuclease Mpn133 [39]. Interestingly, the gene *mho_5110* and two genes contiguous to *mho_5110* (*mho_4980* and *mho_4990*) all remained upregulated at t=24h. Using the Prokaryotic Operon Database (proOpDB, <http://operons.ibt.unam.mx/OperonPredictor/>) that predicts operons in prokaryotic genomes, the genes *mho_4980*, *mho_4990* and *mho_5110* were not predicted to be part of an operon. However, even if they are not in an operon, these genes may be co-expressed as indicated by the high number of co-expressed genes observed in *M. pneumoniae* under distinct environmental conditions [40].

The overexpressed MHO_4970 was a putative peptidase conserved among different *Mycoplasma* species. The upregulated MHO_3200 has a DUF31 peptidasic domain. This domain is related to the superfamily of trypsin endopeptidases found in various hypothetical proteins and putative lipoproteins from mycoplasmas. MHO_3200 and MHO_4970 may act as virulence factors or as factors facilitating innate immunity escape. Degradation of molecules of the innate immune cells (complement, cytokines and bactericidal peptides), manipulation of intracellular inflammatory signaling pathway and evasion have been described for many proteases of pathogenic bacteria [41]. Interestingly, Hallamaa *et al.* (2008) reported that *M. pneumoniae* lipoprotein MPN588, which also has a DUF31 peptidasic domain, was overexpressed upon contact with human cells, emphasizing the

potential role of DUF31 domain-carrying proteins in adaptation of different mycoplasmas to the presence of host cells.

Among the strongly overexpressed lipoproteins upon contact with hDCs, MHO_2340 is also of particular interest. The sequence of this lipoprotein was found to share similarities with that of MAA1 putative adhesin of *M. arthritidis* (30.6% identity; 49.8% similarity) using the (EMBOSS) software. MAA1 adhesin, a phase-variable lipoprotein, was shown to promote cytoadherence of *M. arthritidis* to cultured cells [42] and to elicit protective immunity in rats against arthritis induced by *M. arthritidis* [43]. Thus, the upregulation of MHO_2340 in *M. hominis* upon contact with hDCs might be associated with increased cytoadherence.

In addition, the change in surface lipoproteome upon contact with hDCs involved substrate transporters. The two paralogs *mho_3610* and *mho_3620* encode substrate-binding units of an ABC transporter. They are homologous to the p37 protein of *M. hyorhinis*, an extracytoplasmic thiamine-binding lipoprotein [44]. It was shown that a recombinant p37 protein promote invasiveness of cancer cells in a dose dependent manner, and that this effect was inhibited by monoclonal p37-specific antibodies [45, 46]. In addition, P37 may stimulate motility, migration and invasion *in vitro* through the activation of matrix metalloproteinase-2 (MMP2) and the induction of epidermal growth factor receptor (EGFR) phosphorylation [47, 48]. Thus *mho_3610* and *mho_3620* genes may be involved in the invasion of the host cell. Interestingly, the gene *mhp371*, coding for an ortholog to MHO_3610 in *M. hyopneumoniae*, was also upregulated after infection of pigs compared to broth-grown mycoplasmas [34].

In addition, fifteen lipoprotein genes, for which no putative function could be assigned, were upregulated upon contact with hDCs, seven of them being potentially specific of *M. hominis* as no ortholog could be found. The observations of transcriptional changes provide evidence for the functionality of these unassigned genes and indicate that they may have a role in the interaction of *M. hominis* with innate immunity. Unfortunately, to date, functional genetics tools are lacking in *M. hominis* to specify the function of these regulated genes. This issue could be partially addressed in the near future through the analysis, upon contact with hDCs, of the differential expression of lipoprotein genes from previously reported clinical isolates of *M. hominis* that differ in their ability to induce hDCs maturation and cytokine secretion [3]. In addition, because *M. hominis* is predominantly found in the human urogenital tract where it attaches to epithelial cells, it could be informative to assess lipoprotein gene expression when incubated with human epithelial cells. As previously reported for *M. hominis* visualizing the contact of *M. hominis* with hDCs and measuring the percentage of mycoplasmas attached to hDCs using microscopy methods will also be a complementary approach.

CONCLUSION

In conclusion, the present study provides evidence of a large-scale overexpression of *M. hominis* lipoprotein genes upon contact with hDCs. A list of candidate genes putatively associated with increased adhesion, nutrient capture and transport from the host cells could be extracted. Thus, during the host colonization process, *M. hominis* uses strategies commonly observed for other pathogenic bacteria, but it also certainly uses species-specific mechanisms suggested in this study by the overexpression of seven lipoprotein genes of unknown function for which no ortholog exists among the *Mycoplasma* genus.

FUTURE PERSPECTIVE

This study reports the overexpression of 21 lipoprotein genes upon contact of *M. hominis* PG21, a reference strain intensively used in research laboratories, with hDCs. It was previously shown that this *M. hominis* PG21 strain induces the production of IL-23 by hDCs in a TLR2-dependent manner. However, different *M. hominis* clinical isolates involved in inflammatory or noninflammatory rheumatologic diseases or in genital diseases differ in the ability to promote IL-23 secretion by hDCs. Because lipoproteins of *M. hominis* are largely involved in the interaction of the mycoplasma with the host cell and because *M. hominis* is a very heterogeneous species, different clinical isolates of *M. hominis* might differ in their lipoproteome and in the lipoproteins involved in the interaction with hDCs. To assess this issue in the next years, the surface lipoproteome and the differential expression of lipoproteins of virulent or less virulent clinical isolates upon contact with the host cell will have to be extensively studied. Indeed, different clinical syndromes and different degrees of virulence of *M. hominis* clinical isolates might be associated with different potency in activating the host cell or with the involvement of different mycoplasmal lipoproteins during the interaction with the host cell.

EXECUTIVE SUMMARY

In vitro surface lipoproteome of M. hominis PG21

- Using TX-114 extraction and LC-MS/MS identification, 36 lipoproteins were detected out of the 48 lipoproteins predicted *in silico*, including three newly predicted lipoproteins from the Lmp-related protein family, *i.e.* 75% of the *in silico* predicted lipoproteins.
- Twelve predicted lipoproteins were not detected using this strategy but all of these 12 lipoprotein genes were transcribed *in vitro* as shown by qRT-PCR analyses.

Determination of a set of reference genes for gene expression normalization in M. hominis

- Among 12 candidate reference genes, the use of only two genes, *tuf* and *gatB*, was shown to be sufficient to a reliable normalization in our model of co-incubation of *M. hominis* with hDCs.
- The present study reports a list of seven additional potential stable reference genes that could be usefully assessed in future transcriptional analyses involving host-mycoplasmas interaction.

Differential expression of M. hominis PG21 lipoprotein genes upon contact with hDCs

- The present study provides evidence of a large-scale overexpression of 21 *M. hominis* lipoprotein genes upon contact with hDCs. No lipoprotein-encoding gene was underexpressed.
- The overexpression was predominant at 4h suggesting a prompt and acute response upon contact with hDCs and a rapid involvement of many lipoproteins in the initial step of adaptation to the hDCs environment
- Seven genes of unknown function for which no ortholog exists in the *Mycoplasma* genus were upregulated. Thus, during the host colonization process, *M. hominis* may use species-specific mechanisms.

Overexpression of genes putatively associated with increased adhesion, nutrient capture and transport from the host cells

- Among the upregulated lipoprotein genes in *M. hominis*, three encode putative enzymes, namely MHO_5110, a putative ribonuclease, and MHO_3200 and MHO_04970, two putative peptidases. Their overexpression suggests a requirement for nucleotidic and amino-acid-based substrates in *M. hominis* in contact with hDCs.

In addition, the two overexpressed paralogs *mho_3610* and *mho_3620* encodes substrate-binding units of an ABC transporter and are homologous to the p37 protein of *M. hyorhina*, which may promote invasiveness.

- The upregulation of MHO_2340 in *M. hominis* upon contact with hDCs might be associated with increased cytoadherence.

TABLES AND FIGURES

Table 1. The *in vitro* surface lipoproteome of *M. hominis* PG21.

| Mnemonic | Product | MW |
|----------|--|-------|
| MHO_0280 | Hypothetical protein, predicted lipoprotein | 80.4 |
| MHO_0290 | Pseudogene of hypothetical protein (N-terminal part), predicted lipoprotein | 67.7 |
| MHO_0320 | Conserved hypothetical protein, predicted lipoprotein | 304.8 |
| MHO_0720 | Conserved hypothetical protein, predicted lipoprotein | 75.2 |
| MHO_0730 | Conserved hypothetical protein, putative nuclease, predicted lipoprotein | 34.2 |
| MHO_0780 | Conserved hypothetical protein, predicted lipoprotein | 78.2 |
| MHO_0790 | Conserved hypothetical protein, predicted lipoprotein | 78.2 |
| MHO_1440 | Hypothetical protein, predicted lipoprotein | 20.2 |
| MHO_1510 | OppA, oligopeptide ABC transporter substrate-binding protein | 105.8 |
| MHO_1730 | Conserved hypothetical protein, predicted lipoprotein | 27.1 |
| MHO_2080 | Conserved hypothetical protein, predicted lipoprotein | 63.6 |
| MHO_2100 | Hypothetical protein, predicted lipoprotein | 34.5 |
| MHO_2340 | Conserved hypothetical protein, predicted lipoprotein, putative adhesin | 64.5 |
| MHO_2440 | Hypothetical protein, predicted lipoprotein | 24.3 |
| MHO_2460 | Hypothetical protein, predicted lipoprotein | 16.6 |
| MHO_2510 | Conserved hypothetical protein, predicted lipoprotein | 37.5 |
| MHO_2620 | Hypothetical protein, predicted lipoprotein | 50.5 |
| MHO_3000 | Hypothetical protein, predicted lipoprotein | 27.5 |
| MHO_3070 | Lmp related protein | 44.2 |
| MHO_3100 | P75 related lipoprotein, predicted lipoprotein | 62.3 |
| MHO_3200 | Conserved hypothetical protein, predicted lipoprotein, putative peptidase | 89.6 |
| MHO_3460 | Conserved hypothetical protein precursor, predicted lipoprotein | 28.8 |
| MHO_3470 | P50 = Vaa, surface lipoprotein adhesin | 51.0 |
| MHO_3490 | P60 Membrane protein | 64.2 |
| MHO_3610 | P37-like (<i>Mycoplasma hyorhinis</i>) ABC transporter substrate-binding lipoprotein | 40.8 |
| MHO_3620 | P37-like (<i>Mycoplasma hyorhinis</i>) ABC transporter substrate-binding lipoprotein | 41.8 |
| MHO_3660 | P120 | 119.7 |
| MHO_3720 | P75 protein precursor | 72.4 |
| MHO_4400 | Conserved hypothetical protein, predicted lipoprotein | 29.7 |
| MHO_4720 | Conserved hypothetical protein, predicted lipoprotein | 28.3 |
| MHO_4910 | Hypothetical protein, predicted lipoprotein | 41.2 |
| MHO_4970 | Conserved hypothetical protein, putative peptidase, predicted lipoprotein | 47.9 |
| MHO_4990 | Conserved hypothetical protein | 33.6 |
| MHO_1640 | Lmp3 protein | 178.1 |
| MHO_3730 | Lmp-related protein | 77.8 |
| MHO_4280 | Lmp-related protein | 52.3 |

The characterization of the *in vitro* surface lipoproteome of *M. hominis* PG21 was performed by LC-MS/MS after Triton X-114 extraction. Two independent experiments were performed.

Three Lmp-related proteins newly predicted as lipoproteins are highlighted in grey. The molecular weight (MW) was determined by the ProtParam Tool (<http://web.expasy.org/protparam/>) from the proteic sequence available on Molligen 3.0 (<http://services.cbib.u-bordeaux2.fr/molligen/>). The MW ignores the signal sequence.

Table 2. Characterization of the N-terminal amino acid sequence from the 8 Lmp-related proteins of *M. hominis* PG21

| Mnemonic | Product | Amino acid sequence | Cysteine position in the ORF | Signal peptide | | Transmembrane segments (number) |
|----------|---------------------|---|------------------------------|----------------|----------------------------------|---------------------------------|
| | | | | Prosites | SignalP (cleavage site position) | |
| MHO_0530 | Lmp1 protein | MNEKKKKIAIPLAILC | 16 | No hit | No hit | No hit |
| MHO_0540 | Lmp-related protein | MIDL YCWGIAITAFVLIMC | 18 | No hit | No hit | No hit |
| MHO_1640 | Lmp3 protein | M KKRINILMSISIV C AA A ASTSAIA A M C | 15 and 27 | No hit | 24-25 | Detected |
| MHO_3070 | Lmp-related protein | M KR K ILLFTPLI I AGSLIPTLL T AC | 25 | Detected | 24-25 | Detected |
| MHO_3110 | Lmp-related protein | M KKSKLRILLSTSLI I ALATTATLVATSLKSKFKR | Absence | No hit | 19-20 | No hit |
| MHO_3730 | Lmp-related protein | M KK K NLSLQILAL C V A AGSMPVLASK C | 14 and 28 | No hit | 24-25 | Detected |
| MHO_4280 | Lmp-related protein | M N K KSKKIVLPLAIFCGGLS I AAIATVAIR S C | 17 and 33 | No hit | 27-28 | Detected |
| MHO_4920 | Lmp-related protein | MASIATVAAYAGKSKPESKIEKENLLNELKEALNQ | Absence | No hit | No hit | No hit |

Cysteine residues are in bold font; their position is mentioned from the first amino acid of the ORF. Amino acids in favor of lipoprotein pattern according to the Prosites pattern PS51257 (PROKAR_LIPOPROTEIN) (Hulo *et al.*, 2008) are in the squared box. The signal peptide was determined using (i) ProSite software (www.expasy.org/prosites), (ii) SignalP server using the Gram-positive option (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) and (iii) LipoP software (<http://www.cbs.dtu.dk/services/LipoP/>). Transmembrane segments were determined using the TMHMM software (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>).

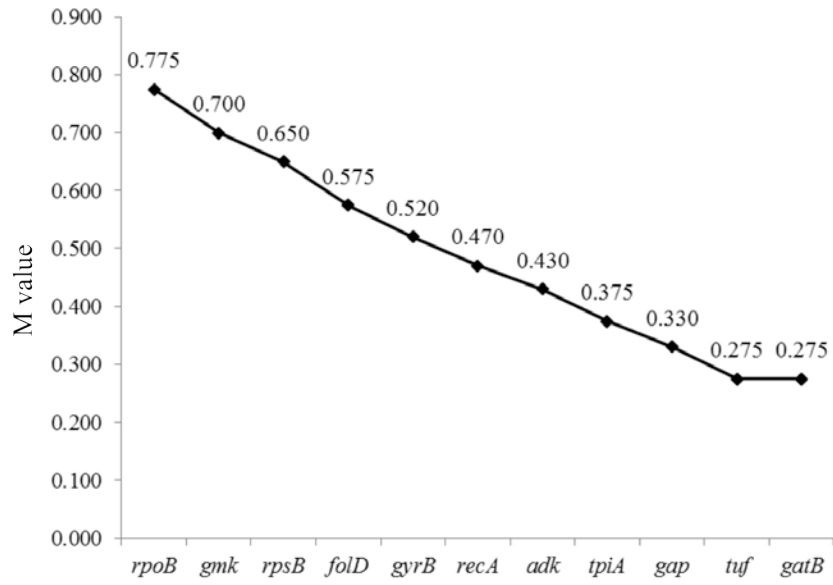
Table 3. Candidate reference genes for *M. hominis* PG21 gene expression normalization.

| Candidate reference gene | Product | Primer sequence (5'-3') | Amplification product size (bp) | E ^(a) | y=ax+b ^(b) R ² (^c) | Ct at 0h | Ct at 4h | Ct at 24h | References |
|--------------------------|---|--|---------------------------------|------------------|--|------------|------------|------------|--------------------------|
| <i>gap</i> | Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase | gap-F TCAAGCAGGTGCTAAAAAGG gap-R TCCAATACGTTGGCAATAGG | 165 | 1.846 | y=-3.74x+16.55 R ² =1.000 | 22.81±0.59 | 22.55±0.54 | 24.53±0.92 | (Hallamaa et al., 2008). |
| <i>tuf</i> | Elongation factor Tu | tuf-F AACGCTGGATTATTGCTACG tuf-R TTGTGGAAGAATGGTGTGTG | 158 | 2.232 | y=-3.42x+13.46 R ² =0.999 | 22.69±0.25 | 23.14±1.24 | 24.28±1.08 | (Hallamaa et al., 2008). |
| <i>gyrB</i> | DNA gyrase subunit B | gyrB-F TTGCCTCTACGTTGGTAAAGT gyrB-R TAATGTGTGCTCCATCAACG | 187 | 1.891 | y=-3.62x+15.77 R ² =0.999 | 24.41±0.13 | 22.99±0.08 | 25.19±0.41 | (Hallamaa et al., 2008). |
| <i>adk</i> | Adenylate kinase (ATP-AMP transphosphorylase) | adk-F GGATATCCCGTACATTAGCTC adk-R TCTGGTTCGTCATCTGGTCTT | 242 | 1.887 | y=-3.87x+17.61 R ² =0.999 | 25.14±0.77 | 25.37±0.68 | 26.04±1.05 | (Reiter et al., 2011) |
| <i>gatB</i> | Aspartyl/glutamyl-tRNA amidotransferase subunit B | gatB-F GGGCAAAGGTTCAAATAATCA gatB-R ACATAAGCCATCGCATCCTC | 184 | 1.888 | y=-3.48x+17.76 R ² =0.996 | 26.56±1.12 | 27.00±0.45 | 28.19±0.94 | (Reiter et al., 2011) |
| <i>rpoB</i> | DNA-dependent RNA polymerase beta chain | rpoB-F ACAAGATGGCTGTCGTCA rpoB-R ATCAAATGGTCTCCGGTAGC | 314 | 1.978 | y=-3.31x+17.66 R ² =0.997 | 29.67±0.79 | 27.06±0.28 | 30.33±0.89 | (Metcalfe et al., 2010) |
| <i>rpsB</i> | 30S ribosomal protein S2 | rpsB-F GCAGTAGCTCCAAACACAAGTAGAA rpsB-R GGTTTTTGAGCCATTTTATTTAATA | 215 | 1.874 | y=-3.63x+15.77 R ² =0.999 | 28.81±0.86 | 27.16±0.80 | 30.60±1.07 | (Reiter et al., 2011) |
| <i>rplL</i> | 50S ribosomal protein L7/L12 | rplL-F ACCGATGGAACTGTTGAAGC rplL-R TTATTCTCCTTCTTCGTTAGCAG | 387 | 1.941 | y=-3.43x+21.07 R ² =0.998 | 35.61±1.44 | 36.78±2.28 | 36.69±2.34 | (Reiter et al., 2011) |
| <i>recA</i> | Recombinase A | recA-F GCACAGGCAAGGCTTATG recA-R TCTCCGTTATTGGTTACATTTTGA | 212 | 1.889 | y=-3.63x+15.77 R ² =0.999 | 30.91±0.70 | 30.09±1.50 | 31.57±0.66 | (Liu et al., 2013) |
| <i>gmk</i> | Guanylate kinase | gmk-F TACAGGACCAAGTGCGGTTG gmk-R TCGTGGTGATCTCGTTGTCA | 106 | 1.972 | y=-3.39x+17.00 R ² =0.999 | 25.76±1.06 | 24.09±0.72 | 27.45±1.09 | (Liu et al., 2013) |
| <i>tpiA</i> | Triosephosphate isomerase | tpiA-F GGTGTTGTATGGCGGTTCA tpiA-R TAATGCTGCTCCGCCCAACT | 94 | 1.972 | y=-3.42x+17.03 R ² =1.000 | 24.05±0.88 | 23.42±0.61 | 25.38±1.41 | (Metcalfe et al., 2010) |
| <i>folD</i> | Methylenetetrahydrofolate dehydrogenase | folD-F CGGCACAAAAGACCCCAAT folD-R TTAATGAGCAATGCCGAAATAG | 192 | 1.935 | y=-3.52x+16.70 R ² =1.000 | 27.78±1.18 | 28.09±1.07 | 30.46±1.20 | (Liu et al., 2013) |

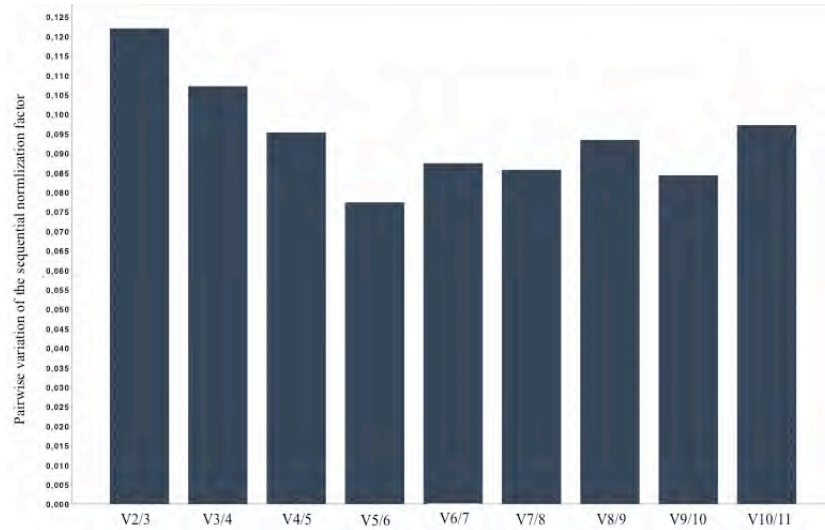
^a E, PCR efficiency. ^b Standard curve. ^c square of Pearson's correlation coefficient from 10-fold serial dilutions. Ct, cycle threshold.

Descriptive statistics were calculated for the three independent experiments and are presented as arithmetic mean ± standard deviation.

1A.



1B.



1C.

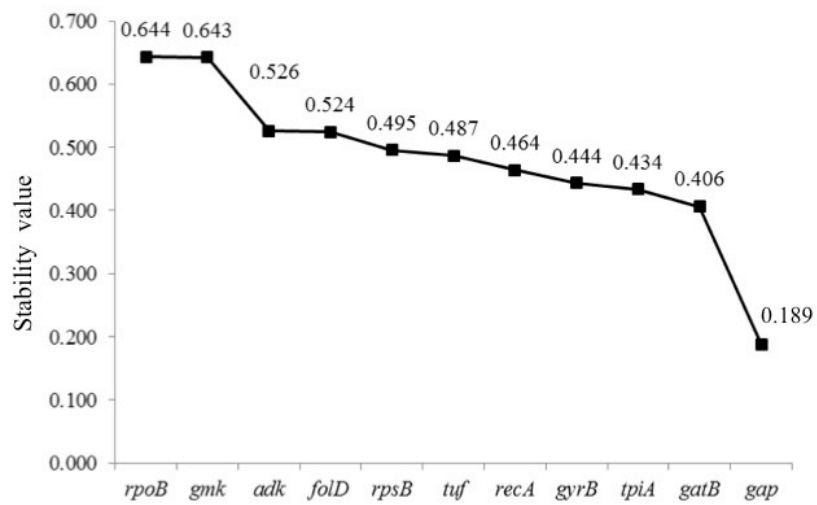


Figure 1. GeNorm and Normfinder analysis of 10 candidate reference genes for normalization. **A.** Stability of the reference genes using the geNorm v3.4 software. A low stability value means that the gene is stably expressed under the experimental conditions. **B.** Determination of the optimal number of reference genes by geNorm software. geNorm software calculates a normalization factor for each reference gene and suggests the optimal number of required reference genes based on the pairwise variation of normalization factors with an increasing number of reference genes included for normalization factor calculation ($V_n/n+1$). The optimal number of reference genes is finally given when the addition of the next gene has no significant contribution to the newly calculated normalization factor. According to the geNorm developers, below the 0.15 cut-off, the addition of supplementary genes has no significant contribution. The optimal number of reference targets in this experimental situation is 2: $V_n/n+1$ is below 0.15 when comparing a normalization factor based on the 2 (*tuf* and *gatB*) or 3 (*tuf*, *gatB* and *gap*) most stable targets. As such, the optimal normalization factor can be calculated as the geometric mean of reference targets *tuf* and *gatB*. **C.** Stability of the reference genes using the Normfinder v0.953 software.

Table 4. Differential expression of 38 *M. hominis* PG21 lipoprotein genes after 4h and 24h of co-incubation with hDCs.

| Mnemonic | Product | Fold change | | | |
|----------|--|-------------|---------|-------|---------|
| | | t=4h | p value | t=24h | p value |
| MHO_0290 | Pseudogene of hypothetical protein (N-terminalpart), predicted lipoprotein | 0.52 | 0.188 | 0.76 | 0.742 |
| MHO_0320 | Conserved hypothetical protein, predicted lipoprotein | 1.19 | 0.003 | 1.05 | 0.860 |
| MHO_0720 | Conserved hypothetical protein, predicted lipoprotein | 0.96 | 0.626 | 1.46 | 0.390 |
| MHO_0730 | Conserved hypothetical protein, putative nuclease, predicted lipoprotein | 1.41 | 0.268 | 1.12 | 0.227 |
| MHO_0780 | Conserved hypothetical protein, predicted lipoprotein | 1.48 | 0.218 | 1.58 | 0.318 |
| MHO_0790 | Conserved hypothetical protein, predicted lipoprotein | 8.88 | 0.008 | 2.49 | 0.146 |
| MHO_1440 | Hypothetical protein, predicted lipoprotein | 0.85 | 0.841 | 3.94 | 0.015 |
| MHO_1510 | OppA, Oligopeptide ABC transporter substrate-binding protein | 0.96 | 0.771 | 1.10 | 0.595 |
| MHO_1590 | Hypothetical protein, predicted lipoprotein | 3.36 | 0.018 | 1.39 | 0.739 |
| MHO_1640 | Lmp3 protein | 1.04 | 0.920 | 1.77 | 0.388 |
| MHO_1730 | Conserved hypothetical protein, predicted lipoprotein | 2.76 | 0.127 | 1.40 | 0.450 |
| MHO_2080 | Conserved hypothetical protein, predicted lipoprotein | 0.83 | 0.751 | 0.42 | 0.397 |
| MHO_2340 | Conserved hypothetical protein, predicted lipoprotein, putative adhesin | 8.22 | 0.037 | 2.30 | 0.363 |
| MHO_2430 | Hypothetical protein, predicted lipoprotein | 1.47 | 0.482 | 1.05 | 0.876 |
| MHO_2440 | Hypothetical protein, predicted lipoprotein | 4.23 | 0.015 | 1.82 | 0.566 |
| MHO_2450 | Hypothetical protein, predicted lipoprotein | 6.65 | 0.036 | 2.38 | 0.146 |
| MHO_2460 | Hypothetical protein, predicted lipoprotein | 5.62 | 0.026 | 0.79 | 0.597 |
| MHO_2480 | Conserved hypothetical protein, predicted lipoprotein | 4.22 | 0.009 | 0.89 | 0.498 |
| MHO_2510 | Conserved hypothetical protein, predicted lipoprotein | 3.58 | 0.018 | 1.35 | 0.544 |
| MHO_3000 | Hypothetical protein, predicted lipoprotein | 3.23 | 0.011 | 0.71 | 0.156 |
| MHO_3070 | Lmp related protein | 0.75 | 0.723 | 0.77 | 0.548 |
| MHO_3200 | Conserved hypothetical protein, predicted lipoprotein, putative peptidase | 2.36 | 0.004 | 2.10 | 0.111 |
| MHO_3270 | Hypothetical protein, predicted lipoprotein | 1.05 | 0.945 | 1.53 | 0.718 |
| MHO_3280 | Hypothetical protein, predicted lipoprotein | 1.59 | 0.002 | 1.56 | 0.147 |
| MHO_3460 | Conserved hypothetical protein precursor, predicted lipoprotein | 4.49 | 0.044 | 1.44 | 0.432 |
| MHO_3470 | P50 = Vaa, surface lipoprotein adhesin | 1.07 | 0.741 | 1.35 | 0.384 |
| MHO_3610 | P37-like (<i>Mycoplasma hyorhinis</i>) ABC transporter substrate-binding lipoprotein | 3.42 | 0.041 | 1.56 | 0.164 |
| MHO_3620 | P37-like (<i>Mycoplasma hyorhinis</i>) ABC transporter substrate-binding lipoprotein | 1.83 | 0.040 | 1.31 | 0.117 |
| MHO_3660 | P120 | 0.88 | 0.648 | 0.92 | 0.863 |
| MHO_3720 | P75 protein precursor | 1.88 | 0.115 | 1.14 | 0.916 |
| MHO_3730 | Lmp-related protein | 1.55 | 0.414 | 1.31 | 0.232 |
| MHO_4280 | Lmp-related protein | 1.4 | 0.707 | 1.0 | 0.997 |
| MHO_4400 | Conserved hypothetical protein, predicted lipoprotein | 1.89 | 0.302 | 1.60 | 0.539 |
| MHO_4720 | Conserved hypothetical protein, predicted lipoprotein | 2.26 | 0.017 | 2.18 | 0.055 |
| MHO_4970 | Conserved hypothetical protein, putative peptidase, predicted lipoprotein | 3.85 | 0.036 | 2.04 | 0.062 |
| MHO_4980 | Conserved hypothetical protein, predicted lipoprotein | 2.91 | 0.036 | 2.57 | 0.010 |
| MHO_4990 | Conserved hypothetical protein, predicted lipoprotein | 4.01 | 0.001 | 4.15 | 0.031 |
| MHO_5110 | Pseudogene of ribonuclease (N-terminal part), predicted lipoprotein | 4.28 | 0.049 | 3.71 | 0.042 |

The fold-change ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) is the normalized gene expression ($2^{-\Delta Ct}$) in the test groups at t=4h and t=24h divided by the normalized gene expression ($2^{-\Delta Ct}$) in the control group at t=0h in

three independent experiments. The lipoproteins for which significant fold changes ($p < 0.05$) were observed are highlighted in grey.

REFERENCES

1. Browning GF, Marena MS, Noormohammadi AH, Markham PF. The central role of lipoproteins in the pathogenesis of mycoplasmoses. *Vet. Microbiol.* 153(1-2), 44-50 (2011).
2. Kovacs-Simon A, Titball RW, Michell SL. Lipoproteins of bacterial pathogens. *Infect. Immun.* 79(2), 548-561 (2011).
3. Truchetet ME, Béven L, Renaudin H *et al.* Potential role of *Mycoplasma hominis* in interleukin (IL)-17-producing CD4⁺ T-cell generation via induction of IL-23 secretion by human dendritic cells. *J Infect Dis.* 204(11), 1796-1805 (2011).
4. Cole BC, Mu HH, Pennock ND *et al.* Isolation and partial purification of macrophage- and dendritic cell-activating components from *Mycoplasma arthritidis*: Association with organism virulence and involvement with Toll-like Receptor 2. *Infect. Immun.* 73(9), 6039-6047 (2005).
5. Liu YC, Lin IH, Chung WJ *et al.* Proteomics characterization of cytoplasmic and lipid-associated membrane proteins of human pathogen *Mycoplasma fermentans* M64. *PLoS one* 7(5), e35304 (2012).
6. Shimizu T, Kida Y, Kuwano K. *Ureaplasma parvum* lipoproteins, including MB antigen, activate NF-kappaB through TLR1, TLR2 and TLR6. *Microbiology* 154, 1318-1325 (2008).
7. He J, You X, Zeng Y, Yu M, Zuo L, Wu Y. *Mycoplasma genitalium*-derived lipid-associated membrane proteins activate NF-kappaB through Toll-like Receptors 1, 2, and 6 and CD14 in a MYD88-dependent pathway. *Clin. Vaccine Immunol.* 16(12), 1750-1757 (2009).
8. Shimizu T, Kida Y, Kuwano K. A triacylated lipoprotein from *Mycoplasma genitalium* activates NF-kappaB through Toll-like Receptor 1 (TLR 1) and TLR2. *Infect. Immun.* 76(8), 3672-3678 (2008).
9. Madsen ML, Nettleton D, Thacker EL, Edwards R, Minion FC. Transcriptional profiling of *Mycoplasma hyopneumoniae* during heat shock using microarrays. *Infect. Immun.* 74(1), 160-166 (2006).
10. Cecchini KR, Gorton TS, Geary SJ. Transcriptional responses of *Mycoplasma gallisepticum* strain R in association with eukaryotic cells. *J. Bacteriol.* 189(16), 5803-5807 (2007).

11. Hallamaa KM, Tang SL, Ficorilli N, Browning GF. Differential expression of lipoprotein genes in *Mycoplasma pneumoniae* after contact with human lung epithelial cells, and under oxidative and acidic stress. *BMC microbiology* 8, 124 (2008).
12. Pereyre S, Bébéar CM, Bébéar C. *Mycoplasma hominis*, *M. Genitalium* and *Ureaplasma* spp. In: *Antimicrobial therapy and vaccines, 3rd edition*, Appel Trees Production NY (Ed.). In press.
13. Pereyre S, Sirand-Pugnet P, Béven L *et al.* Life on arginine for *Mycoplasma hominis*: Clues from its minimal genome and comparison with other human urogenital mycoplasmas. *PLoS genetics* 5(10), e1000677 (2009).
14. Hopfe M, Henrich B. OppA, the substrate-binding subunit of the oligopeptide permease, is the major ecto-atpase of *Mycoplasma hominis*. *J. Bacteriol.* 186(4), 1021-1028 (2004).
15. Zhang Q, Wise KS. Localized reversible frameshift mutation in a adhesin gene confers a phase-variable adherence phenotype in mycoplasma. *Mol. Microbiol.* 25, 859-869 (1997).
16. Jensen LT, Ladefoged S, Birkelund S, Christiansen G. Selection of *Mycoplasma hominis* PG21 deletion mutants by cultivation in the presence of monoclonal antibody 552. *Infect. Immun.* 63, 3336-3347 (1995).
17. Ladefoged SA, Christiansen G. *Mycoplasma hominis* expresses two variants of a cell-surface protein, one a lipoprotein, and one not. *Microbiology* 144, 761-770 (1998).
18. Nyvold C, Birkelund S, Christiansen G. The *Mycoplasma hominis* P120 membrane protein contains a 216 amino acid hypervariable domain that is recognized by the human humoral immune response. *Microbiology* 143, 675-688 (1997).
19. Bordier C. Phase separation of integral membrane proteins in Triton X-114 solution. *J. Biol. Chem.* 256, 1604-1607 (1981).
20. Barre A, De Daruvar A, Blanchard A. Molligen, a database dedicated to the comparative genomics of *Mollicutes*. *Nucleic. Acids Res.* 32 Database issue, D307-D310 (2004).
21. Van Kuppeveld FJ, Van Der Logt JT, Angulo AF *et al.* Genus- and species-specific identification of mycoplasmas by 16S RNA amplification. *Appl. Environ. Microbiol.* 58(8), 2606-2615 (1992).
22. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F *et al.* Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome biology* 3(7), 34.1-34.12. (2002).
23. Andersen CL, Jensen JL, Orntoft TF. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: A model-based variance estimation approach to identify

- genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res.* 64(15), 5245-5250 (2004).
24. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-(\Delta\Delta C_t)}$ method. *Methods* 25(4), 402-408 (2001).
 25. Hellemans J, Vandesompele J. qPCR data analysis - unlocking the secret to successful results. *PCR Troubleshooting and Optimization: The Essential Guide* (Caister Academic Press), 1-13 (2011).
 26. Hopfe M, Deenen R, Degrandi D, Kohrer K, Henrich B. Host cell responses to persistent mycoplasmas--different stages in infection of Hela cells with *Mycoplasma hominis*. *PLoS one* 8(1), e54219 (2013).
 27. Taylor-Robinson D, Davies HA, Sarathchandra P, Furr PM. Intracellular location of mycoplasmas in cultured cells demonstrated by immunocytochemistry and electron microscopy. *Int. J. Exp. Pathol.* 72(6), 705-714. (1991).
 28. Liu J, Tan Y, Yang X, Chen X, Li F. Evaluation of *Clostridium ljungdahlii* DSM 13528 reference genes in gene expression studies by qRT-PCR. *J. Biosci. Bioeng* 116(4), 460-464 (2013).
 29. Metcalf D, Sharif S, Weese JS. Evaluation of candidate reference genes in *Clostridium difficile* for gene expression normalization. *Anaerobe* 16(4), 439-443 (2010).
 30. Reiter L, Kolsto AB, Piehler AP. Reference genes for quantitative, reverse-transcription PCR in *Bacillus cereus* group strains throughout the bacterial life cycle. *J. Microbiol. Methods.* 86(2), 210-217 (2011).
 31. Babu MM, Priya ML, Selvan AT *et al.* A database of bacterial lipoproteins (DOLOP) with functional assignments to predicted lipoproteins. *J. Bacteriol.* 188(8), 2761-2773 (2006).
 32. Krasteva I, Liljander A, Fischer A *et al.* Characterization of the *in vitro* core surface proteome of *Mycoplasma mycoides subsp. mycoides*, the causative agent of contagious bovine pleuropneumonia. *Vet. Microbiol.* 168(1), 116-123 (2014).
 33. Nouvel LX, Sirand-Pugnet P, Marends MS *et al.* 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 (2010).
 34. Madsen ML, Puttamreddy S, Thacker EL, Carruthers MD, Minion FC. Transcriptome changes in *Mycoplasma hyopneumoniae* during infection. *Infect. Immun.* 76(2), 658-663 (2008).
 35. Yuen T, Wurmbach E, Pfeffer RL, Ebersole BJ, Sealfon SC. Accuracy and calibration of commercial oligonucleotide and custom cDNA microarrays. *Nucleic Acids Res.* 30(10), e48 (2002).

36. Dallas PB, Gottardo NG, Firth MJ *et al.* Gene expression levels assessed by oligonucleotide microarray analysis and quantitative real-time RT-PCR - how well do they correlate? *BMC genomics* 6, 59 (2005).
37. Nakamura A, Koide Y, Miyazaki H *et al.* Gene cloning and characterization of a novel extracellular ribonuclease of *Bacillus subtilis*. *Eur. J. Biochem.* 209(1), 121-127 (1992).
38. Ilinskaya ON, Sokurenko YV, Ulyanova VV *et al.* Ribonucleolytic activity of mycoplasmas. *Mikrobiologiya* 83(3), 320-327 (2014).
39. Somarajan SR, Kannan TR, Baseman JB. *Mycoplasma pneumoniae* MPN133 is a cytotoxic nuclease with a glutamic acid-, lysine- and serine-rich region essential for binding and internalization but not enzymatic activity. *Cell. Microbiol.* 12(12), 1821-1831 (2010).
40. Guell M, Van Noort V, Yus E *et al.* Transcriptome complexity in a genome-reduced bacterium. *Science* 326(5957), 1268-1271 (2009).
41. Potempa J, Pike RN. Corruption of innate immunity by bacterial proteases. *J. Innate Immun.* 1(2), 70-87 (2009).
42. Washburn LR, Hirsch S, Voelker LL. Mechanisms of attachment of *Mycoplasma arthritidis* to host cells *in vitro*. *Infect. Immun.* 61(6), 2670-2680 (1993).
43. Washburn LR, Weaver EJ. Protection of rats against *Mycoplasma arthritidis*-induced arthritis by active and passive immunizations with two surface antigens. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 4(3), 321-327 (1997).
44. Sippel KH, Robbins AH, Reutzel R *et al.* Structural insights into the extracytoplasmic thiamine-binding lipoprotein P37 of *Mycoplasma hyorhinis*. *J. Bacteriol.* 191(8), 2585-2592 (2009).
45. Ketcham CM, Anai S, Reutzel R *et al.* P37 induces tumor invasiveness. *Mol. Cancer Ther.* 4(7), 1031-1038 (2005).
46. Steinemann C, Fenner M, Parish RW, Binz H. Studies of the invasiveness of the chemically induced mouse sarcoma FS9.I. Monoclonal antibodies to a 37,000 dalton membrane glycoprotein inhibit invasion of fibroblasts *in vitro*. *Int. J. Cancer.* 34(3), 407-414 (1984).
47. Gong M, Meng L, Jiang B *et al.* P37 from *Mycoplasma hyorhinis* promotes cancer cell invasiveness and metastasis through activation of MMP-2 and followed by phosphorylation of EGFR. *Mol. Cancer Ther.* 7(3), 530-537 (2008).
48. Goodison S, Nakamura K, Iczkowski KA, Anai S, Boehlein SK, Rosser CJ. Exogenous mycoplasmal P37 protein alters gene expression, growth and morphology of prostate cancer cells. *Cytogenet. Genome Res.* 118(2-4), 204-213 (2007).

SUPPLEMENTARY DATA

Table S1. RT-qPCR primer sequences of 48 lipoprotein genes and 12 candidate reference genes.

| Mnemonic | Primer names | Primer sequences (5'-3') |
|----------|--------------|--------------------------|
| MHO_0280 | MHO_0280-F | TGGCAAGTGATTTCTCGG |
| | MHO_0280-R | TTCGTCAGTAGCCCAACC |
| MHO_0290 | MHO_0290-F | TAAACCCGAAAATACACTTGATTC |
| | MHO_0290-R | TTCCGACTTCATCTACCCATT |
| MHO_0320 | MHO_0320-F | GGCACAATCTGAAGCATGAA |
| | MHO_0320-R | AGTATTGCCCGTGTTCTTGG |
| MHO_0660 | MHO_0660-F | CAAGAATTGCTGATGGTGATACA |
| | MHO_0660-R | GCCATTCCAAAGAAAACCAAT |
| MHO_0720 | MHO_0720-F | AACAGGCGGATTTGACTACTC |
| | MHO_0720-R | TGTGAGTATCCGGCATTGTA |
| MHO_0730 | MHO_0730-F | GAAAGCACTGAAGCAAAGGAA |
| | MHO_0730-R | GGAGAACGCATATTGGCAAC |
| MHO_0780 | MHO_0780-F | CGCCCCCTTATTCATATTCA |
| | MHO_0780-R | TACCATCGGGGAATCTTTGA |
| MHO_0790 | MHO_0790-F2 | TGATAATTGCCCTGCAACTG |
| | MHO_0790-R2 | TTGATCCATAAACGCCTGTT |
| MHO_1440 | MHO_1440-F | GTAGCCCTTGTACCAGCAAC |
| | MHO_1440-R | AATTATTTGCTACATCGCTGAA |
| MHO_1510 | MHO_1510-F | TCCACGTGATCCAAACTTCA |
| | MHO_1510-R | CAGTGCCATTTTTGTGTGC |
| MHO_1590 | MHO_1590-F | GATTAGCTTGTGCCGTTGG |
| | MHO_1590-R | ATCGTCATCATTGCTTGG |
| MHO_1640 | MHO_1640-F | TGATGAACGATACGGAACCA |
| | MHO_1640-R | TTGAACCATCCCATTTTGCT |
| MHO_1730 | MHO1730_F | ATGAAGTTGCTGCTGGTACA |
| | MHO1730_R | CTCCCAATTGGACTGTGTCT |
| MHO_2080 | MHO_2080-F | TGATACAGATGGCGATGGAA |
| | MHO_2080-R | CGGCAACACAACAGGTAAAA |
| MHO_2090 | MHO_2090-F | CCGCTCATCCAAACGTAAT |
| | MHO_2090-R | AGAAACCTTATCGTCAATGCCTA |
| MHO_2100 | MHO_2100-F | GGAACAACACCCGAAAAGAA |
| | MHO_2100-R | GAAATCTGCCAACCCGTT |
| MHO_2260 | MHO_2260-F | CACGGAGACCTTCATGAAGT |
| | MHO_2260-R | TTAACCCAGCAAATGCCG |
| MHO_2340 | MHO_2340-F | AAAGCCAGGAACAACACCTG |
| | MHO_2340-R | TCATATGCCCCCTTCAAAGC |
| MHO_2430 | MHO_2430-F | CCCATTAGTTGCAGCTTCTT |
| | MHO_2430-R | TCTTGGCATCCTGAACTTCT |
| MHO_2440 | MHO_2440-F | CTGCACGTGGAACAAAAGAA |
| | MHO_2440-R | GGTGGCCAAACGGAATAAG |
| MHO_2450 | MHO_2450-F | CAATTGCAGCAGTTTCATGCC |
| | MHO_2450-R | TTGATTAAGCGGTATTTTGGAA |
| MHO_2460 | MHO_2460-F | AGGGGCAGTTCTAGTTTTAGCTT |
| | MHO_2460-R | CTGCCAACGCCTTATTGC |
| MHO_2480 | MHO_2480-F | TTGCGCCCGACTGAATTA |
| | MHO_2480-R | AACCATTGCCCTTGTCTTTG |
| MHO_2500 | MHO_2500-F | CTGCAGGCGATGTTAATGAC |
| | MHO_2500-R | ACATCCCCGACATTGACATT |
| MHO_2510 | MHO_2510-F | GACAGGCTTGAAGGCAAAGA |
| | MHO_2510-R | CATGCCATAGACCCATTTCA |

| Gene mnemonic | Primer names | Primer sequences (5'-3') |
|---------------|--------------|---------------------------|
| MHO_2620 | MHO_2620-F | AGGCAATCTAAACGGTGCAA |
| | MHO_2620-R | AACGCTCCGGGTTTTCT |
| MHO_3000 | MHO_2620-F | ATACAGATCCCGAACCAACCTAATA |
| | MHO_2620-R | GCTTTGGCTCCTTTGTTGG |
| MHO_3070 | MHO_3070-F | TGCAATCAAAGAAGTAACGGAT |
| | MHO_3070-F | TTCCAACGTTTTTGCATCTTC |
| MHO_3100 | MHO_3100-F | GCGGCAAGTCCTAGTCCTA |
| | MHO_3100-R | CTCAACAATAGCCTATCCACAAC |
| MHO_3200 | MHO_3200-F | AGGTGGAATGAAGCAAGTTCA |
| | MHO_3200-R | GTACCAGAAGCGCCTCCA |
| MHO_3270 | MHO_3270-F | CCAATTTTGCCGTTATGTGT |
| | MHO_3270-R | TTTGAATCTGGCCCTATAGC |
| MHO_3280 | MHO_3280-F | CAGGATTTATTGCAAGCGAAG |
| | MHO_3280-R | AGCGCAACTCGGGTTTACTA |
| MHO_3460 | MHO_3460-F | AGGGGCAGTTCTAGTTTTAGCTT |
| | MHO_3460-R | TTAGCTCATCTGCCAACGC |
| MHO_3470 | MHO_3470-F | CGCTATTTTGCCAGTTGC |
| | MHO_3470-R | TAATCGCCGTATGAACCTG |
| MHO_3490 | MHO_3490-F | CTCAAATCAAATCGCAGCAA |
| | MHO_3490-R | TGCCGCCTAAATCACCTG |
| MHO_3610 | MHO_3610-F | AACCCAGATACATCGGCAAG |
| | MHO_3610-R | GCAAAAGCAAGATAAGCAGATT |
| MHO_3620 | MHO_3620-F | TGACCTTGGATCTTTTGCAT |
| | MHO_3620-R | GCCTTCCTTTCAAACCTCG |
| MHO_3660 | MHO_3660-F | GGATTGGGTGAAGACATTAAG |
| | MHO_3660-R | CCTTCAGCAAAACCCAAAC |
| MHO_3720 | MHO_3720-F | CAAGCCCAGAAAACAACAGC |
| | MHO_3720-R | GGGCCCTTTTCTAAATTTGC |
| MHO_3730 | MHO_3730-F | CCACCAAGCGATGAATTTTT |
| | MHO_3730-R | GCCGGGATAATCACCATAAA |
| MHO_4280 | MHO_4280-F2 | AAAAGGCGCAAAAAGAATCA |
| | MHO_4280-R2 | CAAGTAATTTTTGCATGATTTGC |
| MHO_4400 | MHO_4400-F | TCGCTCCTATGTTTGCATTG |
| | MHO_4400-R | TCTCTTGGCGATATTGGGTTA |
| MHO_4720 | MHO4720_F | GGCTTTGGTTTAGTTGCTCC |
| | MHO4720_R | TCTAGCAACCCTGATTCAGC |
| MHO_4910 | MHO_4910-F | TGCCTTTTGCCACAATTC |
| | MHO_4910-R | TTGAAGCAAGGCCATTAATTTA |
| MHO_4970 | MHO_4970-F | CAGCAAATCAAATCCAAGCA |
| | MHO_4970-R | TCCATAAAGTTCGCTTCCTG |
| MHO_4980 | MHO_4980-F | AAGGCGATGAATCAGGAGAA |
| | MHO_4980-R | ATGATCATTTTGGCGGGT |
| MHO_4990 | MHO_4990-F | CAACGAAAATGCAAACGAAA |
| | MHO_4990-R | GCCTTCAAAGAATTTCCATATATCA |
| MHO_5110 | MHO_5110-F | CTGCCCAATGAGAACTGAT |
| | MHO_5110-R | GCCCTAGCAACATCTCCTTTAA |
| gap, MHO_5150 | gap-F | TCAAGCAGGTGCTAAAAAGG |
| | gap-R | TCCAATACGTTGGCAATAGG |
| tuf, MHO_0520 | tuf-F | AACGCTGGATTATTGCTACG |
| | tuf-R | TTGTGGAAGAATGGTGTGTG |

| Gene mnemonic | Primer names | Primer sequences (5'-3') |
|-------------------|------------------|---|
| gyrB, MHO_3760 | gyrB-F gyrB-R | TTGCCTCTACGTGGTAAGGT TAATGTGTGCTCCATCAACG |
| adk, MHO_2780 | adk-F adk-R | GGATATCCCCGTACATTAGCTC TCTGGTTCGTTCATCTGGTCTT |
| gatB, MHO_0450 | gatB-F gatB-R | GGGCAAAGGTTCAAATTCA ACATAAGCCATCGCATCCTC |
| rpoB, MHO_2680 | rpoB-F rpoB-R | ACAAGATGGCTGGTCGTCA ATCAAATGGTTCTCCGGTAGC |
| rpsB, MHO_5000 | rpsB-F rspB-R | GCAGTAGCTCCAACACAAGTAGAA GGTTTTTGAGCCATTTTATTTAATA |
| rplL, MHO_2690 | rplL-F rplL-R | ACCGATGGAAGTGTGAAGC TTATTCTCCTTCTTCGTTAGCAG |
| recA, MHO_1190 | recA-F recA-R | GCACAGGCAAGGCTTATG TCTCCGTTATTGGTTACATTTTGA |
| gmk, MHO_4860 | gmk-F gmk-R | TACAGGACCAAGTGGCGTTG TCGTGGTGATCTCGTTGTCA |
| tpiA, MHO_2400 | tpiA-F tpiA-R | GGTGTGTATGGCGGTTCA TAATGCTGCTCCGCCAACT |
| folD, MHO_1920 | folD-F folD-R | CGGCACAAAAGACCCAAT TTAATGAGCAATGCCGAAATAG |

Table S2. Proteins excluding predicted lipoproteins detected in the Triton X-114-enriched fraction of *M. hominis* PG21.

| Mnemonic | Gene name | Product | Localization |
|-----------|-------------|---|--------------|
| MHO_0010 | <i>oxaA</i> | preprotein translocase subunit YidC | Membrane |
| MHO_0220 | <i>atpF</i> | ATP synthase B chain | Membrane |
| MHO_0230 | <i>atpM</i> | ATP synthase delta chain | Cytoplasmic |
| MHO_0240 | <i>atpA</i> | ATP synthase alpha chain | Cytoplasmic |
| MHO_0250 | <i>atpG</i> | ATP synthase gamma chain | Cytoplasmic |
| MHO_0260 | <i>atpD</i> | ATP synthase beta chain | Cytoplasmic |
| MHO_0390 | <i>plsB</i> | 1-acyl-SN-glycerol-3-phosphate acyltransferase | Membrane |
| MHO_0460 | | Conserved hypothetical protein, putative ribonuclease | Membrane |
| MHO_0510 | - | Conserved hypothetical protein | Unknown |
| MHO_0520 | <i>tufA</i> | Elongation factor Tu (EF-Tu) | Cytoplasmic |
| MHO_0530 | - | Lmp1 protein | Membrane |
| MHO_0540 | - | Lmp-related protein | Membrane |
| MHO_0600 | <i>argS</i> | Synthetase, arginyl-tRNA synthetase | Cytoplasmic |
| MHO_0650 | <i>mscI</i> | Large-conductance mechanosensitive channel | Membrane |
| MHO_0690 | <i>arcA</i> | Arginine deiminase | Cytoplasmic |
| MHO_0740 | - | ABC transporter ATP-binding protein | Membrane |
| MHO_0750 | - | ABC transport permease protein | Membrane |
| MHO_0800 | <i>rspT</i> | 30S ribosomal protein S4 | Cytoplasmic |
| MHO_0880 | <i>rplA</i> | 50S ribosomal protein L1 | Cytoplasmic |
| MHO_0920 | <i>secA</i> | Preprotein translocase SecA subunit | Cytoplasmic |
| MHO_1030 | - | Hypothetical protein | Membrane |
| MHO_1040 | - | Hypothetical protein | Membrane |
| MHO_1090 | - | Hypothetical protein | Membrane |
| MHO_1110 | <i>hlyC</i> | Hemolysin C | Membrane |
| MHO_1210 | <i>rspF</i> | 30S ribosomal protein S6 | Cytoplasmic |
| MHO_1290 | <i>rplT</i> | 50S ribosomal protein L20 | Cytoplasmic |
| MHO_1340 | - | Hypothetical protein | Membrane |
| MHO_1380 | <i>obgE</i> | GTP-binding protein Obg | Membrane |
| MHO_1420 | - | Hypothetical protein | Membrane |
| MHO_1430 | - | Hypothetical protein | Membrane |
| MHO_1460 | <i>rspG</i> | 30S ribosomal protein S7 | Cytoplasmic |
| MHO_1480 | - | Conserved hypothetical protein | Membrane |
| MHO_1490 | - | Conserved hypothetical protein | Cytoplasmic |
| MHO_1520 | <i>oppB</i> | Oligopeptide transport system permease protein | Membrane |
| MHO_1530 | <i>oppC</i> | Oligopeptide transport system permease protein | Membrane |
| MHO_1540 | <i>oppD</i> | Putative oligopeptide transport ATP-binding protein | Membrane |
| MHO_1550 | <i>oppF</i> | Oligopeptide transport ATP-binding proteinhomolog | Membrane |
| MHO_1620 | <i>dnaJ</i> | Chaperone protein dnaJ | Cytoplasmic |
| MHO_1640* | - | Lmp3 protein | Membrane |
| MHO_1650 | - | Hypothetical protein | Membrane |
| MHO_1750 | <i>oppC</i> | Oligopeptide transport system permease protein | Membrane |
| MHO_1800 | <i>nadE</i> | NH(3)-dependent NAD(+) synthetase | Cytoplasmic |
| MHO_1860 | <i>secD</i> | Protein-export membrane protein | Membrane |
| MHO_1930 | <i>dgk</i> | Deoxyguanosine kinase | Membrane |

| Mnemonic | Gene name | Product | Localization |
|-----------|--------------|--|--------------|
| MHO_1970 | <i>cbiQ1</i> | Cobalt import ATP-binding protein <i>cbiO</i> 1 | Membrane |
| MHO_1980 | <i>cbiQ2</i> | Cobalt import ATP-binding protein <i>cbiO</i> 2 | Membrane |
| MHO_1990 | <i>cbiQ</i> | Cobalt ABC transporter permease protein | Membrane |
| MHO_2060 | - | Hypothetical protein | Membrane |
| MHO_2070 | <i>pgsA</i> | CDP-diacylglycerol-glycerol-3-phosphate3-phosphatidyltransferase | Membrane |
| MHO_2120 | <i>pepQ</i> | XAA-Pro dipeptidase | Cytoplasmic |
| MHO_2180 | <i>ffh</i> | Signal recognition particle protein | Cytoplasmic |
| MHO_2240 | <i>rplM</i> | 50S ribosomal protein L13 | Cytoplasmic |
| MHO_2310 | - | ABC transporter, ATP-binding protein | Membrane |
| MHO_2320 | - | ABC transporter, ATP-binding protein | Membrane |
| MHO_2630 | <i>tyrS</i> | Synthetase, tyrosyl-tRNA synthetase | Cytoplasmic |
| MHO_2670 | <i>rpoC</i> | DNA-directed RNA polymerase beta' chain | Cytoplasmic |
| MHO_2680 | <i>rpoB</i> | DNA-dependent RNA polymerase subunit beta | Cytoplasmic |
| MHO_2700 | <i>rplJ</i> | 50S ribosomal protein L10 | Cytoplasmic |
| MHO_2790 | <i>secY</i> | Preprotein translocase <i>secY</i> subunit | Membrane |
| MHO_2860 | <i>rplE</i> | 50S ribosomal protein L5 | Cytoplasmic |
| MHO_2930 | <i>rplV</i> | 50S ribosomal protein L22 | Cytoplasmic |
| MHO_2980 | <i>rplC</i> | 50S ribosomal protein L3 | Cytoplasmic |
| MHO_3010 | - | Phosphoketolase | Unknown |
| MHO_3040 | <i>lspA</i> | Lipoprotein signal peptidase | Membrane |
| MHO_3080 | - | Hypothetical protein | Membrane |
| MHO_3120 | <i>atpD</i> | ATP synthase beta chain | Cytoplasmic |
| MHO_3130 | <i>atpA</i> | ATP synthase subunit alpha | Cytoplasmic |
| MHO_3140 | - | Conserved hypothetical protein | Membrane |
| MHO_3180 | - | Conserved hypothetical protein | Membrane |
| MHO_3190 | - | Conserved hypothetical protein | Membrane |
| MHO_3310 | - | Conserved hypothetical protein, putative COFfamily HAD hydrolase | Cytoplasmic |
| MHO_3370 | - | Hypothetical protein | Membrane |
| MHO_3380 | - | Conserved hypothetical protein, putative metallo-beta-lactamase | Unknown |
| MHO_3410 | <i>lgt</i> | Prolipoprotein diacylglyceryl transferase | Membrane |
| MHO_3500 | - | Membrane protein P80 | Membrane |
| MHO_3530 | - | ABC transporter permease protein | Membrane |
| MHO_3550 | <i>prs</i> | Ribose-phosphate pyrophosphokinase | Cytoplasmic |
| MHO_3560 | <i>mtgA</i> | Cation-transporting P-ATPase | Membrane |
| MHO_3680 | <i>apt</i> | Adenine phosphoribosyl transferase | Cytoplasmic |
| MHO_3700 | - | Hypothetical protein | Membrane |
| MHO_3710 | - | Hypothetical protein | Membrane |
| MHO_3730* | - | Lmp-related protein | Membrane |
| MHO_3740 | - | Conserved hypothetical protein | Membrane |
| MHO_3750 | - | Conserved hypothetical protein | Membrane |
| MHO_3800 | <i>P120'</i> | P120' protein | Membrane |
| MHO_3820 | <i>md2</i> | ABC transporter ATP binding protein | Membrane |
| MHO_3830 | <i>md1</i> | ABC transporter ATP binding protein | Membrane |

| Mnemonic | Gene name | Product | Localization |
|-----------|-------------|--|--------------|
| MHO_3900 | - | Conserved hypothetical protein, putative transmembrane protein | Membrane |
| MHO_3930 | - | Conserved hypothetical protein, putative DHHfamily phosphoesterase | Membrane |
| MHO_3940 | <i>engB</i> | Probable GTP-binding protein engB | Membrane |
| MHO_4140 | - | Conserved hypothetical protein, putative COFfamily HAD hydrolase | Cytoplasmic |
| MHO_4230 | <i>ftsH</i> | Cell division protein ftsH | Membrane |
| MHO_4280* | - | Lmp-related protein | Membrane |
| MHO_4440 | - | Conserved hypothetical protein | Membrane |
| MHO_4450 | <i>potA</i> | Spermidine/putrescine ABC transporter ATP-binding pro | Membrane |
| MHO_4460 | <i>potB</i> | Spermidine/putrescine ABC transporter permease protein potB | Membrane |
| MHO_4480 | - | Conserved hypothetical protein | Membrane |
| MHO_4500 | - | Glycosyltransferase | Unknown |
| MHO_4530 | - | Hypothetical protein | Membrane |
| MHO_4580 | - | Hypothetical protein | Membrane |
| MHO_4640 | - | Hypothetical protein | Membrane |
| MHO_4680 | <i>plsX</i> | Fatty acid/phospholipid synthesis protein | Cytoplasmic |
| MHO_4920 | - | Lmp-related protein | Membrane |
| MHO_4950 | - | Conserved hypothetical protein | Membrane |
| MHO_5000 | <i>rspB</i> | 30S ribosomal protein S2 | Cytoplasmic |
| MHO_5010 | <i>tsf</i> | Elongation factor Ts | Cytoplasmic |
| MHO_5040 | - | Conserved hypothetical protein, putative amino acid permease | Membrane |
| MHO_5050 | - | Pseudogene of cation-transporting P-type ATPase (N-terminal part) | Membrane |
| MHO_5060 | - | Pseudogene of cation-transporting P-type ATPase (C-terminal part) | Membrane |
| MHO_5150 | <i>gap</i> | Glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase | Cytoplasmic |
| MHO_5170 | - | Hypothetical protein | Unknown |
| MHO_5180 | - | Conserved hypothetical protein | Membrane |
| MHO_5310 | - | Conserved hypothetical protein, putative MgPA-like protein | Cytoplasmic |
| MHO_5320 | - | Conserved hypothetical protein, putative MgPA-like protein | Cytoplasmic |
| MHO_5330 | - | Hypothetical protein | Membrane |

Subcellular localization was performed using PSORTdb 2.0 (<http://db.psort.org>) and TMHMM Server v. 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>). * Eventually considered as lipoproteins after this study.

CHAPITRE 2

CHAPITRE 2. ETUDE DE L'INTERACTION DE MYCOPLASMA HOMINIS PG21 AVEC LES CELLULES DENDRITIQUES HUMAINES : FRACTION BIOACTIVE DU MYCOPLASME ET REponse IMMUNITAIRE INNEE DE LA CELLULE

Julien Goret, Laure Béven, Benjamin Faustin, Cécile Contin-Bordes, Chloé Le Roy, Hélène Renaudin, Cécile Bébéar, Sabine Pereyre

Article en préparation pour une soumission dans *Frontiers in Microbiology*

CONTEXTE

Dans le premier chapitre, nous avons évalué la réponse de *M. hominis* PG21 lors de son interaction avec les cellules dendritiques humaines (hDCs). Nous avons déterminé que 21 gènes codant pour des lipoprotéines étaient surexprimés lors de cette interaction. Dans cette deuxième étude, nous avons continué à étudier l'interaction entre *M. hominis* PG21 et les hDCs en nous plaçant à la fois du côté du mycoplasme et de la cellule hôte. Ainsi, nous avons d'une part cherché à déterminer quelles sont les lipoprotéines de *M. hominis* PG21 qui stimulent les hDCs et entraînent une sécrétion d'IL-23, et d'autre part étudié la réponse immunitaire innée des hDCs après interaction avec le mycoplasme.

Dans un premier temps, nous avons cherché à enrichir en lipoprotéines bioactives une fraction des vésicules membranaires du mycoplasme par un procédé original de double extraction. Celui-ci reposait sur l'utilisation d'un premier détergent non dénaturant, le N-lauroylsarcosine de sodium ou Sarkosyl, suivie d'une extraction par le Triton X-114. Les lipoprotéines ont été ensuite séparées par SDS-PAGE. Après identification des sous-fractions immunomodulatrices, leur composition en lipoprotéines a été déterminée par chromatographie liquide couplée à une analyse en spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS). Nous avons déterminé que 20 lipoprotéines étaient potentiellement activatrices des cellules dendritiques. Elles étaient réparties en deux groupes de poids moléculaire distincts, un premier groupe de lipoprotéines de masse moléculaire apparente (MMap) de 40 à 100 kDa et un deuxième groupe de MMap de 20 à 35 kDa. La lipoprotéine MHO_4720 pourrait à elle seule expliquer l'activité immunomodulatrice du second groupe. *M. hominis* n'étant à ce jour pas transformable, nous ne pouvons confirmer l'activité de ces lipoprotéines par mutagénèse dirigée. Nous avons donc synthétisé un lipopeptide dérivé de MHO_4720, Pam₂-CGGEKFN, afin d'en étudier l'activité sur les cellules dendritiques. Ce peptide s'est montré capable d'induire une production d'IL-23 dose dépendante par les hDCs.

Dans un deuxième temps, la réponse immunitaire innée des hDCs a été évaluée. Nous avons montré que *M. hominis* PG21 induisait une forte production d'IL-1 β , suggérant l'activation d'inflammasomes. Cette production était significativement diminuée par l'utilisation de YVAD-fmk, inhibiteur des caspases 1 et 5. L'exploration des voies de l'inflammasome a été entreprise par une méthode de PCR array. La comparaison de la transcription des gènes impliqués dans les voies de l'inflammasome chez les hDCs co-incubées 24 h en absence et en présence de *M. hominis* PG21 a confirmé la surexpression des gènes codant pour l'IL-1 β , l'IL-6 et l'IL-12 β , sous-unité commune à l'IL-12 et l'IL-23. Les

gènes codant pour le NF- κ B et la caspase 5 étaient surexprimés mais pas celui codant pour la caspase 1. Une inhibition de l'expression des gènes codant pour NLRP3 et la protéine adaptatrice ASC et une surexpression des gènes codant pour la cyclo-oxygénase COX-2 et des chemokines a été observées. Ces données suggèrent l'activation d'un inflammasome dépendant de la caspase 5 dont le récepteur reste à identifier ainsi qu'un possible contrôle de l'inflammation lors de la co-incubation des hDCs avec *M. hominis* PG21 pendant 24 heures.

Etude de l'interaction de *Mycoplasma hominis* PG21 avec les cellules dendritiques humaines : fraction bioactive du mycoplasme et réponse immunitaire innée de la cellule

Interaction of *Mycoplasma hominis* PG21 with human dendritic cells: bioactive fraction of the mycoplasma and innate immune response of the cells

J. Goret^{1,2,3}, L. Béven^{4,5}, B. Faustin⁶, C. Contin-Bordes^{6,7}, C. Le Roy^{1,2}, H. Renaudin^{1,3}, C. Bébéar^{1,2,3}, S. Pereyre^{1,2,3,#}

¹ Université de Bordeaux, USC EA 3671 Mycoplasmal and chlamydial infections in humans, Bordeaux, France.

² INRA, USC EA 3671 Mycoplasmal and chlamydial infections in humans, Bordeaux, France.

³ Laboratoire de Bactériologie, Centre Hospitalier Universitaire de Bordeaux, Bordeaux, France.

⁴ INRA, UMR 1332, Biologie du Fruit et Pathologie, Villenave d'Ornon, France.

⁵ Université de Bordeaux, UMR 1332, Biologie du Fruit et Pathologie, Bordeaux, France.

⁶ Université de Bordeaux, CIRID, UMR/CNRS 5164, Bordeaux, France

⁷ Laboratoire d'Immunologie, Centre Hospitalier Universitaire de Bordeaux, Bordeaux, France.

Corresponding authors:

Sabine Pereyre: USC EA3671 Infections Humaines à Mycoplasmes et Chlamydiae, Université de Bordeaux, 146 rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux, France. E-mail: sabine.pereyre@u-bordeaux.fr. Phone number: + 33 5 57 57 16 25. Fax number: +33 56 93 29 40.

Running title: Interaction of *Mycoplasma hominis* PG21 with human dendritic cells

Keywords: *Mycoplasma hominis*, dendritic cells, lipoproteins, lipopeptide, DSL-1, inflammasome, PCR array, caspase, IL-1 β

RESUME

M. hominis est un mycoplasme humain responsable d'infection uro-génitale notamment chez la femme, d'infection pendant la grossesse et d'infection du nouveau-né. Cette bactérie dépourvue de paroi expose sa membrane plasmique directement au milieu extérieur. Les lipoprotéines qui y sont ancrées participent à l'interaction avec les cellules de l'hôte et possèdent une activité immunomodulatrice et inflammatoire. En raison de leur caractère amphiphile, il est possible de les extraire par des détergents non dénaturants. La fraction stimulatrice des cellules dendritiques humaines (hDCs) de *M. hominis* PG21 induisant une production d'IL-23 correspond à la fraction membranaire extraite au Triton-X114 (TX-114).

Pour enrichir cette phase triton en lipoprotéines, les vésicules membranaires du mycoplasme ont été soumises à un procédé de double extraction reposant sur l'utilisation d'un premier détergent non dénaturant, le Sarkosyl, suivie d'une extraction par le TX-114. Les lipoprotéines potentiellement bioactives ont ensuite été identifiées en spectrométrie de masse. Nous avons ainsi mis en évidence 20 lipoprotéines potentiellement capables de stimuler les hDCs et d'induire une production d'IL-23. Elles étaient réparties en deux groupes de poids moléculaire distincts, un de masse moléculaire apparente (MMap) de 40 à 100 kDa et un deuxième de MMap de 20 à 35 kDa. Nous avons montré que la fraction protéique de ces lipoprotéines n'était qu'en partie responsable de l'immunomodulation. Un lipopeptide bioactif, appelé DSL-1 et correspondant à la fraction N-terminale de la lipoprotéine MHO_4720 pouvant à elle seule expliquer l'activité immunomodulatrice du second groupe, a la capacité de stimuler de façon dose-dépendante la production d'IL-23 par les hDCs.

Nous avons également caractérisé la réponse immunitaire innée des hDCs en observant l'activation d'inflammasome(s) par la mise en évidence de la production d'IL-1 β dépendant de la caspase 5. L'analyse par PCR array des voies de signalisation impliquées a montré une inhibition de l'expression de NLRP3 et de la protéine adaptatrice ASC et une augmentation de l'expression de COX-2 et des chemokines suggérant une régulation à la baisse de l'inflammation induite après 24 h de co-incubation des hDCs avec *M. hominis* PG21.

INTRODUCTION

Les mycoplasmes constituent les plus petits procaryotes capables de se multiplier de façon autonome. La caractéristique principale des mycoplasmes est l'absence de paroi et de peptidoglycane. De ce fait, leur membrane plasmique, directement exposée au milieu extérieur, constitue l'interface d'interaction avec les cellules de l'hôte. Les protéines et notamment les lipoprotéines ancrées dans cette membrane participent à l'adhésion, l'invasion, la survie intracellulaire et sont reconnues par le système immunitaire (Browning *et al.*, 2011). Les lipoprotéines membranaires des mycoplasmes, tout comme le lipopolysaccharide (LPS) des bactéries à Gram négatif, ont une activité immunomodulatrice et inflammatoire. Elles ont le pouvoir d'activer des cellules macrophagiques ou dendritiques humaines, d'induire la production de cytokines, d'activer le facteur nucléaire NF- κ B et de polariser le système immunitaire adaptatif (Cole *et al.*, 2005, He *et al.*, 2009, Peltier *et al.*, 2005, Shimizu *et al.*, 2007, Shimizu *et al.*, 2008a, Shimizu *et al.*, 2008b, Truchetet *et al.*, 2011). Il est possible d'extraire ces lipoprotéines de membrane pour étudier leur effet immunomodulateur. En effet, une extraction de vésicules membranaires de mycoplasmes avec des détergents non-dénaturants comme le Triton X-114 (TX-114) permet de séparer les lipoprotéines amphiphiles des autres constituants membranaires. Cette méthodologie a été mise en œuvre pour l'étude du potentiel immunomodulateur de lipoprotéines d'origine mycoplasmaïque (Cole *et al.*, 2005, Muhlradt *et al.*, 1997) chez *Mycoplasma arthritidis* (Cole *et al.*, 2005), *M. fermentans* (Liu *et al.*, 2012), *Ureaplasma parvum* (Shimizu *et al.*, 2008b) ou *M. genitalium* (He *et al.*, 2009, Shimizu *et al.*, 2008a). Ainsi, Cole *et al.* (Cole *et al.*, 2005) ont partiellement isolé et purifié chez *M. arthritidis*, trois facteurs stimulant les macrophages et les cellules dendritiques murines. Chez *U. parvum*, trois lipoprotéines ont pu être identifiées comme participant à l'activité immunomodulatrice de l'extrait TX-114 (Shimizu *et al.*, 2008b), de même, chez *M. genitalium*, une lipoprotéine triacylée a été montrée immunoactive (Shimizu *et al.*, 2008a). Plus récemment, dans la fraction immunomodulatrice extraite chez *M. fermentans* par le TX-114, 21 lipoprotéines ont pu être identifiées par spectrométrie de masse (Liu *et al.*, 2012). L'étude de l'effet immunomodulateur des lipoprotéines repose également sur l'analyse des effets de lipopeptides synthétiques dérivés des lipoprotéines comme cela a été décrit pour le lipopeptide MALP-2 chez *M. fermentans* (Muhlradt *et al.*, 1997), FSL-1 de *M. salivarium* (Shibata *et al.*, 2000) ou MPPL-1 de *M. pneumoniae* (Into *et al.*, 2007).

M. hominis est un mycoplasme humain retrouvé à l'état commensal dans le tractus urogénital de l'homme et de la femme. Cette bactérie opportuniste peut être responsable d'infections du tractus urogénital, principalement chez la femme, d'infections néonatales ou d'infections disséminées notamment chez les patients immunodéprimés (Pereyre & Bébéar, 2012). Nous avons précédemment montré que la fraction stimulatrice des cellules dendritiques humaines (hDCs) de *M. hominis* PG21 correspond à la fraction membranaire extraite au TX-114 (Truchetet *et al.*, 2011). Par cette méthodologie d'extraction au TX-114, Peltier *et al.* (Peltier *et al.*, 2005) ont mis en évidence chez la souche *M. hominis* ATCC 33159, la présence d'un facteur membranaire de stimulation des cellules humaines de lignée monocyttaire THP-1 et l'ont partiellement purifié et caractérisé. Ce facteur de 29 kDa, appelé MSA pour *Macrophage Stimulating Activity*, n'a pas été identifié. Plus récemment, Hasebe *et al.* (Hasebe *et al.*, 2014) ont isolé et purifié une lipoprotéine de 40 kDa, P50t, à partir de l'extraction des membranes de *M. hominis* H29 par un autre détergent, l'octyl glucoside (OG). Cette lipoprotéine correspondant à une forme tronquée de la lipoprotéine Vaa, une adhésine variable, a conservé ses propriétés d'adhésion et induit la production de TNF- α par des cellules THP-1. Les facteurs MSA et la lipoprotéine P50t constituent ainsi des facteurs de stimulation des cellules THP-1 mais l'identification de toutes les lipoprotéines stimulant les hDCs n'a pas été décrite. De plus, les résultats décrits par Peltier *et al.* (Peltier *et al.*, 2005) ne reflètent probablement pas la complexité de la composition de la membrane de *M. hominis* PG21 qui comporte 48 gènes codant pour des lipoprotéines dans un petit génome composé uniquement de 537 CDS (Pereyre *et al.*, 2009).

Les lipoprotéines ainsi que d'autres constituants de surface des agents pathogènes comme les oligoglycanes, l'acide lipotéichoïque des bactéries à Gram positif et le LPS des bactéries à Gram négatif constituent des PAMPs (Pathogen Associated Molecular Pattern) reconnus par les récepteurs PRR (Pattern-Recognition receptors). Parmi ces PRR, les récepteurs membranaires extracellulaires Toll-like (TLR) participent à la reconnaissance des micro-organismes pathogènes et induisent la stimulation des cellules du système immunitaire inné. Il a été montré que la fraction membranaire de *M. hominis* PG21 extraite au TX-114 entraîne la maturation des hDCs via le TLR2 et la sécrétion de cytokines avec un rapport IL-23/IL-12 très en faveur de l'IL-23 (Truchetet *et al.*, 2011). L'étude complète du profil cytokinique induit lors de la stimulation des hDCs par *M. hominis* PG21 n'a pas été réalisée. De façon concomitante à la stimulation de TLR, un autre groupe de PRR incluant les récepteurs cytosoliques NOD-like (NLR) détectent les PAMPs et activent les voies de l'inflammasome. Un inflammasome est un complexe protéique oligomérique qui contrôle l'activation des caspases inflammatoires (caspase 1, caspase 4 et caspase 5) et induit la

maturation par protéolyse des cytokines inflammatoires IL-1 β et IL-18 et la mort cellulaire inflammatoire appelée pyroptose. Shimizu *et al.* (Shimizu *et al.*, 2011) ont publié la première étude suggérant que les mycoplasmes activent les voies de l'inflammasome. Ces auteurs ont décrit que *M. pneumoniae* M129 cyto-adhérent aux cellules THP-1 induisait une forte production de d'IL-1 β en comparaison à des mutants non-adhérents. Bose *et al.* (Bose *et al.*, 2014) ont montré que la toxine CARDS (Community-Acquired Respiratory Distress Syndrome) de *M. pneumoniae* activait l'inflammasome NLRP3 chez des cellules macrophagiques murines. Sugiyama *et al.* (Sugiyama *et al.*, 2015) ont montré que *M. salivarium*, vivant ou inactivé par la chaleur, pouvait induire la production d'IL-1 β et la pyroptose chez des cellules dendritiques XS106 murines par l'activation de NLRP3 et de la caspase 1. La capacité d'induction d'IL-1 β par *M. salivarium* chez des cellules humaines THP-1 a été aussi rapportée dans cette étude mais les voies de l'inflammasome n'ont pas été explorées. Xu *et al.* (Xu *et al.*, 2013) ont montré que *M. hyorhinis* vivant, traité à la chaleur ou aux ultra-violets induisait la production d'IL-1 β et d'IL-18 chez des cellules THP-1 par l'activation de l'inflammasome NLRP3 avec implication du TLR2. Une induction dose-dépendante d'IL-1 β a également été observée par addition d'un extrait membranaire TX-114 de *M. hyorhinis* sur les cellules THP-1 via l'activation du NLRP3. Ces auteurs ont également montré que l'ADN du mycoplasme pouvait activer AIM2 mais cette activation n'était que partiellement responsable de la production d'IL-1 β . Enfin, Khare *et al.* (Khare *et al.*, 2012) ont décrit l'activation de l'inflammasome NLRP7 chez des macrophages humains (THP-1 et MF) par *Acholesplasma laidlawii*, membre de la famille des mollicutes, par des lipopeptides dérivés des mycoplasmes, FSL-1 de *M. salivarium* et MALP-2 de *M. fermentans*, et par des lipopeptides synthétiques Pam₂CSK4 et Pam₃CSK4. NLRP7 recrutait l'adaptateur ASC pour promouvoir l'activation de la caspase 1 et la maturation d'IL-1 β et d'IL-18. Par l'utilisation d'ARN interférents pour les NLR, ces auteurs ont montré que NLRP7 et NLRP3 détectaient *A. laidlawii* entier mais que seul NLRP7 pouvait détecter les lipopeptides. Une liaison au TLR2 était indispensable pour induire la transcription de la pro-IL-1 β et de la pro-IL-18 via le NF- κ B.

Dans cette étude, nous avons étudié l'interaction entre *M. hominis* PG21 et les hDCs en nous plaçant d'abord du côté du mycoplasme puis du côté de la cellule hôte. Ainsi, nous avons d'une part cherché à identifier et caractériser la fraction bioactive de *M. hominis* PG21 qui stimule les hDCs et entraîne une sécrétion d'IL-23. Pour cela, nous avons cherché à enrichir une fraction membranaire en lipoprotéines bioactives en utilisant une méthode originale de double extraction qui repose sur l'utilisation d'un premier détergent non

dénaturant suivie de celle du TX-114. Après fractionnement électrophorétique des extraits obtenus, nous avons recherché quelle sont la (les) lipoprotéine(s) de *M. hominis* PG21 qui active(nt) les hDCs par chromatographie liquide et spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS). Du côté de la cellule hôte, nous avons étudié la réponse immunitaire innée des hDCs après 24 h d'interaction avec le mycoplasme. Par PCR array, nous avons évalué si les voies de l'inflammasome étaient activées lors de l'interaction de *M. hominis* PG21 avec les hDCs.

MATERIELS ET METHODES

Culture de *Mycoplasma hominis* PG21 et préparation des vésicules membranaires

La souche de référence *M. hominis* PG21 (ATCC 23114) a été cultivée à 37°C dans du milieu liquide Hayflick supplémenté en arginine à pH 7-7,2 (Waites *et al.*, 2001). Les tests de co-incubation avec les cellules dendritiques ont été réalisés selon les conditions définies précédemment (Truchetet *et al.*, 2011). La numération bactérienne a été réalisée en unités de changement de couleur (UCC)/mL. La préparation des vésicules membranaires a été réalisée comme décrit précédemment (Truchetet *et al.*, 2011). La concentration en protéines a été déterminée à l'aide du kit DC Protein Assay (Biorad, Hercules, Californie, Etats-Unis) et des aliquots à 10 mg/mL ont été conservés à -80°C.

Extraction des lipoprotéines membranaires

Les détergents utilisés étaient le 3-[(3-Cholamidopropyl)diméthylammonio]-1-propanesulfonate (CHAPS) (Thermo Fisher Scientific, San Jose, Californie, Etats-Unis) à 50 nM, l'octyl glucopyranoside (OG) à 75 nM (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Missouri, États-Unis), le désoxycholate de sodium (DOC) à 50 nM (Sigma-Aldrich), le triton X-100 (TX-100) (Sigma-Aldrich) à 1%, le N-Lauroylsarcosine de sodium (Sarkosyl) (Sigma-Aldrich) à 100 nM et le Triton X-114 à 1% (Sigma-Aldrich). Pour les extractions simples, 100 µL de fraction membranaire ont été additionnés de 250 µL de détergent et 150 µL de tampon phosphate de sodium 0,1 M pH 7,4. Les tubes ont été placés 1 heure à 4°C sous agitation douce, puis centrifugés 15 min à 285 000 g à 4°C. Le culot correspondait aux protéines non extraites par le détergent et le surnageant aux protéines extraites. L'extraction au TX-114 à 1% a été réalisée comme décrit précédemment (Truchetet *et al.*, 2011) générant une phase aqueuse et une phase détergent. Les protéines ont été concentrées par précipitation par 9 volumes d'acétone glacée puis lavées deux fois par de l'acétone glacée. Après élimination de l'acétone, les protéines ont été analysées par SDS-PAGE et soumises aux tests de co-incubation avec les cellules dendritiques. Les extractions doubles correspondaient au traitement des protéines extraites et non extraites par les différents détergents (CHAPS, OG, DOC, TX-100 et Sarkosyl) par le TX-114 dans les mêmes conditions que pour une extraction simple. La concentration en protéines a été déterminée à l'aide du kit DC Protein Assay (Biorad, Hercules, Californie, Etats-Unis) .

Analyses des profils électrophorétiques par SDS-PAGE et élution des protéines à partir des gels de polyacrylamide

Les fractions enrichies en lipoprotéines à l'issue des extractions doubles ont été analysées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide 12,5 % (v/v) (Biosolve, Paris, France) en conditions dénaturantes et en système discontinu de Laemmli (Laemmli, 1970). Chaque culot d'extrait protéique a été repris dans du tampon de Laemmli 2X (Tris-HCl-pH 6,8 100 mM, β -mercaptoéthanol 10%, SDS 4%, bleu de bromophénol 0,2%, glycérol 20%) et a été incubé à température ambiante pendant 20 min puis placé au bain-marie à 100°C pendant 3 min. La migration (système monodimensionnel Hoeffer - GE Healthcare) a été effectuée pendant une nuit à 50V. Le gel a été coloré au nitrate d'argent à l'aide du kit ProteoSilver Silver Stain Kit (Sigma-Aldrich), permettant une coloration des protéines compatible avec une analyse en spectrométrie de masse.

La caractérisation de la fraction bioactive du double extrait Sarkosyl/TX-114 a été réalisée par découpage d'un gel SDS-PAGE 10% d'acrylamide/bis-acrylamide en 10 bandes de dimensions identiques. Une piste de référence correspondant au culot de double extraction a été colorée au nitrate d'argent et a été conservée en tampon de fixation (50 mL d'éthanol, 10 mL d'acide acétique 100%, qsp 100 mL d'eau). Les bandes découpées dans la piste non colorée ont été éluées par de l'OG à 50 mM pendant 30 min à 100°C. Les protéines éluées ont été précipitées par addition de 2,5 volumes d'acétone glacée puis lavées deux fois par l'acétone glacée. Les culots séchés correspondant aux protéines éluées ont été repris dans 50 μ L de tampon phosphate de sodium 0,1 M pH 7,4 et ont été testés en co-incubation avec les hDCs. Les bandes d'intérêt correspondantes sur la piste de référence ont ensuite été découpées et analysées en spectrométrie de masse LC-MS/MS pour identifier les lipoprotéines correspondantes.

Sensibilité à la protéinase K

L'extrait double TX (constitué de la phase détergent des protéines non extraites par le Sarkosyl et traitées par le TX-114) a été incubé avec 0,4 U de protéinase K couplée à de l'Eupergit (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Missouri, États-Unis) pendant 1 heure à 37°C sous agitation douce. L'enzyme insoluble a été éliminée par centrifugation à 800 g pendant 5 min à température ambiante. La bioactivité du double extrait digéré a été testée sur les hDCs. Deux contrôles correspondant à un double extrait double non digéré et à la protéinase K seule en absence d'extrait protéique ont été traités de manière identique. Cette expérience a été réalisée trois fois.

Dessin du lipopeptide Dendritic Stimulating Lipopeptide 1 (DSL-1)

Les analyses *in silico* de l'extrémité N-terminale des lipoprotéines potentiellement immunomodulatrices contenues dans les éluats E3-E5 et E7-E8 ont été réalisées grâce au logiciel Molligen 3.0 (<http://www.cbib.u-bordeaux2.fr/outils/molligen/>) (Barre *et al.*, 2004). La recherche d'une séquence peptidique consensus a été réalisée par l'utilisation du logiciel ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/a>). La détermination de l'hydrophobicité du fragment peptidique (score GRAVY) a été effectuée à l'aide du logiciel ProtParam (<http://web.expasy.org/cgi-bin/protparam/protparam>). FSL-1 et Pam₂-CGGEKFN ont été synthétisés par EMC microcollections GmbH (Tübingen, Germany). DSL-1 était mis en suspension dans du PBS 1X à une concentration de 1 mg/ml.

Génération des cellules dendritiques et stimulation par *M. hominis* PG21 et par les extraits membranaires

Les cellules dendritiques de type myéloïde ont été générées à partir de sang total prélevé dans le cadre de saignées thérapeutiques de patients atteints d'hémochromatose comme décrit précédemment (Truchetet *et al.*, 2011). Après 5 jours de culture, la détection des mycoplasmes potentiellement contaminants a été effectuée par une PCR maison ciblant l'ARNr 16S (van Kuppeveld *et al.*, 1992) et par culture sur cellules VERO et coloration de l'ADN des mycoplasmes avec le kit Mycoplasma Stain Kit (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Missouri, États-Unis) selon la méthode de Hoechst (Chen, 1977). Les co-incubations des cellules dendritiques avec *M. hominis* entier, les fractions membranaires, ou DSL-1 étaient réalisées à 37°C sous 5% de CO₂ pendant 24 h.

Pour la détermination du caractère bioactif des extraits membranaires et du lipopeptide DSL-1, les cellules ont été disposées en plaque 96 puits à une concentration de 5x10⁵ cellules par puits avec les fractions extraites à une concentration finale en protéines de 20 µg/mL ou avec DSL-1 de 0,01 à 10 000 nM selon une série de dilution de raison 10. Les doubles extraits, dont les concentrations en protéines sont inférieures à 20 µg/mL, ont été testés sans ajustement de leur concentration.

La mesure de la production d'IL-23, d'IL-1β ou d'IL-18 a été effectuée par technique ELISA grâce à des kits commerciaux, Human ELISA Ready-Set-Go (eBiosciences, Paris, France) sur les surnageants de co-culture qui ont été collectés par centrifugation à 500 g pendant 5 min à température ambiante. La viabilité des cellules a été contrôlée par coloration au bleu Trypan. La détermination du ratio cellules vivantes/cellules mortes a été réalisée par visualisation au microscope optique à l'aide de cellules de Malassez (KovacSilde) à l'objectif 40.

Pour l'analyse de l'expression différentielle des gènes des hDCs, celles-ci ont été transférées dans des plaques à 6 puits à une concentration de 5x10⁵ cellules par puits. Une

suspension de *M. hominis* à 10^8 UCC/ml pour une MOI de 50 a été ajoutée dans le milieu de culture des hDCs. Un contrôle ne comportant que les hDCs sans contact avec la bactérie a été réalisé. Pour la détermination de la production d'IL-1 β et d'IL-18, *M. hominis* entier a été incubé avec les hDCs en plaque 96 puits dans les mêmes conditions. L'inhibiteur de caspase YVAD-fmk a été utilisé à une concentration de 40 nM pendant 30 min avant l'infection des hDCs par *M. hominis*.

Spectrométrie de masse

Les bandes d'intérêt de la piste de référence obtenues par SDS-PAGE ont été envoyées au Centre de Génomique Fonctionnelle de Bordeaux pour analyse par spectrométrie de masse LC-MS/MS. Les peptides ont été extraits du gel et analysés par un système Ultimate 3000 nanoLC (Dionex, Amsterdam, Pays-Bas) couplé à un spectromètre de masse Electrospray LTQ-Orbitrap XL (Thermo Fisher Scientific, San Jose, Californie, Etats-Unis). Les données ont été analysées par SEQUEST grâce au logiciel Proteome Discoverer 1.4 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, États-Unis) en comparaison à une base de données maison de *M. hominis* PG21. Les spectres des peptides de masse supérieure à 5000 Dalton (Da) ou inférieure à 350 Da ont été rejetés. Les paramètres d'analyses étaient les suivants : précision de la masse du peptide précurseur monoisotopique fixée à 10 parties par millions et tolérance des fragments peptidiques fixées à 0,6 Da. Seuls les ions b et y ont été considérés pour le calcul de la masse. L'oxydation des méthionines (+16 Da) a été considérée comme une modification variable. L'absence de clivage par la trypsine au niveau de deux sites a été autorisée. Seuls les peptides correspondant à un taux de faux positifs inférieur à 1% ont été retenus. Cette analyse a été réalisée deux fois.

Extraction des ARN des cellules dendritiques, transcription inverse et PCR array

Les hDCs incubées ou non avec *M. hominis* PG21 ont été récupérées par centrifugation à 2500 g pendant 15 min et ont été lavées une fois avec du RPMI 1640 (Invitrogen, Carlsbad, Californie, Etats-Unis). Le culot a été lysé par l'addition de 600 μ l de tampon RLT (Qiagen, Venlo, Pays-Bas) avec du β -mercaptoéthanol et homogénéisé par passage dans une seringue de 20 gauge. L'ARN total a été isolé avec le kit RNeasy Plus Mini (Qiagen, Venlo, Pays-Bas) selon les instructions du fournisseur. Un traitement à la DNase a été réalisé à 37°C pendant 30 min avec la DNase RNase-free (Qiagen, Venlo, Pays-Bas) directement sur la colonne d'extraction. La concentration en ARN a été

déterminée par spectrophotométrie avec un NanoDrop 800 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, États-Unis). Une quantité de 1 µg d'ARN total a été immédiatement transcrite en ADN en utilisant le kit de transcription inverse (TI) RT² First Strand Kit (Qiagen, Venlo, Pays-Bas) selon les instructions du fournisseur. L'absence d'ADN génomique contaminant, d'inhibiteurs de TI ou d'inhibiteurs d'amplification a été contrôlée par l'utilisation du kit RT² RNA QC PCR Array.

Deux types de plaques de PCR array commerciales ont été utilisés : la plaque Human Inflammatory Response & Autoimmunity PCR Array (Qiagen, Venlo, Pays-Bas) et Human Inflammasomes PCR Array (Qiagen). L'amplification en temps réel a été réalisée sur LightCycler 480 (Roche) pour un volume final de 25 µl avec 1 µl d'ADN et 12,5 µl de RT² SybrGreen qPCR Mastermix (Qiagen). Les conditions d'amplification étaient les suivantes : 10 min à 95°C suivi de 45 cycles de 15 s à 95°C et 1 min à 60°C. Une courbe de fusion a été systématiquement générée pour s'assurer de la spécificité de l'amplification. Les cycles seuil (Ct pour cycle treshold) ont été déterminés pour chaque gène à partir de la dérivé seconde de la courbe d'amplification. La limite de détection était de 35 Ct selon les recommandations du fournisseur. Les ratios d'expression des gènes des cellules dendritiques ont été calculés grâce au logiciel Profiler™ PCR Array RT² Data Analysis v3.5 software (Qiagen, Venlo, Pays-Bas) (<http://pcrdataanalysis.sabiosciences.com/pcr/arrayanalysis.php>), qui considère le niveau d'expression de chaque gène par rapport à un groupe de cinq gènes de référence (β -actine, β -2-microglobulin, glycéraldehyde-3-phosphate déshydrogénase, hypoxanthine phosphoribosyltransférase 1 et protéine ribosomale P0) selon la méthode de la quantification relative ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) (Livak & Schmittgen, 2001). La plaque comportait plusieurs contrôles notamment la détection de l'ADN génomique, un témoin de transcription inverse et un témoin d'amplification.

Statistiques

Les valeurs de p ont été calculées par des tests Anova pour les ELISA. Pour les PCR arrays, les valeurs de p ont été calculées par un test de Student comparant les valeurs de ΔCt obtenues indépendamment pour chaque gène entre le test (cellules dendritiques avec *M. hominis*) et le contrôle (cellules dendritiques sans *M. hominis*). Une valeur de p inférieure à 0,05 était considérée comme significative.

RESULTATS

Activité immunomodulatrice d'un double extrait Sarkosyl/TX-114 de vésicules membranaires

L'analyse SDS-PAGE d'un extrait TX-114 obtenu à partir des vésicules membranaires de *M. hominis* montre que cette fraction TX est composée de très nombreuses protéines (Figure 1). Afin d'obtenir une fraction enrichie en lipoprotéines d'intérêt (*i.e.* responsables de l'activité immunomodulatrice), les vésicules membranaires ont été soumises à une double extraction. La stratégie mise en place visait en l'obtention d'une fraction non extraite par le premier détergent enrichie en lipoprotéines d'intérêt et débarrassée d'un nombre significatif de protéines ne participant pas à la bioactivité. Cette fraction pouvait ensuite être soumise ensuite à l'extraction par le TX-114, un enrichissement en lipoprotéines d'intérêt étant espéré dans la fraction extraite par le TX-114. Cinq détergents non dénaturants ayant des propriétés d'extraction et des sélectivités différentes vis-à-vis des protéines membranaires ont été testés : le Sarkosyl, l'OG, le CHAPS, le DOC et le TX-100.

Après extraction simple des vésicules membranaires par les cinq détergents, les protéines ont été réparties en deux fractions, les protéines extraites (PE) contenues dans la phase détergent et les protéines non extraites (PNE) contenues dans le culot de centrifugation. Une migration des deux fractions obtenues après extraction avec chacun des détergents a ensuite été réalisée sur gel de SDS-PAGE (Figure 1). Notre but était de sélectionner, pour la première étape d'extraction, un détergent permettant l'extraction et donc l'élimination d'un maximum de protéines non actives et la partition de la (ou les) lipoprotéine(s) bioactive(s) dans la fraction non extraite. Le profil des PE par le CHAPS présentait très peu de bandes : le CHAPS présentait une très forte sélectivité d'extraction vis à vis des protéines des vésicules membranaires. Ce détergent n'a donc pas été retenu. Le DOC et le TX-100 présentaient des profils d'extraction similaires entre eux avec un nombre de bandes dans la fraction extraite supérieur à celui du CHAPS mais potentiellement encore insuffisant. L'OG et le Sarkosyl permettaient d'extraire un plus grand nombre de protéines (Figure 1).

Une série d'extractions doubles avec une première extraction à l'aide de chacun des quatre détergents puis une seconde avec le TX-114 a été réalisée. Les profils obtenus ont été comparés au profil de l'extraction simple par le TX-114 (Vmb TX) (Figure S1). L'extraction au TX-114 des PNE par le DOC et le TX-100 a fourni des profils présentant de nombreuses bandes absentes dans l'extrait simple TX-114. Ces deux détergents n'ont donc pas été retenus. Les profils des PNE par l'OG et le Sarkosyl extraites au TX-114

présentaient peu de bandes mais de forte intensité. De plus l'extraction des PNE par le Sarkosyl présentait un enrichissement en certaines protéines membranaires qui n'était pas observé avec l'OG. Ce double extrait Sarkosyl/TX-114, appelé double TX dans la suite du manuscrit, correspond aux PNE par le Sarkosyl présentes dans la phase TX après extraction par le TX-114. Nous avons décidé de tester la bioactivité de cet extrait double TX sur les hDCs. Pour cela, nous avons réalisé un dosage ELISA de l'IL-23 dans les surnageants de co-incubation des différentes fractions de la double extraction avec les hDCs (Figure 2). Les PNE par le Sarkosyl et la phase détergent du double extrait (double TX) présentaient une production d'IL-23 équivalente à celle obtenue avec les vésicules membranaires de *M. hominis* PG21 (Figure 2). En revanche, la production d'IL-23 par les PE issue de l'extraction simple avec le Sarkosyl ne présentait pas de différence significative avec celle mesurée avec le PBS ($p < 0,05$). Ainsi, l'utilisation d'une première extraction par le Sarkosyl a permis d'éliminer un grand nombre de protéines tout en conservant dans la fraction non extraite l'ensemble des lipoprotéines bioactives.

Isolement et caractérisation de la fraction bioactive de *M. hominis* PG21

Pour isoler la fraction immunomodulatrice de *M. hominis* PG21 au sein de la fraction double TX, celle-ci a été déposée sur un gel de SDS-PAGE. La piste a ensuite été découpée en dix bandes de même dimension. Les protéines de chacune de ces dix bandes ont été éluées en présence d'OG pour obtenir dix sous-fractions ou éluats notés E1 à E10. Chaque éluat a été indépendamment incubé avec les hDCs durant 24 heures et la concentration en IL-23 a été dosée dans les surnageants de co-incubation (Figure 3). Cinq éluats E3-E4-E5 et E7-E8 avaient une concentration en IL-23 significativement différente de celles obtenues avec le PBS ou avec les éluats E2, E6 et E9. La production d'IL-23 par les cinq éluats bioactifs représentait la moitié de celle observée pour *M. hominis* PG21 entier, les vésicules membranaires ou l'extrait double TX. Les cinq éluats actifs étaient répartis en deux groupes. Les éluats E3, E4 et E5 étaient constitués de protéines de masse moléculaire apparente (MMap) comprise entre 40 et 100 kDa. Les concentrations en IL-23 pour ces trois éluats ne présentaient pas de différence significative entre elles. Les éluats E7 et E8 étaient constitués de protéines de MMap de 20 à 35 kDa. Les concentrations en IL-23 pour E7 et E8 ne présentaient pas de différence significative entre elles.

Le contenu lipoprotéique des différents éluats a été déterminé par LC-MS/MS. Le contenu lipoprotéique des éluats E2 et E6 sans activité immunomodulatrice sur les hDCs a été déterminé pour servir de référence. Nous n'avons considéré que les lipoprotéines et avons éliminé de l'identification par spectrométrie de masse les protéines membranaires qui n'étaient pas des lipoprotéines. Bien que des fragments de lipoprotéines pourraient présenter une activité immunomodulatrice, notre stratégie était davantage adaptée à

l'identification de lipoprotéines bioactives entières (non protéolysées). Pour cette raison, nous avons cherché à identifier quelles pouvaient être les lipoprotéines non fragmentées potentiellement bioactives. Nous avons considéré qu'une lipoprotéine n'était pas fragmentée lorsque la distance de migration sur gel SDS-PAGE était proche de celle attendue, calculée sur la base de son poids moléculaire prédit à partir de sa séquence. Pour l'ensemble des lipoprotéines identifiées, le nombre de peptides ayant permis l'identification était le plus important dans la région du gel attendue (Tableau 1). Ce résultat suggère que malgré la présence du groupe acyle N-terminal, les lipoprotéines identifiées lors de cette expérience n'ont pas eu de migration aberrante. Au total, 26 lipoprotéines sur les 48 répertoriées dans le génome ont été retrouvées dans l'ensemble des sept éluats E2 à E8 soit 54,2% des lipoprotéines prédites *in silico* (Tableau 1). Les lipoprotéines entières présentes dans les éluats E2 et E6 ont été éliminées (MHO_0530, MHO_1510, MHO_1640, MHO_3620 et MHO_3660).

Dans le premier groupe d'éluats (E3-E4-E5) ayant une composition complexe en lipoprotéines de haut poids moléculaire, nous avons identifié 11 lipoprotéines qui étaient présentes dans au moins deux éluats avec six lipoprotéines présentes dans les trois éluats. Cinq lipoprotéines supplémentaires étaient uniquement présentes dans un seul éluat. Les 16 lipoprotéines identifiées pourraient potentiellement induire la production d'IL-23 par les hDCs, les effets individuels pouvant s'additionner pour chaque lipoprotéine voire présenter une synergie. Un nombre moins élevé de lipoprotéines a été identifié dans les éluats E7 et E8. En plus des fragments de lipoprotéines potentiellement bioactifs, trois lipoprotéines ont été retrouvées dans l'éluat E7 et une à la fois dans l'éluat E7 et E8 (MHO_4720). De plus, MHO_4720 était l'unique lipoprotéine retrouvée dans l'éluat E8. Au total, nous avons retenu 20 lipoprotéines sur 48 répertoriées dans le génome (soit 41,7%), qui pourraient présenter une activité immunomodulatrice sur les hDCs. De plus, MHO_4720 est une lipoprotéine qui pourraient être responsable d'au moins une partie de l'activité observée avec les éluats E7 et E8.

Les lipoprotéines étant formées d'une partie polypeptidique et d'un groupe acyle, nous avons déterminé si le fragment protéique était responsable de l'activation des cellules dendritiques humaines. Un extrait double TX incubé en présence de 0,4 U de protéinase K pendant 1 heure à 37°C sous agitation douce a ainsi été testé pour son activité sur les hDCs (production d'IL-23). Deux contrôles correspondant à un extrait double TX non digéré et à la protéinase K seule ont été traités de manière identique (Figure 4). L'activité de la fraction issue de la double extraction était significativement diminuée après digestion à la protéinase K mais pas totalement inhibée. Des analyses supplémentaires après 4h, 8h et 24 h d'incubation (données non montrées) ne mettaient pas en évidence de différences avec les

résultats obtenus à 1h, démontrant une digestion optimale dès 1h. Ces résultats suggèrent que la fraction protéique des lipoprotéines contribue en partie à la bioactivité de l'extrait double TX.

Synthèse et bioactivité d'un facteur de stimulation des cellules dendritiques (DSL-1)

La comparaison des extrémités N-terminales des 20 lipoprotéines potentiellement bioactives entre elles (Table 2) et avec les séquences des lipopeptides synthétiques dérivés des mycoplasmes comme MALP-2 de *M. fermentans*, FSL-1 de *M. salivarium* et MPPL-1 de *M. pneumoniae* ainsi que d'autres lipopeptides bioactifs dérivés de bactéries pathogènes n'a révélé aucune séquence consensus. Un lipopeptide a donc été dessiné à partir de la séquence de la lipoprotéine MHO_4720, lipoprotéine potentiellement responsable de l'induction de la production d'IL-23 observée lorsque les hDCs sont incubées en présence des éluats E7 et E8. Les critères définissant un lipopeptide bioactif ont été acquis par l'analyse de la lipoprotéine de Braun, première lipoprotéine caractérisée chez *Escherichia coli*, de lipoprotéines bactériennes et de lipopeptides synthétiques dérivés des lipoprotéines des mycoplasmes. Ces critères concernent la longueur et la nature du fragment peptique ainsi que la nature et le nombre des chaînes acylées. Il doit être noté toutefois que la bioactivité des lipoprotéines ou lipopeptides sur lesquels repose le choix de ces déterminants structuraux n'a pas été décrite dans le contexte d'une activation de la production d'IL-23 par les hDCs.

Les lipopeptides dérivés de la lipoprotéine de Braun qui comportent une séquence peptidique de deux à cinq acides aminés seulement présentent une activité de stimulation plus forte que la lipoprotéine entière sur les cellules lymphocytaire B (Bessler *et al.*, 1985). Néanmoins, la présence d'une structure minimale dipeptidique serait nécessaire pour l'expression de cette stimulation (Bessler *et al.*, 1985). De plus, selon Akuzawa *et al.* (Akazawa *et al.*, 2010), le développement d'un agoniste TLR2, TLR reconnaissant *M. hominis* (Truchetet *et al.*, 2011), dépend du caractère hydrophobe de la séquence peptidique de l'extrémité N-terminale. Le peptide constitué des sept acides aminés N-terminaux de MHO_4720 présente un score GRAVY négatif et proche de celui des lipopeptides synthétiques bioactifs FSL-1 et MALP-2, issus respectivement de lipoprotéines produites chez *M. salivarium* et *M. fermentans* et induisant tous deux la production de TNF- α chez des cellules monocytaires THP-1 (Okusawa *et al.*, 2004). Nous avons ainsi sélectionné le fragment peptidique CGGEKFN.

Le nombre et la nature des chaînes acylées ont été sélectionnés selon les critères suivants. La présence de deux acides gras reliés par un ester serait un pré-requis pour

l'activité biologique, tandis que l'acide gras lié à l'extrémité N-terminale serait inutile. En effet, la délipidation du fragment N-terminal n'inhibe pas la capacité de stimulation de cellules lymphocytaires par la lipoprotéine de Braun (Bessler *et al.*, 1985). Une lipoprotéine présentant une extrémité amino-terminale libre exercerait même une activité plus forte (Metzger *et al.*, 1995) ; ceci a été notamment démontré chez *M. hyorhinis* où la capacité de stimulation des cellules macrophagiques péritonéales murines par MALP-A était diminuée sous la forme triacylée (Muhlradt *et al.*, 1998). De plus, de nombreuses lipoprotéines mycoplasmiques sont diacylées, ainsi que les lipopeptides bioactifs FSL-1, MPPL-1 et MALP-2. Nous avons donc choisi un lipopeptide comportant deux chaînes d'acides gras. L'acide gras préférentiellement incorporé au niveau des lipoprotéines mycoplasmiques est l'acide palmitique. Ainsi, les chaînes acylées des lipopeptides dérivés des mycoplasmes, FSL-1, MPPL-1 et MALP-2 comportent des acides palmitiques (Table 2). Nous avons ainsi choisi de composer un lipopeptide diacylé comportant deux chaînes d'acides palmitiques (C16 :0). Au final, à partir de la séquence protéique de MHO_4720 et des données de la littérature, nous avons donc décidé de synthétiser le lipopeptide DSL-1 pour Dendritic Stimulating Lipopeptide-1 comme suit Pam₂-CGGEKFN.

Pour explorer l'activité immunomodulatrice du lipopeptide DSL-1, nous avons examiné l'induction de la production d'IL-23 par les hDCs en comparaison à un autre lipopeptide synthétique FSL-1 (Pam₂-CGDPKHPKSF) dérivé d'une lipoprotéine de *M. salivarium* et activant les fibroblastes gingivaux humains. Nous avons montré que DSL-1 stimulait la production d'IL-23 par les cellules dendritiques de façon dose-dépendante à une concentration supérieure à 10 nM (Figure 5). En revanche, FSL-1 n'induisait pas de production significative d'IL-23 dans les surnageants de co-incubation des hDCs par rapport au PBS (témoin négatif). DSL-1, lipopeptide synthétique dérivé de MHO_4720 constitue donc un peptide stimulateur de la production d'IL-23 par les hDCs.

***M. hominis* induit la production d'IL-1 β par les hDCs**

Pour évaluer la réponse inflammatoire des cellules dendritiques à la stimulation par *M. hominis* PG21, nous avons utilisé une approche globale par l'utilisation d'une PCR array commerciale, Human Inflammatory Response & Autoimmunity PCR Array (Qiagen, Venlo, Pays-Bas) évaluant la transcription de 84 gènes impliqués dans la réponse inflammatoire par rapport à la transcription de cinq gènes de ménage pris comme référence. Nous avons ainsi comparé la transcription de ces gènes chez des hDCs co-incubées 24 h avec *M. hominis* PG21 par rapport à des hDCs incubées dans les mêmes conditions sans la bactérie (Table 3). Nous avons observé une forte surexpression des cytokines inflammatoires notamment de TNF- α , d'IFN γ , d'IL-10, d'IL-6 et d'IL-1 β ainsi que d'IL-23. De nombreux

facteurs du chimiotactisme étaient également surexprimés tels que CCL1, CCL2, CCL5, CCL7, CCL10, CCL19 et l'IL-8. Enfin, la surexpression de *ptgs2* codant pour la prostaglandin-endoperoxyde synthase 2 (PTGS2) aussi appelée cyclooxygénase-2 (COX-2) a été observée.

L'activation de l'expression d'IL-1 β à haut niveau suggérait une activation des voies de l'inflammasome. Pour confirmer cette activation, nous avons mesuré la quantité d'IL-1 β dans les surnageants de co-incubation des hDCs avec *M. hominis* entier et avec la fraction membranaire (Vmb). La production d'IL-1 β était induite de façon significative par *M. hominis* entier et par la fraction membranaire (Figure 6).

L'utilisation de l'inhibiteur de caspase inflammatoire YVAD-fmk inhibait de façon significative la production d'IL-1 β démontrant l'intervention des caspases 1 et/ou 5 dans cette production (Figure 7). Nous avons ainsi démontré que *M. hominis* PG21 induisait une production d'IL-1 β dépendante de l'activation des caspases. L'inflammasome était donc certainement mis en jeu lors de l'interaction de *M. hominis* PG21 avec les hDCs.

Activation des voies de l'inflammasome

Pour définir quelles sont les récepteurs, les voies de signalisation et les caspases engagés dans la production d'IL-1 β , nous avons utilisé une PCR array commerciale, Human Inflammasomes PCR Array (Qiagen, Venlo, Pays-Bas) dans les mêmes conditions que celles décrites précédemment. Les résultats sont présentés dans le Tableau 4. La très forte surexpression des cytokines inflammatoires notamment de TNF- α , d'IL-6 et d'IL-1 β ainsi que d'IL-12 β , sous unité spécifique de l'IL-23, a été confirmée. L'expression d'IL-18 était inchangée. Les facteurs du chimiotactisme tel que CCL2 et CXCL1 étaient également surexprimés. Nous avons observé une diminution de l'expression du récepteur NLRP3 et des domaines adaptateurs de l'ASC, PYCARD. Aucune régulation des autres NLR testés dans le kit n'a été mise en évidence. Parmi les caspases, le gène codant pour la caspase 5 était significativement surexprimé, l'expression de la caspase 1 étant inchangée. L'expression du NF- κ B était augmentée. Les protéines intervenant dans la régulation de l'inflammasome comme la caspase 8, FADD ou celles intervenant dans la régulation de l'apoptose comme BIRC2, BIRC3, XIAP étaient surexprimées. La surexpression des protéines IRF, MAPK, RIPK impliquées dans les signalisations cellulaires était observée. Enfin, la surexpression de *ptgs2* était confirmée. Nous avons ainsi mis en évidence une surexpression de plusieurs gènes dont la caspase 5 impliqués dans les voies de l'inflammasome après 24 h de co-incubation des hDCs avec *M. hominis* PG21.

DISCUSSION

Enrichissement d'un double extrait Sarkosyl/TX-114 en lipoprotéines membranaires de *M. hominis* PG21 stimulant les hDCs

Nous avons mis au point une méthode d'extraction double utilisant les propriétés d'extraction de deux détergents, le Sarkosyl puis le TX-114, sur des vésicules membranaires de *M. hominis* PG21. Le TX-100 est un détergent qui est connu pour extraire très peu les lipoprotéines chez les autres mollicutes en raison de sa faible incorporation dans les membranes contenant de fortes proportions de stérols (Chamberlain, 2004, London & Brown, 2000, Regula *et al.*, 2001), comme c'est le cas pour la membrane de *M. hominis* (Rottem & Razin, 1973). Le DOC, l'OG, le CHAPS n'éliminaient pas assez de protéines selon leurs profils électrophorétiques. Le maintien de la concentration en IL-23 après co-incubation des hDCs avec l'extrait double Sarkosyl/TX-114 a confirmé que l'ensemble des lipoprotéines stimulatrices était conservé dans la phase TX du double extrait. Nous avons ainsi mis au point une nouvelle méthode d'extraction sélective et d'enrichissement en lipoprotéines membranaires bioactives de *M. hominis* PG21.

Nous avons identifié les lipoprotéines contenues dans les sous-fractions de l'extrait double TX. Une ou plusieurs lipoprotéine(s) de 20 à 35 kDa, ainsi que des lipoprotéines de poids moléculaire compris entre 40 et 100 kDa indui(sen)t la production d'IL-23 par les hDCs. Ces résultats suggèrent que l'induction de la production d'IL-23 par les hDCs découlerait soit de l'action de plusieurs lipoprotéines, soit de différentes formes (entière ou fragmentées) d'une même lipoprotéine. Le fait que plusieurs lipoprotéines soient impliquées dans un même phénomène de stimulation de cellules du système immunitaire est sans surprise. En effet, chez *M. arthritidis*, mycoplasme proche phylogénétiquement de *M. hominis*, trois sous-fractions (de 22 à 25 kDa, 25 à 32 kDa et de 36 à 43 kDa) sont responsables de la sécrétion de TNF- α par des monocytes murins (Cole *et al.*, 2005). Les travaux de Peltier *et al.* (Peltier *et al.*, 2005) concernant la production de TNF- α induite chez les monocytes humains THP-1 par *M. hominis* PG21 indiquaient que l'activité était essentiellement liée à la présence de protéines dont le poids moléculaire était compris entre 10 et 50 kDa. Cependant, la stimulation de cellules humaines ou murines par un groupe de lipoprotéines de haut poids moléculaire n'a pas été décrite précédemment, suggérant une spécificité de cible cellulaire pour certaines lipoprotéines.

Seize lipoprotéines potentiellement responsables de l'activité immunomodulatrice ont été identifiées dans le premier groupe d'éluats immunomodulateurs E3, E4 et E5 (protéines de MMap comprise entre 40 et 100 kDa). Parmi ces lipoprotéines, nous avons identifié

l'adhésine Vaa (MHO_3470 ou P50) dans les trois éluats. Dans les expériences futures, il sera intéressant de déterminer si cette protéine participe ou non à l'induction de la production d'IL-23 par les hDCs. En effet la partie N-terminale de Vaa de *M. hominis* H29 induit la production de TNF- α par des cellules monocytaires THP-1 (Hasebe *et al.*, 2014). Les autres lipoprotéines identifiées dans les éluats correspondant aux MMap de 40 à 100 kDa sont les suivantes : MHO_0290 correspond à la partie N-terminale d'une lipoprotéine de fonction inconnue sans orthologue chez d'autres espèces de mycoplasmes, codée par un pseudogène, paralogue de MHO_0280 et homologue de MHO_2340 et MHO_2620, également présentes dans au moins un des éluats E3, E4 et E5 ; MHO_3200 est une peptidase potentielle qui possède un domaine enzymatique DUF31 retrouvé dans de nombreuses lipoprotéines conservées chez les mycoplasmes. Nous avons précédemment suggéré que MHO_3200 pourrait jouer un rôle de facteur de virulence en facilitant l'échappement du système immunitaire (Goret *et al.*, 2015) ; MHO_0790, de fonction inconnue, est une lipoprotéine conservée parmi les mycoplasmes. Elle présente deux paralogues, MHO_0780 et MHO_0720, de fonction inconnue, présentes également dans les éluats E3 et E4. MHO_3720 ou P75, possède une protéine paralogue, MHO_3100 ou P75-like, présente dans l'éluat E4. P75 a été décrite par Christiansen *et al.* (Christiansen *et al.*, 1990) comme étant une lipoprotéine de surface variable de fonction inconnue.

Dans le deuxième groupe d'éluats immunomodulateurs constitué des éluats E7 et E8, en plus de fragments de lipoprotéines de masse moléculaire plus importante, seulement quatre lipoprotéines hypothétiques de fonction inconnue sont potentiellement immunomodulatrices. MHO_1730, MHO_4720 et MHO_4400 possèdent un orthologue chez *M. arthritidis* (MARTH_orf 711, MARTH_orf 080 et MARTH_orf 640 respectivement) mais ces protéines hypothétiques n'ont pas de fonction décrite. MHO_2440 possède un paralogue, MHO_3000, mais sa fonction est inconnue.

Le lipopeptide DSL-1 correspondant à la partie N-terminale de MHO_4720 stimule les hDCs

L'activité de la fraction issue des doubles extractions Sarkosyl/TX-114 a été significativement diminuée après digestion à la protéinase K mais n'a pas été abolie. Nos résultats suggèrent qu'une composante protéique de *M. hominis* PG21 contribue au moins en partie à l'activité de stimulation des hDCs. Selon le type cellulaire cible et le mycoplasme considéré, la sensibilité à la protéinase K du facteur de stimulation diffère. En effet, le facteur de stimulation macrophagique de *M. fermentans* est résistant à la protéinase K (Muhlradt & Frisch, 1994). Les fractions membranaires de *M. arthritidis* traitées à la protéinase K conservent la totalité de leur activité immunomodulatrice sur les cellules macrophagiques

murines RAW 264.7 (Hasebe *et al.*, 2007). De même, chez *M. hominis*, la digestion complète de P50t, facteur de stimulation des cellules THP-1, n'a pas d'effet sur la bioactivité (Hasebe *et al.*, 2014). En revanche, Peltier *et al.* (Peltier *et al.*, 2005) ont montré que l'activité du facteur de stimulation des cellules THP-1 présent dans un extrait au TX-114 de *M. hominis* était significativement diminuée par la digestion à la protéinase K mais non abolie.

Pour déterminer si une structure protéique minimale des lipoprotéines active les cellules dendritiques, un lipopeptide synthétique porteur de quelques acides aminés a été testé pour son activité sur les hDCs. Afin de définir la séquence de ce lipopeptide, nous avons recherché une séquence consensus par l'alignement des extrémités N-terminales des lipoprotéines potentiellement bioactives identifiées précédemment, comme proposé par Into *et al.* (Into *et al.*, 2007) pour la création du lipopeptide bioactif MPPL-1 chez *M. pneumoniae*. Aucune séquence consensus n'a été retrouvée suggérant que des lipoprotéines possédant des séquences protéiques distinctes peuvent jouer un rôle d'agoniste des TLRs. Nous avons identifié une lipoprotéine bioactive, MHO_4720, pouvant à elle seul expliquer la production d'IL-23 dans les éluats E7 et E8. Nous avons donc choisi de travailler à partir de cette lipoprotéine et de synthétiser DSL-1 afin de tester sa bioactivité. Nous avons ainsi pu mettre en évidence la capacité de stimulation des hDCs par DSL-1. Okusawa *et al.* (Okusawa *et al.*, 2004) avait décrit un effet dose dépendant en deux phases avec une augmentation puis une diminution de la production d'IL-6, d'IL-8 et de MCP-1 par des fibroblastes gingivaux stimulés par FSL-1 et de TNF- α par des cellules THP-1 stimulées par FSL-1 et MALP-2. Nous avons également observé un effet en deux phases avec une forte production d'IL-23 induite à 100 nM de DSL-1 puis une diminution aux plus fortes concentrations. Nous avons ainsi montré qu'un lipopeptide dérivé de *M. hominis* PG21, diacylé et comportant 7 acides aminés, peut à lui seul entraîner une réaction immunitaire innée de la cellule hôte. La capacité d'induction de la production d'IL-23 par FSL-1 est faible, indiquant que cette réaction immunitaire innée nécessite une spécificité de séquence des facteurs lipopeptidiques, notamment de leur fraction peptidique.

Activation d'un inflammasome dépendant de la caspase 5 et potentiel contrôle de l'inflammation après 24h de co-incubation des hDCs avec *M. hominis* PG21

Sur le versant de la cellule hôte, *M. hominis* induit la production par les hDCs d'IL-1 β selon une voie dépendante de la caspase 5, suggérant ainsi une activation de l'inflammasome. L'exploration des voies de l'inflammasome a été entreprise par PCR array. Notre technique a été validée par l'observation de l'augmentation de la transcription de l'IL-23 et de TNF- α correspondant aux sécrétions déjà décrites précédemment (Truchetet *et al.*, 2011). L'augmentation de la transcription d'IL6 a aussi été confirmée par les résultats de

dosage ELISA sur les surnageants de coincubation de *M. hominis* entier ou de sa fraction membranaire (données non montrées).

Par PCR array, nous n'avons pas observé de surexpression des récepteurs NLR et n'avons ainsi pas pu identifier quel(s) NLR(s) étai(en)t impliqué(s) dans l'activation de la production d'IL-1 β . En particulier, le gène codant pour NLRP7 n'était pas présent sur la plaque de PCR Array utilisée. L'activation de l'inflammasome NLRP7 chez les cellules THP-1 par des lipopeptides synthétiques Pam₂CSK4 et Pam₃CSK4, des lipopeptides dérivés de mycoplasmes, FSL-1, MALP-2, et par *Acholeplasma laidlawii* a été décrite (Khare *et al.*, 2012). Nous devons donc étudier l'implication de ce récepteur. Nous avons observé une inhibition de l'expression de NLRP3. Cette inhibition pourrait s'expliquer par une activation temporaire de sa transcription. Gurung *et al.* (Gurung *et al.*, 2015) ont ainsi observé que la capacité d'activation de NLRP3 par le LPS était transitoire et ont montré que l'activation de la production d'IL-1 β par des monocytes murins stimulés par du LPS pouvait varier selon le temps de contact du LPS avec les cellules. Alors qu'une stimulation brève (<4h) par le LPS active l'inflammasome, une exposition prolongée (priming de 12 à 24 heures) inhibait l'activation de NLRP3 chez ces cellules. L'IL-10 était induite et agissait de façon autocrine pour diminuer l'expression de NLRP3. Notre stimulation des hDCs par *M. hominis* est longue (24h), et pourrait donc expliquer l'inhibition de l'expression de NLRP3 et de la protéine adaptatrice ASC (PYCARD) que nous observons. De plus, nous avons montré précédemment que *M. hominis* PG21 induisait aussi la production d'IL-10 après 24 h de co-incubation avec des hDCs (Truchetet *et al.*, 2011), suggérant encore une possible activation de ce système de régulation. Une évaluation cinétique de l'expression des gènes impliqués dans les voies de l'inflammasome pourra être entreprise après 4, 8 et 12 h de co-incubation pour évaluer la régulation de NLRP3. La cinétique de libération de l'IL-1 β pourra également être réalisée dans les mêmes conditions de temps.

Nous avons mis en évidence une forte augmentation de l'expression de la cyclo-oxygénase COX-2 après 24 h de co-incubation des hDCs avec *M. hominis* PG21. COX-2 est une enzyme inductible qui intervient dans la synthèse de prostaglandines endogènes et permet la synthèse de la prostaglandine E2 (PGE2) à partir de l'acide arachidonique. PGE2 appartient à la famille des médiateurs lipidiques qui interviennent dans la phase initiale de la réponse inflammatoire en favorisant la vasodilatation et l'afflux de polynucléaires neutrophiles, de macrophages mais possède également des propriétés immunosuppressives qui contribuent à la résolution de l'inflammation, la régénération des tissus et le retour à l'homéostasie (Sokolowska *et al.*, 2015). Il a été montré que l'expression de COX-2 dans les cellules trophoblastiques placentaires humaines était induite par MALP-2 (Mitsunari *et al.*, 2006). L'induction de la production de PGE2 par les lipoprotéines mycoplasmiques pourrait

expliquer la physiopathologie de la survenue d'un travail prématuré lors de la grossesse lors des infections à *M. hominis* (Waites *et al.*, 2009). Il existe de rares données sur la relation entre COX-2 et les inflammasomes dans la littérature. Sokolowska *et al.* (Sokolowska *et al.*, 2015) ont montré que l'activation de l'inflammasome NLRP3 était inhibée par l'addition de PGE2 exogène sur des cellules macrophagiques humaines dérivées de monocytes. L'inhibition de COX-2 et par conséquent de la production de PGE2 endogène était responsable d'une augmentation de l'activation de la production d'IL-1 β . Ces résultats suggéraient que PGE2 maintiendrait l'homéostasie durant la phase de résolution de l'inflammation et jouerait un rôle de régulateur autocrine et paracrine. Ces données sont en accord avec celles présentées dans le Tableau 4 où une augmentation de l'expression de COX-2 et une inhibition de celle de NLRP3 étaient observées après 24h de co-incubation des hDCs avec *M. hominis* PG21. Nous envisageons qu'une régulation des voies de l'inflammasome pourrait s'être mise en place à 24 h de co-incubation. Pour confirmer cela, l'expression du gène codant pour COX-2 devra aussi être analysée après 4, 8 et 12 h de co-incubation. Il faut aussi noter que l'expression de COX-2 est également induite par l'IL-1 β et le TNF- α (Dinarello, 2002) dont les gènes sont ici surexprimés après 24 h de co-incubation. Cette induction va aussi dans le sens d'un contrôle de la réponse inflammatoire à 24 h.

Par ailleurs, nous avons mis en évidence une surexpression des gènes codant pour des facteurs du chimiotactisme tels que CXCL1 et CXCL5 dont le rôle est d'orienter le déplacement de cellules immunitaires vers le site de l'infection. Une augmentation de la production des facteurs du chimiotactisme avait aussi été démontrée pour MALP-2 qui était impliqué dans la production de chemokines via l'activation de COX-2 telles que le CXCL1, le CXCL5, et le vascular endothelial growth factor (VEGF) chez des fibroblastes pulmonaires (Brant & Fabisiak, 2009). Le rôle de COX-2 dans le chimiotactisme a également été mis en évidence par Lemos *et al.* (Lemos *et al.*, 2009) qui ont rapporté que PGE2 augmentait la migration des polynucléaires neutrophiles (PNN) induite par l'axe IL-23/IL-17 chez un modèle murin de rhumatisme articulaire. L'utilisation d'anticorps anti-IL23, anti-IL-17, anti-CXCL1, anti-CXCL5 et d'inhibiteur de COX diminuait la migration des PNN. Ces données sont à mettre en relation avec le pouvoir pathogène de *M. hominis*. En effet, il a été démontré que la bactérie est responsable d'arthrites (Pereyre & Bébéar, 2012) et polarise la réponse immunitaire adaptative selon l'axe IL-23/IL-17 après stimulation des hDCs (Truchetet *et al.*, 2011). Les données présentées montrant l'augmentation de l'expression de COX-2, de CXCL1 et de CXCL5 sont donc en accord avec celles décrites dans la littérature. Il sera intéressant d'évaluer l'expression de ces chemokines après utilisation de petits ARN interférents ciblant *ptgs2* codant pour COX-2.

CONCLUSION

En conclusion, nous avons identifié 20 lipoprotéines de *M. hominis* PG21 potentiellement bioactives capables de stimuler les hDCs et d'induire la production d'IL-23. Ces lipoprotéines sont réparties en deux groupes de masses moléculaires apparentes (MMap) différentes, un de faible MMap de 15 à 30 kDa et un haute MMap de 40 à 100 kDa. Nous avons démontré que la fraction protéique de ces lipoprotéines n'est qu'en partie responsable de l'immunomodulation. Un lipopeptide bioactif, appelé DSL-1 et correspondant à la fraction N-terminale de la lipoprotéine MHO_4720, a la capacité de stimuler de façon dose-dépendante la production d'IL-23 par les hDCs.

Nous avons également partiellement caractérisé la réponse immunitaire innée des hDCs en montrant l'activation d'inflammasome(s) par la mise en évidence de la production d'IL-1 β dépendant de la caspase 5. L'analyse par PCR array des voies de signalisation impliquées a montré une inhibition de l'expression de NLRP3 et de la protéine adaptatrice ASC et une augmentation de l'expression de COX-2 et des chemokines suggérant une régulation à la baisse de l'inflammation après 24 h de co-incubation des hDCs avec *M. hominis* PG21. Une étude cinétique pourra permettre de confirmer ce phénomène.

TABLES ET FIGURES

Tableau 1. Identification par spectrométrie de masse des lipoprotéines présentes dans les éluats E2 à E8.

| Mnémonique du gene | Description | Eluat | | | | | | | | Poids moléculaire |
|--------------------|--|--------------|-------------|------------|------------|------------|------------|------------|-------|-------------------|
| | | 2 100-200 | 3 70-100 | 4 55-70 | 5 40-55 | 6 30-40 | 7 25-30 | 8 15-25 | | |
| MHO_0280 | Hypothetical protein, predicted lipoprotein | . | 47 | 28 | 8 | 6 | . | . | 80,5 | |
| MHO_0290 | Pseudogene of hypothetical protein (N-terminalpart), predicted lipoprotein | . | 55 | 21 | 11 | . | 2 | . | 67,7 | |
| MHO_0530 | Lmp1 protein | 13 | 5 | 2 | . | . | . | . | 170,7 | |
| MHO_0540 | Lmp-related protein | . | 3 | 28 | . | . | . | . | 70,0 | |
| MHO_0720 | Conserved hypothetical protein, predicted lipoprotein | . | 53 | 20 | . | . | . | . | 75,2 | |
| MHO_0730 | Hypothetical protein, putative nuclease, predicted lipoprotein | . | . | . | . | . | 2 | . | 34,3 | |
| MHO_0780 | Conserved hypothetical protein, predicted lipoprotein | . | 24 | 10 | . | . | . | . | 78,2 | |
| MHO_0790 | Conserved hypothetical protein, predicted lipoprotein | 5 | 61 | 27 | 13 | 2 | 2 | . | 78,2 | |
| MHO_1510 | P100 = OppA | 44 | 36 | 24 | 7 | . | . | . | 105,8 | |
| MHO_1640 | Lmp3 protein | 4 | . | . | . | . | . | . | 178,0 | |
| MHO_1730 | Hypothetical protein, predicted lipoprotein | . | . | . | . | . | 11 | . | 27,1 | |
| MHO_2080 | Conserved hypothetical protein, predicted lipoprotein | . | . | 8 | . | . | . | . | 64,3 | |
| MHO_2340 | Hypothetical protein, putative adhesin, predicted lipoprotein | . | . | 18 | . | . | . | . | 64,6 | |
| MHO_2440 | Hypothetical protein, predicted lipoprotein | . | . | . | . | 4 | 10 | . | 24,3 | |
| MHO_2620 | Hypothetical protein, predicted lipoprotein | . | . | 18 | 2 | . | . | . | 50,5 | |
| MHO_3070 | Lmp related protein | . | . | . | 24 | . | . | . | 44,2 | |
| MHO_3100 | P75 related protein, predicted lipoprotein | . | . | 39 | . | . | . | . | 62,3 | |
| MHO_3200 | Conserved hypothetical protein, putative peptidase, predicted lipoprotein | 5 | 85 | 47 | 14 | 11 | 4 | 10 | 89,6 | |
| MHO_3470 | P50 = Vaa | 17 | 17 | 32 | 76 | 18 | 9 | 13 | 51,1 | |
| MHO_3490 | P60 | . | . | 30 | . | . | . | . | 64,2 | |
| MHO_3620 | P37 like | . | . | . | . | 4 | . | . | 41,8 | |
| MHO_3660 | P120 | 25 | 6 | 2 | . | . | . | . | 119,7 | |
| MHO_3720 | P75 protein precursor | 4 | 25 | 65 | 4 | 2 | 4 | 5 | 72,4 | |
| MHO_3730 | Lmp-related protein | . | 27 | 2 | . | . | . | . | 77,8 | |
| MHO_4400 | Hypothetical protein, predicted lipoprotein | . | . | . | . | . | 3 | . | 29,7 | |
| MHO_4720 | Hypothetical protein, predicted lipoprotein | . | 2 | . | . | . | 9 | 7 | 28,3 | |

La valeur indiquée pour chaque lipoprotéine identifiée correspond au nombre de peptides détectés. En bleu, les valeurs pour les lipoprotéines ayant migré à l'endroit attendu compte tenu de leur poids moléculaire. Le poids moléculaire donné en kDa correspond à celui de la protéine mature sans le peptide signal. Les éluats E2 et E6 ne possédant pas d'activité immunomodulatrice sont utilisés comme référence. Les lipoprotéines présentes dans E2 et E6 et ayant migré à l'endroit attendu compte tenu de leur poids moléculaire ne sont pas considérées comme immunomodulatrices dans les autres éluats. Le nombre de peptides des 20 lipoprotéines potentiellement immunomodulatrices sont soulignés.

Tableau 2. Alignement des dix acides aminés N-terminaux des vingt lipoprotéines potentiellement immunomodulatrices de *M. hominis* PG21 avec des lipopeptides bioactifs décrits dans la littérature.

| | Mnémonique | Espèce | Acides aminés N-terminaux | M.W. | pI | Hydrophobie | Acylation | Référence |
|--|------------|------------------------|-----------------------------|--------|------|-------------|-----------|------------------------------|
| Lipoprotéines potentiellement immunomodulatrices | MHO_0280 | <i>M. hominis</i> | C N K T T N H E T N | 1161,2 | 6,74 | -2,070 | | |
| | MHO_0290 | <i>M. hominis</i> | C K D P N K P E V K | 1157,3 | 8,18 | -1,870 | | |
| | MHO_0540 | <i>M. hominis</i> | C R F C K K P N K Q | 1251,5 | 9,85 | -1,700 | | |
| | MHO_0720 | <i>M. hominis</i> | C G H T G T G Y G F | 999,0 | 6,73 | -0,220 | | |
| | MHO_0780 | <i>M. hominis</i> | C S T T E N S K Y G | 1089,1 | 5,99 | -1,310 | | |
| | MHO_0790 | <i>M. hominis</i> | C S T T E N S K Y G | 1089,1 | 5,99 | -1,310 | | |
| | MHO_1730 | <i>M. hominis</i> | C N D P K N K K N P | 1157,3 | 9,20 | -2,640 | | |
| | MHO_2080 | <i>M. hominis</i> | C A I L P V S C S L | 1005,2 | 5,51 | 1,990 | | |
| | MHO_2340 | <i>M. hominis</i> | C I K T K K P E V K | 1173,4 | 9,63 | -1,020 | | |
| | MHO_2440 | <i>M. hominis</i> | C K T T N D S Q N S | 1097,1 | 5,83 | -1,840 | | |
| | MHO_2620 | <i>M. hominis</i> | C V K T K K P E G E | 1118,3 | 8,18 | -1,470 | | |
| | MHO_3070 | <i>M. hominis</i> | C N N K N S K L T K | 119,3 | 9,79 | -1,740 | | |
| | MHO_3100 | <i>M. hominis</i> | C S N K Q D K K E D | 1194,2 | 6,11 | -2,750 | | |
| | MHO_3200 | <i>M. hominis</i> | C K N T N K K T N N | 1164,3 | 9,79 | -2,460 | | |
| | MHO_3470 | <i>M. hominis</i> | C N D D K L A E K N | 1149,2 | 4,56 | -1,720 | | |
| | MHO_3490 | <i>M. hominis</i> | C K K E K E D S Q Q | 1222,3 | 6,17 | -2,750 | | |
| | MHO_3720 | <i>M. hominis</i> | C K N E K S N A E Y | 1185,2 | 6,13 | -1,960 | | |
| | MHO_3730 | <i>M. hominis</i> | C T V T V K V K E K | 1134,4 | 9,20 | -0,150 | | |
| | MHO_4400 | <i>M. hominis</i> | C N K T A T I T L N | 1078,2 | 8,22 | -0,040 | | |
| | MHO_4720 | <i>M. hominis</i> | C G G E K F N A F A | 1043,1 | 5,99 | 0,000 | | |
| Lipopeptides décrits dans la littérature | MALP-2 | <i>M. fermentans</i> | C G N N D E S N I S F K E K | 2134,1 | 4,68 | -1,500 | Pam2 | Shimizu <i>et al.</i> , 2004 |
| | FSL-1 | <i>M. salivarium</i> | C G D P K H P K S F | 1666,1 | 8,21 | -1,360 | Pam2 | Shibata <i>et al.</i> , 2000 |
| | MPPL-1 | <i>M. pneumoniae</i> | C T G I Q A D L R N L I K | 1341,5 | 8,41 | -0,133 | Pam2 | Into <i>et al.</i> 2007 |
| | P2C-RGDS | <i>M. tuberculosis</i> | C R G D S | 1087,5 | 5,83 | -1,34 | Pam2 | Akazawa <i>et al.</i> 2010 |
| | PGTP2-RL | <i>P. gingivalis</i> | C N S Q A K | 649,7 | 8,22 | -1,233 | Pam3 | Asai <i>et al.</i> 2007 |
| | Murein LPP | <i>E. coli</i> | C S S N K I D E L S D D | 1325,3 | 3,84 | -1,083 | Pam3 | Braun <i>et al.</i> 1969 |
| | MDPL | <i>M. synoviae</i> | C G D Q T P A P E P T P G N | 1383 | 3,67 | -1,307 | Pam2 | Oven <i>et al.</i> 2013 |
| | DSL-1 | <i>M. hominis</i> | C G G E K F N | 753,8 | 5,99 | -0,914 | Pam2 | |

Les caractéristiques physico-chimiques des fragments peptidiques ont été déterminées grâce au logiciel ProtParam (<http://web.expasy.org/cgi-bin/protparam/protparam>). Les acides aminés hydrophobes sont surlignés en gris. Pam, acide palmitique ; Pam2, lipoprotéine diacylée avec deux acides palmitiques ; Pam3, lipoprotéine triacylée avec trois acides palmitique dont un en N-terminal ; *M. tuberculosis*, *Mycobacterium tuberculosis* ; *P. gingivalis*, *Porphyromonas gingivalis* ; *E. coli*, *Escherichia coli*.

Tableau 3. Expression différentielle des gènes des hDCs impliqués dans les voies de l'inflammation après 24 h de co-incubation avec *M. hominis* PG21.

| Gène | Abréviation | Ratio d'expression |
|--|-------------|--------------------|
| B-cell CLL/lymphoma 6 | BCL6 | 1,0 |
| Complement component 3 | C3 | 36,8 |
| Complement component 3a receptor 1 | C3AR1 | -1,5 |
| Chemokine (C-C motif) ligand 11 | CCL11 | -1,9 |
| Chemokine (C-C motif) ligand 13 | CCL13 | 3,1 |
| Chemokine (C-C motif) ligand 16 | CCL16 | -2,0 |
| Chemokine (C-C motif) ligand 17 | CCL17 | 5,3 |
| Chemokine (C-C motif) ligand 19 | CCL19 | 306,6 |
| Chemokine (C-C motif) ligand 2 | CCL2 | 238,9 |
| Chemokine (C-C motif) ligand 21 | CCL21 | -1,9 |
| Chemokine (C-C motif) ligand 22 | CCL22 | 21,4 |
| Chemokine (C-C motif) ligand 23 | CCL23 | 1,3 |
| Chemokine (C-C motif) ligand 24 | CCL24 | 2,5 |
| Chemokine (C-C motif) ligand 3 | CCL3 | 52,3 |
| Chemokine (C-C motif) ligand 4 | CCL4 | 57,7 |
| Chemokine (C-C motif) ligand 5 | CCL5 | 131,6 |
| Chemokine (C-C motif) ligand 7 | CCL7 | 210,8 |
| Chemokine (C-C motif) ligand 8 | CCL8 | 4,7 |
| Chemokine (C-C motif) receptor 1 | CCR1 | -1,2 |
| Chemokine (C-C motif) receptor 2 | CCR2 | -17,6 |
| Chemokine (C-C motif) receptor 3 | CCR3 | 1,2 |
| Chemokine (C-C motif) receptor 4 | CCR4 | 10,1 |
| Chemokine (C-C motif) receptor 7 | CCR7 | 124,5 |
| CD14 molecule | CD14 | -5,0 |
| CD40 molecule, TNF receptor superfamily member 5 | CD40 | 5,3 |
| CD40 ligand | CD40LG | 1,0 |
| CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), beta | CEBPB | 1,9 |
| C-reactive protein, pentraxin-related | CRP | -2,0 |
| Colony stimulating factor 1 (macrophage) | CSF1 | 9,5 |
| Chemokine (C-X-C motif) ligand 1 (melanoma growth stimulating activity, alpha) | CXCL1 | 6122,9 |
| Chemokine (C-X-C motif) ligand 10 | CXCL10 | 689,8 |
| Chemokine (C-X-C motif) ligand 2 | CXCL2 | 155,4 |
| Chemokine (C-X-C motif) ligand 3 | CXCL3 | 97,7 |
| Chemokine (C-X-C motif) ligand 5 | CXCL5 | 27,5 |
| Chemokine (C-X-C motif) ligand 6 (granulocyte chemotactic protein 2) | CXCL6 | 35,3 |
| Chemokine (C-X-C motif) ligand 9 | CXCL9 | 19,3 |
| Chemokine (C-X-C motif) receptor 1 | CXCR1 | -17,8 |
| Chemokine (C-X-C motif) receptor 2 | CXCR2 | -4,6 |
| Chemokine (C-X-C motif) receptor 4 | CXCR4 | 35,3 |
| Fas ligand (TNF superfamily, member 6) | FASLG | 1,9 |
| FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog | FOS | -1,3 |
| Interferon, gamma | IFNG | 58,1 |

| Gène | Abréviation | Ratio d'expression |
|---|-------------|--------------------|
| Interleukin 10 | IL10 | 14,2 |
| Interleukin 10 receptor, beta | IL10RB | 2,2 |
| Interleukin 15 | IL15 | 14,5 |
| Interleukin 17A | IL17A | -2,0 |
| Interleukin 18 (interferon-gamma-inducing factor) | IL18 | 2,0 |
| Interleukin 1, alpha | IL1A | 357,1 |
| Interleukin 1, beta | IL1B | 522,8 |
| Interleukin 1 receptor, type I | IL1R1 | -1,1 |
| Interleukin 1 receptor accessory protein | IL1RAP | -1,7 |
| Interleukin 1 receptor antagonist | IL1RN | 8,5 |
| Interleukin 22 | IL22 | 2,4 |
| Interleukin 23, alpha subunit p19 | IL23A | 903,9 |
| Interleukin 23 receptor | IL23R | 36,0 |
| Interleukin 5 (colony-stimulating factor, eosinophil) | IL5 | -2,0 |
| Interleukin 6 (interferon, beta 2) | IL6 | 8841,0 |
| Interleukin 6 receptor | IL6R | -3,1 |
| Interleukin 8 | IL8 | 1584,7 |
| Interleukin 9 | IL9 | -3,9 |
| Integrin, beta 2 (complement component 3 receptor 3 and 4 subunit) | ITGB2 | -6,3 |
| Kininogen 1 | KNG1 | -2,0 |
| Lymphotoxin alpha (TNF superfamily, member 1) | LTA | 21,6 |
| Lymphotoxin beta (TNF superfamily, member 3) | LTB | -2,8 |
| Lymphocyte antigen 96 | LY96 | 1,8 |
| Myeloid differentiation primary response gene (88) | MYD88 | 4,4 |
| Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1 | NFKB1 | 16,1 |
| Nitric oxide synthase 2, inducible | NOS2 | 1,6 |
| Nuclear receptor subfamily 3, group C, member 1 (glucocorticoid receptor) | NR3C1 | 2,5 |
| Prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase) | PTGS2 | 202,3 |
| Receptor-interacting serine-threonine kinase 2 | RIPK2 | 19,7 |
| Selectin E | SELE | -2,5 |
| Toll-interleukin 1 receptor (TIR) domain containing adaptor protein | TIRAP | -1,8 |
| Toll-like receptor 1 | TLR1 | -2,6 |
| Toll-like receptor 2 | TLR2 | -7,3 |
| Toll-like receptor 3 | TLR3 | -22,2 |
| Toll-like receptor 4 | TLR4 | -3,3 |
| Toll-like receptor 5 | TLR5 | -9,9 |
| Toll-like receptor 6 | TLR6 | -3,6 |
| Toll-like receptor 7 | TLR7 | 7,1 |
| Toll-like receptor 9 | TLR9 | -1,2 |
| Tumor necrosis factor | TNF | 19,8 |
| Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 14 | TNFSF14 | -1,9 |
| Toll interacting protein | TOLLIP | -1,5 |

L'analyse de l'expression différentielle des gènes a été réalisée selon la méthode de quantification relative ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) décrite par Livak *et al.* (Livak & Schmittgen, 2001). Le ratio d'expression ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) correspond à l'expression du gène normalisée par celle de cinq gènes de référence (β -actine, β -2-microglobulin, glyceraldehyde-3-phosphate déshydrogénase, hypoxanthine phosphoribosyltransférase 1 et protéine ribosomale P0) ($2^{-\Delta C_t}$) dans le groupe test (cellules dendritiques avec *M. hominis* PG21) divisée par son expression normalisée ($2^{-\Delta C_t}$) dans le groupe contrôle (cellules dendritiques sans *M. hominis* PG21). Une seule manipulation a été réalisée.

Tableau 4. Expression différentielle des gènes des hDCs impliqués dans les voies de l'inflammasome après 24 h de co-incubation avec *M. hominis* PG21.

| Gène | Abréviation | Ratio d'expression | p |
|---|-------------|--------------------|--------------|
| Absent in melanoma 2 | AIM2 | 4,3 | 0,057 |
| B-cell CLL/lymphoma 2 | BCL2 | 20,7 | 0,034 |
| BCL2-like 1 | BCL2L1 | 3,4 | 0,059 |
| Baculoviral IAP repeat containing 2 | BIRC2 | 3,5 | 0,039 |
| Baculoviral IAP repeat containing 3 | BIRC3 | 34,7 | 0,029 |
| Caspase recruitment domain family, member 18 | CARD18 | Non amplifié | Non amplifié |
| Caspase recruitment domain family, member 6 | CARD6 | -1,7 | 0,155 |
| Caspase 1, apoptosis-related cysteine peptidase (interleukin 1, beta, convertase) | CASP1 | 1,1 | 0,767 |
| Caspase 5, apoptosis-related cysteine peptidase | CASP5 | 5,8 | 0,030 |
| Caspase 8, apoptosis-related cysteine peptidase | CASP8 | -1,2 | 0,412 |
| Chemokine (C-C motif) ligand 2 | CCL2 | 80,9 | 0,010 |
| Chemokine (C-C motif) ligand 5 | CCL5 | 35,1 | 0,221 |
| Chemokine (C-C motif) ligand 7 | CCL7 | Non amplifié | Non amplifié |
| CD40 ligand | CD40LG | -2,1 | 0,205 |
| CASP8 and FADD-like apoptosis regulator | CFLAR | 5,9 | 0,024 |
| Conserved helix-loop-helix ubiquitous kinase | CHUK | 1,6 | 0,467 |
| Class II, major histocompatibility complex, transactivator | CIITA | -4,3 | 0,024 |
| Cathepsin B | CTSB | -2,8 | 0,011 |
| Chemokine (C-X-C motif) ligand 1 (melanoma growth stimulating activity, alpha) | CXCL1 | 934,5 | 0,031 |
| Chemokine (C-X-C motif) ligand 2 | CXCL2 | 265,2 | 0,054 |
| Fas (TNFRSF6)-associated via death domain | FADD | 1,0 | 0,978 |
| Heat shock protein 90kDa alpha (cytosolic), class A member 1 | HSP90AA1 | -1,3 | 0,296 |
| Heat shock protein 90kDa alpha (cytosolic), class B member 1 | HSP90AB1 | -1,9 | 0,150 |
| Heat shock protein 90kDa beta (Grp94), member 1 | HSP90B1 | -1,1 | 0,848 |
| Interferon, beta 1, fibroblast | IFNB1 | Non amplifié | Non amplifié |
| Interferon, gamma | IFNG | Non amplifié | Non amplifié |
| Inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase beta | IKBKB | 1,2 | 0,585 |
| Inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase gamma | IKBKG | 1,2 | 0,500 |
| Interleukin 12A (natural killer cell stimulatory factor 1, cytotoxic lymphocyte maturation factor 1, p35) | IL12A | Non amplifié | Non amplifié |
| Interleukin 12B (natural killer cell stimulatory factor 2, cytotoxic lymphocyte maturation factor 2, p40) | IL12B | 2660,2 | 0,018 |
| Interleukin 18 (interferon-gamma-inducing factor) | IL18 | 1,7 | 0,435 |
| Interleukin 1, beta | IL1B | 285,5 | 0,035 |
| Interleukin 33 | IL33 | Non amplifié | Non amplifié |
| Interleukin 6 (interferon, beta 2) | IL6 | 4784,0 | 0,016 |
| Interleukin-1 receptor-associated kinase 1 | IRAK1 | -1,3 | 0,385 |
| Interferon regulatory factor 1 | IRF1 | 8,8 | 0,040 |
| Interferon regulatory factor 2 | IRF2 | 2,7 | 0,046 |
| Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 7 | MAP3K7 | -1,1 | 0,455 |
| Mitogen-activated protein kinase 1 | MAPK1 | -1,2 | 0,299 |
| Mitogen-activated protein kinase 11 | MAPK11 | 3,5 | 0,047 |
| Mitogen-activated protein kinase 12 | MAPK12 | -1,9 | 0,202 |
| Mitogen-activated protein kinase 13 | MAPK13 | 2,6 | 0,047 |
| Mitogen-activated protein kinase 3 | MAPK3 | -3,8 | 0,035 |
| Mitogen-activated protein kinase 8 | MAPK8 | 3,3 | 0,021 |
| Mitogen-activated protein kinase 9 | MAPK9 | -2,9 | 0,038 |
| Mediterranean fever | MEFV | -2,2 | 0,111 |
| Myeloid differentiation primary response gene (88) | MYD88 | 1,3 | 0,112 |

| Gène | Abréviation | Ratio d'expression | p |
|---|-------------|--------------------|--------------|
| NLR family, apoptosis inhibitory protein | NAIP | -12,2 | 0,026 |
| Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1 | NFKB1 | 11,5 | 0,010 |
| Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha | NFKBIA | 6,5 | 0,018 |
| Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, beta | NFKBIB | 1,7 | 0,073 |
| NLR family, CARD domain containing 4 | NLRC4 | -2,3 | 0,069 |
| NLR family, CARD domain containing 5 | NLRC5 | 1,9 | 0,166 |
| NLR family, pyrin domain containing 1 | NLRP1 | 1,3 | 0,590 |
| NLR family, pyrin domain containing 12 | NLRP12 | Non amplifié | Non amplifié |
| NLR family, pyrin domain containing 3 | NLRP3 | -21,8 | 0,030 |
| NLR family, pyrin domain containing 4 | NLRP4 | Non amplifié | Non amplifié |
| NLR family, pyrin domain containing 5 | NLRP5 | Non amplifié | Non amplifié |
| NLR family, pyrin domain containing 6 | NLRP6 | Non amplifié | Non amplifié |
| NLR family, pyrin domain containing 9 | NLRP9 | 1,3 | 0,414 |
| NLR family member X1 | NLRX1 | -2,1 | 0,280 |
| Nucleotide-binding oligomerization domain containing 1 | NOD1 | -1,3 | 0,276 |
| Nucleotide-binding oligomerization domain containing 2 | NOD2 | -1,2 | 0,668 |
| Purinergic receptor P2X, ligand-gated ion channel, 7 | P2RX7 | 7,2 | 0,064 |
| Pannexin 1 | PANX1 | 2,9 | 0,017 |
| Phosphoprotein enriched in astrocytes 15 | PEA15 | 2,0 | 0,233 |
| Proline-serine-threonine phosphatase interacting protein 1 | PSTPIP1 | -13,0 | 0,029 |
| Prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase) | PTGS2 | 152,6 | 0,032 |
| PYD and CARD domain containing | PYCARD | -23,7 | 0,045 |
| PYD (pyrin domain) containing 1 | PYDC1 | 3,2 | 0,920 |
| Renal tumor antigen | MOK | -1,3 | 0,314 |
| V-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A (avian) | RELA | 2,2 | 0,045 |
| Receptor-interacting serine-threonine kinase 2 | RIPK2 | 9,5 | 0,023 |
| SGT1, suppressor of G2 allele of SKP1 (S. cerevisiae) | SUGT1 | 1,1 | 0,157 |
| TGF-beta activated kinase 1/MAP3K7 binding protein 1 | TAB1 | -1,6 | 0,038 |
| TGF-beta activated kinase 1/MAP3K7 binding protein 2 | TAB2 | 2,6 | 0,027 |
| Toll-interleukin 1 receptor (TIR) domain containing adaptor protein | TIRAP | -1,9 | 0,264 |
| Tumor necrosis factor | TNF | 7,6 | 0,110 |
| Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 11 | TNFSF11 | Non amplifié | Non amplifié |
| Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 14 | TNFSF14 | 1,4 | 0,350 |
| Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 4 | TNFSF4 | 38,7 | 0,006 |
| TNF receptor-associated factor 6 | TRAF6 | 1,6 | 0,121 |
| Thioredoxin interacting protein | TXNIP | -3,3 | 0,264 |
| X-linked inhibitor of apoptosis | XIAP | 2,4 | 0,041 |

L'analyse de l'expression différentielle des gènes a été réalisée selon la méthode de quantification relative ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) décrite par Livak *et al.* (Livak & Schmittgen, 2001). Le ratio d'expression ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) correspond à l'expression du gène normalisée par celle de cinq gènes de référence (β -actine, β -2-microglobuline, glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase, hypoxanthine phosphoribosyltransférase 1 et protéine ribosomale P0) ($2^{-\Delta Ct}$) dans le groupe test (cellules dendritiques avec *M. hominis* PG21) divisée par son expression normalisée ($2^{-\Delta Ct}$) dans le groupe contrôle (cellules dendritiques sans *M. hominis* PG21). Trois manipulations indépendantes ont été réalisées. Les lipoprotéines pour lesquelles le ratio est significatif sont surlignées en gris. Les valeurs p ont été calculées à partir des ΔCt selon un test de Student, indépendamment pour chaque gène, entre le groupe test et le groupe contrôle (Hellemans & Vandesompele, 2011). Une valeur de p inférieure à 0,05 était considérée comme significative.

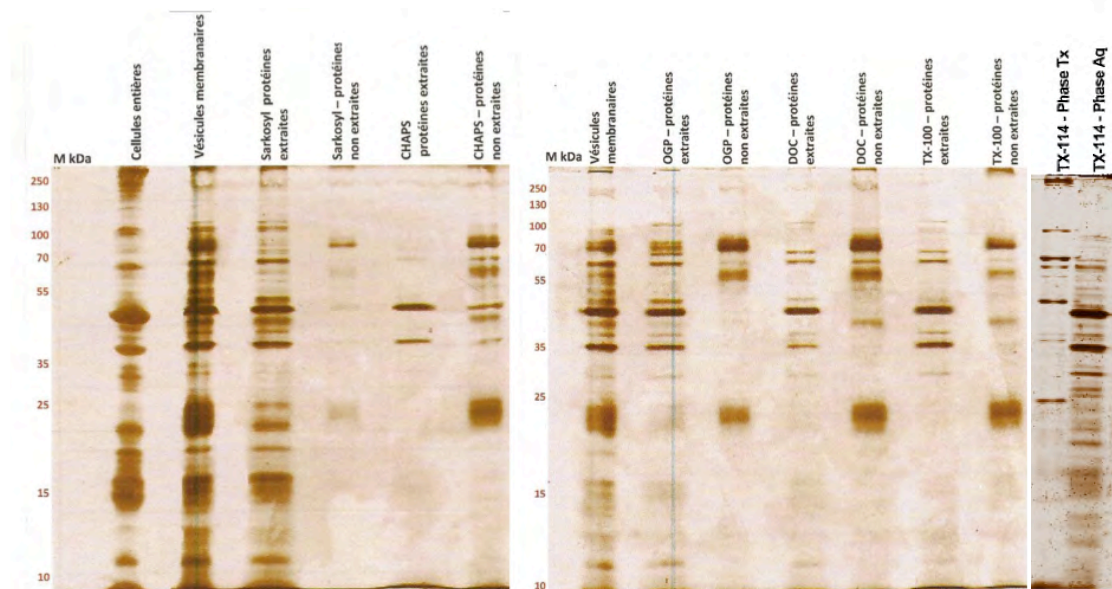


Figure 1. Profils électrophorétiques après extraction simple des vésicules membranaires avec les différents détergents. Gel de SDS-PAGE à 12,5% d'acrylamide/bisacrylamide et coloration au nitrate d'argent.

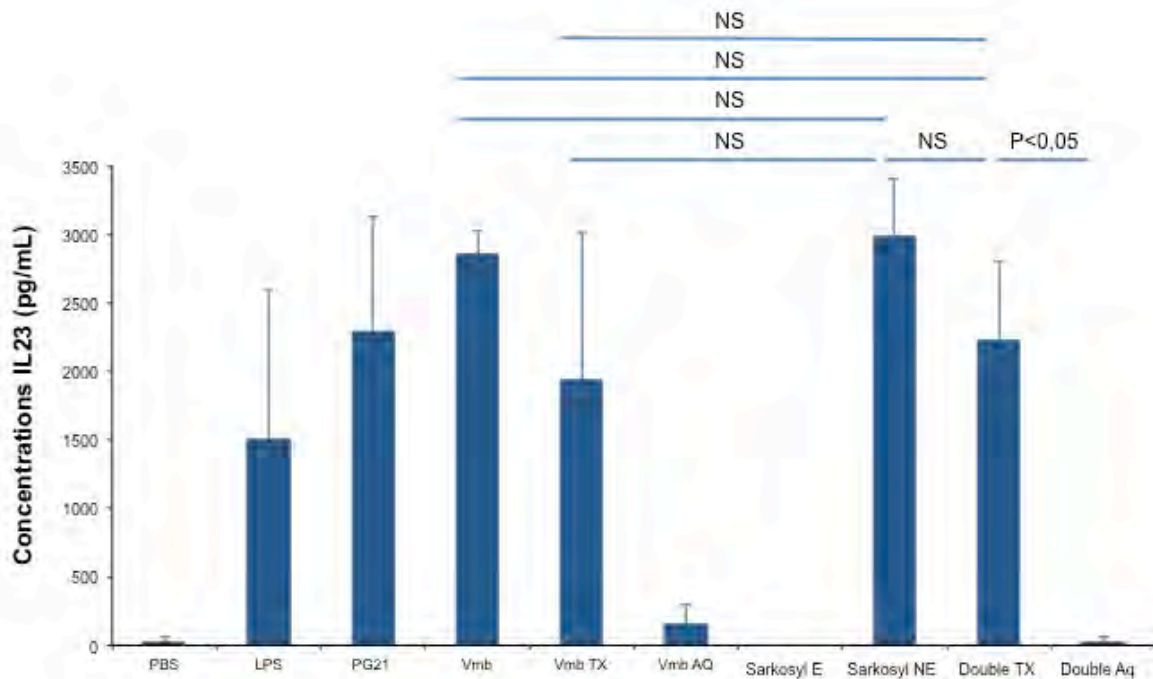


Figure 2. Co-incubation des cellules dendritiques avec les fractions obtenues par double extraction au sarkosyl puis au TX-114. Les hDCs ont été incubées 24 h à 37°C en présence des différentes fractions en milieu RPMI 1640 additionné de sérum de veau foetal. Les surnageants ont été collectés et la concentration en IL-23 déterminée par ELISA. Les données présentées correspondent à la valeur moyenne et à l'écart-type de trois manipulations indépendantes. PBS, témoin négatif ; LPS, témoin positif ; PG21, *M. hominis* entier ; Vmb, vésicules de membranes ; Vmb TX, phase TX de l'extrait simple TX-114 des vésicules de membrane ; Vmb AQ, phase aqueuse de l'extrait simple TX-114 des vésicules de membrane ; Sarkosyl E, protéines extraites par le sarkosyl à partir des vésicules de membrane ; Sarkosyl NE, protéines non extraites par le sarkosyl à partir des vésicules de membrane ; Double TX, phase TX d'extraction double (protéines non extraites par le sarkosyl traitées par le TX-114) ; Double AQ, phase aqueuse d'extraction double (protéines non extraites par le sarkosyl traitées par le TX-114). NS, statistiquement non significatif. $p < 0,05$, valeur significativement différente de celle obtenue avec le PBS selon un test Anova.

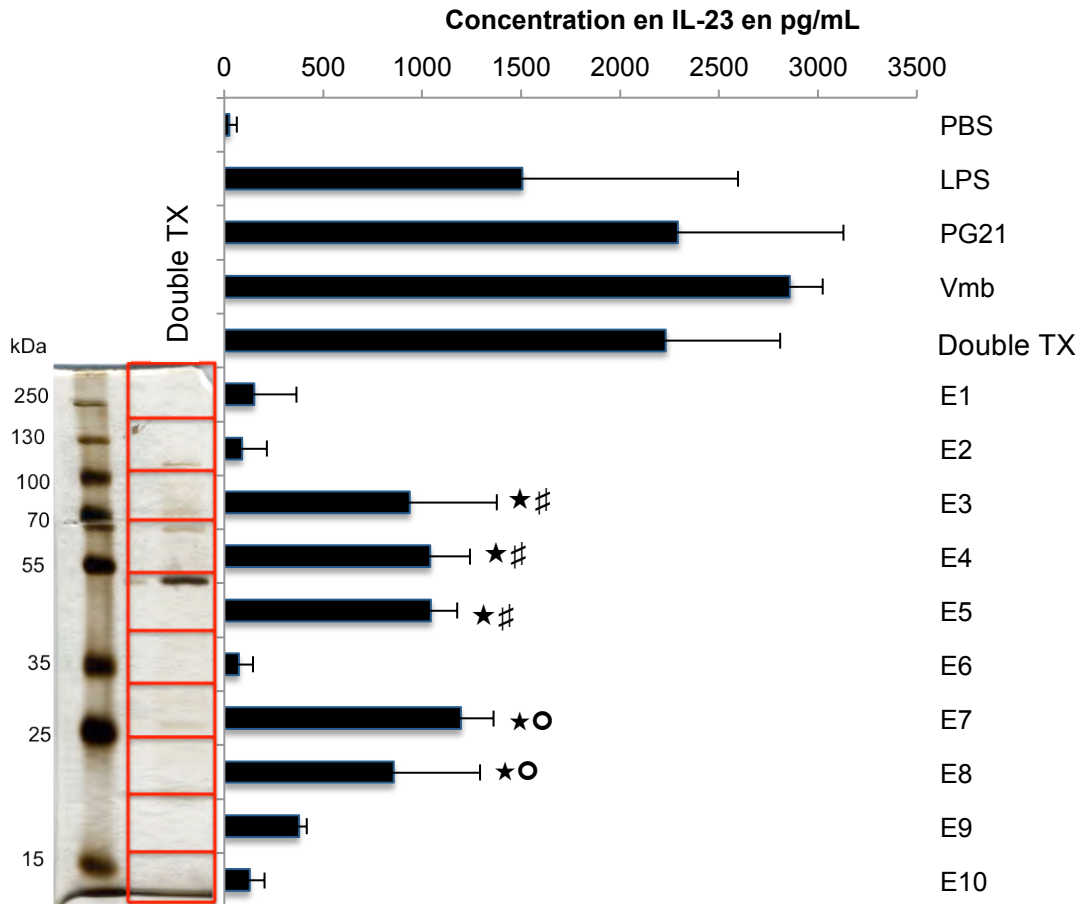


Figure 3. Séparation de la fraction issue de la double extraction Sarkosyl/TX-114 par SDS-PAGE 10% et production d'IL-23 par les éluats après co-culture avec les cellules dendritiques. Le gel présenté est un gel de référence coloré au nitrate d'argent où les bandes découpées sont représentées. Les éluats ont été réalisés sur un gel non coloré. Les éluats sont numérotés de E1 à E10 du dépôt vers le front de migration. Les bandes découpées ont été placées dans 400 μ L d'OG 50 mM à 100°C pendant 30 minutes avant précipitation dans 2,5 volumes d'acétone glacée pendant 24 h. Les cellules dendritiques ont été incubées 24 h à 37°C en présence des différents éluats en milieu RPMI 1640 additionné de sérum de veau foetal. Les surnageants ont été collectés et la concentration en IL-23 déterminée par ELISA. Les données présentées correspondent à la valeur moyenne et à l'écart-type de trois manipulations indépendantes. PG21, *M. hominis* PG21 ; PBS, témoin négatif ; LPS, témoin positif ; Vmb, vésicules de membranes et Double TX, phase TX d'extraction double (protéines non extraites par le sarkosyl traitées par le TX-114). Les valeurs * sont significativement différentes ($p < 0,05$) de celle obtenue avec le PBS. Les valeurs # sont significativement différentes ($p < 0,05$) de celles obtenues pour les éluats E2 et E6. Les valeurs O sont significativement différentes ($p < 0,05$) de celles obtenues avec les éluats E6 et E9. Les valeurs de p ont été calculées par des tests Anova.

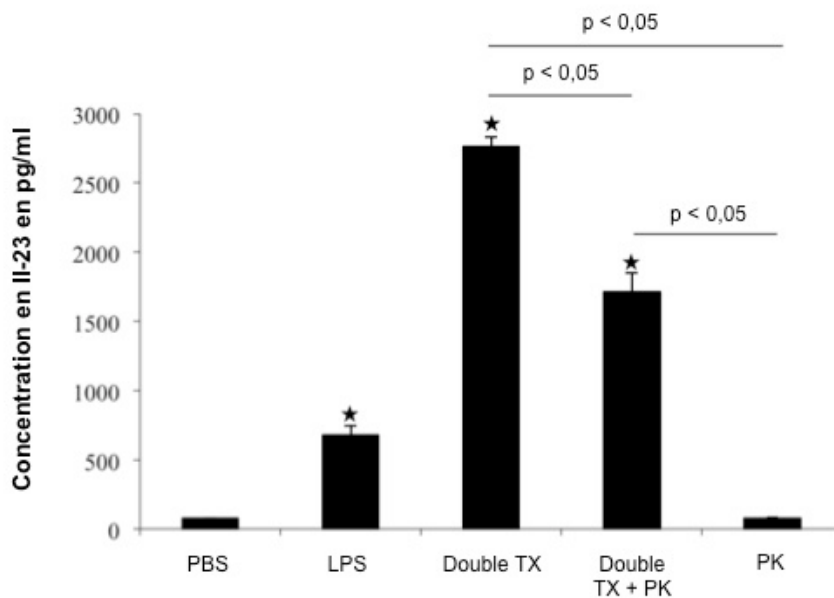


Figure 4. Action de la protéinase K sur l'activité immunomodulatrice du double extrait issu des vésicules membranaires de *M. hominis* PG21. Le double extrait appelé double TX correspond aux PNE par le Sarkosyl présentes dans la phase TX après extraction par le TX-114. Les cellules dendritiques ont été incubées 24 h à 37°C en présence des différentes fractions en milieu RPMI 1640 additionné de sérum de veau foetal. Les surnageants ont été collectés et la concentration en IL-23 déterminée par ELISA. Les données présentées correspondent à la valeur moyenne et à l'écart-type de trois manipulations indépendantes. Double TX, phase TX d'extraction double (protéines non extraites par le sarkosyl traitée par le TX-114). PK, protéinase K. Les valeurs * sont significativement différentes ($p < 0,05$) de celle obtenue avec le PBS selon un test Anova.

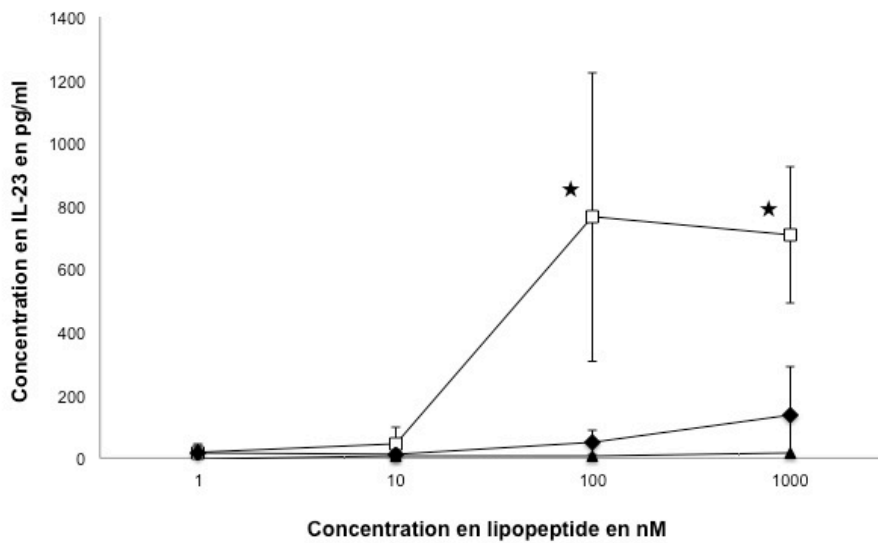


Figure 5. Production d'IL-23 par les cellules dendritiques humaines induite par le lipopeptides DSL-1 dérivé de *M. hominis* PG21 et FSL-1 dérivé de *M. salivarium*. Les cellules dendritiques ont été incubées 24 h à 37°C en présence des lipopeptides ou du PBS (témoin négatif). Les surnageants ont été collectés et la concentration en IL-23 déterminée par ELISA. Les données présentées correspondent à la valeur moyenne et à l'écart-type de quatre manipulations indépendantes. □, concentration en IL-23 induite par DSL-1. ◆, concentration en IL-23 induite par FSL-1. ▲, concentration en IL-23 induite par le PBS. Les valeurs ★ sont significativement différentes ($p < 0,05$) de celles obtenues avec les concentrations de 1 nM et de 10 nM de DSL-1 par un test Anova.

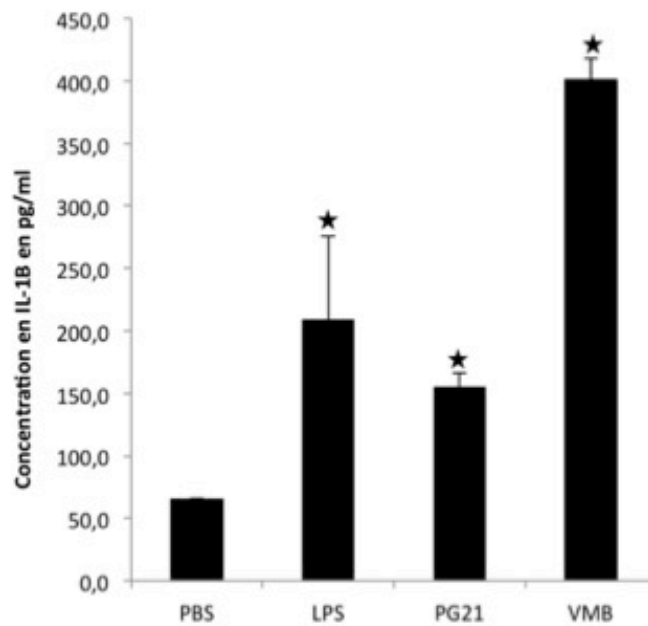


Figure 6. Production d'IL-1 β par les cellules dendritiques humaines induite par *M. hominis* PG21 et ses vésicules membranaires. Les cellules dendritiques ont été incubées 24 h à 37°C en présence des différentes fractions en milieu RPMI 1640 additionné de sérum de veau foetal. Les surnageants ont été collectés et la concentration en IL-1 β a été déterminée par ELISA. Les données présentées correspondent à la valeur moyenne et à l'écart-type de trois manipulations indépendantes. PBS, témoin négatif ; LPS, témoin positif ; PG21, *M. hominis* PG21 ; Vmb, vésicules de membranes. Les valeurs * sont significativement différentes ($p < 0,05$) de celles obtenues avec le PBS.

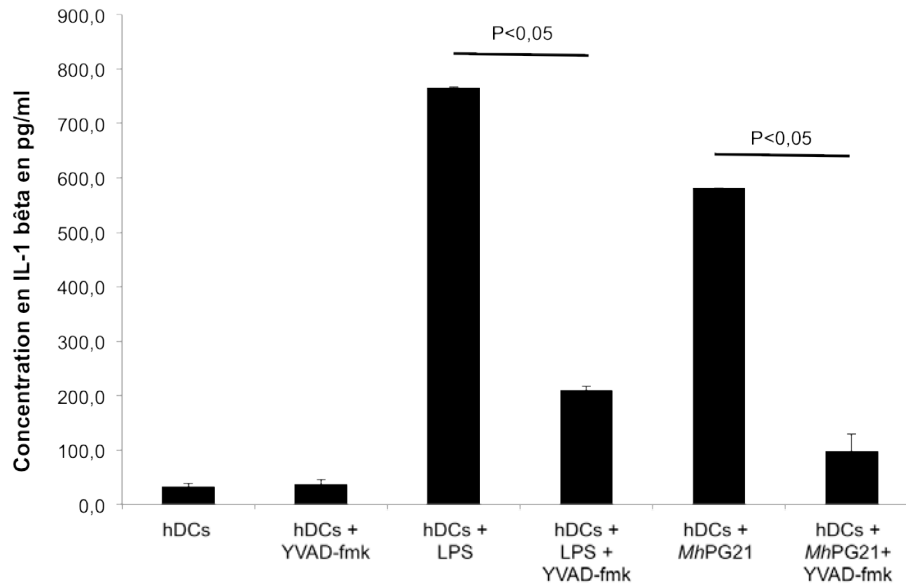


Figure 7. Production d'IL-1 β par les cellules dendritiques humaines induite par du LPS et *M. hominis* PG21 avec et sans inhibiteur de caspase. Les cellules dendritiques ont été incubées 24 h à 37°C en présence de LPS à 10 ng/ml et de *M. hominis* PG21 à 10⁸ UCC/ml en absence et en présence d'inhibiteur de caspase YVAD-fmk, à 40 μ M en milieu RPMI 1640 additionné de sérum de veau foetal. Les surnageants ont été collectés et la concentration en IL-1 β a été déterminée par ELISA. Les données présentées correspondent à la valeur moyenne et à l'écart-type d'une manipulation réalisée en duplicata. DC, cellule dendritique ; LPS, témoin positif ; PG21, *M. hominis* PG21. Les valeurs p sont significativement différentes ($p < 0,05$) de celles obtenues avec la co-culture sans inhibiteur selon un test Anova.

REFERENCES BIOBIOGRAPHIQUES

- Akazawa, T., N. Inoue, H. Shime, K. Kodama, M. Matsumoto & T. Seiya, (2010) Adjuvant engineering for cancer immunotherapy: Development of a synthetic TLR2 ligand with increased cell adhesion. *Cancer Sci.* 101: 1596-1603.
- Barre, A., A. de Daruvar & A. Blanchard, (2004) MolliGen, a database dedicated to the comparative genomics of *Mollicutes*. *Nucleic. Acids Res.* 32 Database issue: D307-D310.
- Bessler, W.G., M. Cox, A. Lex, B. Suhr, K.H. Wiesmuller & G. Jung, (1985) Synthetic lipopeptide analogs of bacterial lipoprotein are potent polyclonal activators for murine B lymphocytes. *J. Immunol.* 135: 1900-1905.
- Bose, S., J.A. Segovia, S.R. Somarajan, T.H. Chang, T.R. Kannan & J.B. Baseman, (2014) ADP-ribosylation of NLRP3 by *Mycoplasma pneumoniae* CARDS toxin regulates inflammasome activity. *mBio* 5.
- Brant, K.A. & J.P. Fabisiak, (2009) Nickel and the microbial toxin, MALP-2, stimulate proangiogenic mediators from human lung fibroblasts via a HIF-1alpha and COX-2-mediated pathway. *Toxicol. Sci.* 107: 227-237.
- Browning, G.F., M.S. Marenda, A.H. Noormohammadi & P.F. Markham, (2011) The central role of lipoproteins in the pathogenesis of mycoplasmoses. *Vet. Microbiol.* 153: 44-50.
- Chamberlain, L.H., (2004) Detergents as tools for the purification and classification of lipid rafts. *FEBS letters* 559: 1-5.
- Chen, T.R., (1977) In situ detection of mycoplasma contamination in cell cultures by fluorescent Hoechst 33258 stain. *Exp. Cell Res.* 104: 255-262.
- Christiansen, G., S.A. Ladefoged, S. Hauge, S. Birkelund & H. Andersen, (1990) Use of monoclonal antibodies for detection of gene and antigen variation in *Mycoplasma hominis*. *Int. J. Med. Microbiol. Suppl.* 20: 535-545.
- Cole, B.C., H.H. Mu, N.D. Pennock, A. Hasebe, F.V. Chan, L.R. Washburn & M.R. Peltier, (2005) Isolation and partial purification of macrophage- and dendritic cell-activating components from *Mycoplasma arthritidis*: association with organism virulence and involvement with Toll-like receptor 2. *Infect. Immun.* 73: 6039-6047.
- Dinarello, C.A., (2002) The IL-1 family and inflammatory diseases. *Clin. Exp. Rheumatol.* 20: S1-13.
- Goret, J., C. Le Roy, A. Touati, J. Mesureur, H. Renaudin, S. Claverol, C. Bébéar, L. Béven & S. Pereyre, (2015) Surface lipoproteome of *Mycoplasma hominis* PG21 and differential expression after contact with human dendritic cells. *Future Microbiol.* In press.

- Gurung, P., B. Li, R.K. Subbarao Malireddi, M. Lamkanfi, T.L. Geiger & T.D. Kanneganti, (2015) Chronic TLR Stimulation Controls NLRP3 Inflammasome Activation through IL-10 Mediated Regulation of NLRP3 Expression and Caspase-8 Activation. *Sci. Rep.* 5: 14488.
- Hasebe, A., H.H. Mu & B.C. Cole, (2014) A potential pathogenic factor from *Mycoplasma hominis* is a TLR2-dependent, macrophage-activating, P50-related adhesin. *Am. J. Reprod. Immunol.* 72: 285-295.
- Hasebe, A., H.H. Mu, L.R. Washburn, F.V. Chan, N.D. Pennock, M.L. Taylor & B.C. Cole, (2007) Inflammatory lipoproteins purified from a toxigenic and arthritogenic strain of *Mycoplasma arthritidis* are dependent on Toll-like receptor 2 and CD14. *Infect. Immun.* 75: 1820-1826.
- He, J., X. You, Y. Zeng, M. Yu, L. Zuo & Y. Wu, (2009) *Mycoplasma genitalium*-derived lipid-associated membrane proteins activate NF-kappaB through Toll-like receptors 1, 2, and 6 and CD14 in a MyD88-dependent pathway. *Clin. Vaccine Immunol.* 16: 1750-1757.
- Hellemans, J. & J. Vandesompele, (2011) qPCR data analysis - unlocking the secret to successful results. *PCR Troubleshooting and Optimization: The Essential Guide*: 1-13.
- Into, T., J. Dohkan, M. Inomata, M. Nakashima, K. Shibata & K. Matsushita, (2007) Synthesis and characterization of a dipalmitoylated lipopeptide derived from paralogous lipoproteins of *Mycoplasma pneumoniae*. *Infect. Immun.* 75: 2253-2259.
- Khare, S., A. Dorfleutner, N.B. Bryan, C. Yun, A.D. Radian, L. de Almeida, Y. Rojanasakul & C. Stehlik, (2012) An NLRP7-containing inflammasome mediates recognition of microbial lipopeptides in human macrophages. *Immunity* 36: 464-476.
- Laemmli, U., (1970) Cleavage of structural protein during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Lemos, H.P., R. Grespan, S.M. Vieira, T.M. Cunha, W.A. Verri, Jr., K.S. Fernandes, F.O. Souto, I.B. McInnes, S.H. Ferreira, F.Y. Liew & F.Q. Cunha, (2009) Prostaglandin mediates IL-23/IL-17-induced neutrophil migration in inflammation by inhibiting IL-12 and IFNgamma production. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106: 5954-5959.
- Liu, Y.C., I.H. Lin, W.J. Chung, W.S. Hu, W.V. Ng, C.Y. Lu, T.Y. Huang, H.W. Shu, K.J. Hsiao, S.F. Tsai, C.H. Chang & C.H. Lin, (2012) Proteomics characterization of cytoplasmic and lipid-associated membrane proteins of human pathogen *Mycoplasma fermentans* M64. *PLoS one* 7: e35304.
- Livak, K.J. & T.D. Schmittgen, (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC(T)} Method. *Methods* 25: 402-408.

- London, E. & D.A. Brown, (2000) Insolubility of lipids in Triton X-100: physical origin and relationship to sphingolipid/cholesterol membrane domains (rafts). *Biochimica et biophysica acta* 1508: 182-195.
- Metzger, J.W., A.G. Beck-Sickinger, M. Loleit, M. Eckert, W.G. Bessler & G. Jung, (1995) Synthetic S-(2,3-dihydroxypropyl)-cysteinyl peptides derived from the N-terminus of the cytochrome subunit of the photoreaction centre of *Rhodospseudomonas viridis* enhance murine splenocyte proliferation. *J. Pept. Sci.* 1: 184-190.
- Mitsunari, M., S. Yoshida, T. Shoji, S. Tsukihara, T. Iwabe, T. Harada & N. Terakawa, (2006) Macrophage-activating lipopeptide-2 induces cyclooxygenase-2 and prostaglandin E(2) via Toll-like receptor 2 in human placental trophoblast cells. *J. Reprod. Immunol.* 72: 46-59.
- Muhlradt, P.F. & M. Frisch, (1994) Purification and partial biochemical characterization of a *Mycoplasma fermentans*-derived substance that activates macrophages to release nitric oxide, tumor necrosis factor, and interleukin-6. *Infect. Immun.* 62: 3801-3807.
- Muhlradt, P.F., M. Kiess, H. Meyer, R. Sussmuth & G. Jung, (1997) Isolation, structure elucidation, and synthesis of a macrophage stimulatory lipopeptide from *Mycoplasma fermentans* acting at picomolar concentration. *J. Exp. Med.* 185: 1951-1958.
- Muhlradt, P.F., M. Kiess, H. Meyer, R. Sussmuth & G. Jung, (1998) Structure and specific activity of macrophage-stimulating lipopeptides from *Mycoplasma hyorhinis*. *Infect. Immun.* 66: 4804-4810.
- Okusawa, T., M. Fujita, J. Nakamura, T. Into, M. Yasuda, A. Yoshimura, Y. Hara, A. Hasebe, D.T. Golenbock, M. Morita, Y. Kuroki, T. Ogawa & K. Shibata, (2004) Relationship between structures and biological activities of mycoplasmal diacylated lipopeptides and their recognition by Toll-like receptors 2 and 6. *Infect. Immun.* 72: 1657-1665.
- Peltier, M.R., A.J. Freeman, H.H. Mu & B.C. Cole, (2005) Characterization and partial purification of a macrophage-stimulating factor from *Mycoplasma hominis*. *Am. J. Reprod. Immunol.* 54: 342-351.
- Pereyre, S. & C.M. Bébéar, (2012) Infections à *Mycoplasma hominis*. In: *Encycl. Méd. Chir., Maladies infectieuses*. Elsevier (ed).
- Pereyre, S., P. Sirand-Pugnet, L. Béven, A. Charron, H. Renaudin, A. Barre, P. Avenaud, D. Jacob, A. Couloux, V. Barbe, A. de Daruvar, A. Blanchard & C. Bébéar, (2009) Life on arginine for *Mycoplasma hominis*: clues from its minimal genome and comparison with other human urogenital mycoplasmas. *PLoS genetics* 5: e1000677.
- Regula, J.T., G. Boguth, A. Gorg, J. Hegermann, F. Mayer, R. Frank & R. Herrmann, (2001) Defining the mycoplasma 'cytoskeleton': the protein composition of the Triton X-100

- insoluble fraction of the bacterium *Mycoplasma pneumoniae* determined by 2-D gel electrophoresis and mass spectrometry. *Microbiology* 147: 1045-1057.
- Rottem, S. & S. Razin, (1973) Membrane lipids of *Mycoplasma hominis*. *J. Bacteriol.* 113: 565-571.
- Shibata, K., A. Hasebe, T. Into, M. Yamada & T. Watanabe, (2000) The N-terminal lipopeptide of a 44-kDa membrane-bound lipoprotein of *Mycoplasma salivarium* is responsible for the expression of intercellular adhesion molecule-1 on the cell surface of normal human gingival fibroblasts. *J. Immunol.* 165: 6538-6544.
- Shimizu, T., Y. Kida & K. Kuwano, (2007) Triacylated lipoproteins derived from *Mycoplasma pneumoniae* activate NF-kappaB through Toll-like receptors 1 and 2. *Immunology* 121: 473-483.
- Shimizu, T., Y. Kida & K. Kuwano, (2008a) A triacylated lipoprotein from *Mycoplasma genitalium* activates NF-kappaB through Toll-like receptor 1 (TLR1) and TLR2. *Infect. Immun.* 76: 3672-3678.
- Shimizu, T., Y. Kida & K. Kuwano, (2008b) *Ureaplasma parvum* lipoproteins, including MB antigen, activate NF-kappaB through TLR1, TLR2 and TLR6. *Microbiology* 154: 1318-1325.
- Shimizu, T., Y. Kida & K. Kuwano, (2011) Cytoadherence-dependent induction of inflammatory responses by *Mycoplasma pneumoniae*. *Immunology* 133: 51-61.
- Sokolowska, M., L.Y. Chen, Y. Liu, A. Martinez-Anton, H.Y. Qi, C. Logun, S. Alsaaty, Y.H. Park, D.L. Kastner, J.J. Chae & J.H. Shelhamer, (2015) Prostaglandin E2 inhibits NLRP3 inflammasome activation through EP4 receptor and intracellular cyclic AMP in human macrophages. *J. Immunol.* 194: 5472-5487.
- Sugiyama, M., A. Saeki, A. Hasebe, R. Kamesaki, Y. Yoshida, Y. Kitagawa, T. Suzuki & K. Shibata, (2015) Activation of inflammasomes in dendritic cells and macrophages by *Mycoplasma salivarium*. *Mol. Oral Microbiol.* In press.
- Truchetet, M.E., L. Béven, H. Renaudin, I. Douchet, C. Ferandon, A. Charron, P. Blanco, T. Schaefferbeke, C. Contin-Bordes & C. Bébéar, (2011) Potential role of *Mycoplasma hominis* in interleukin (IL)-17-producing CD4+ T-cell generation via induction of IL-23 secretion by human dendritic cells. *J. Infect. Dis.* 204: 1796-1805.
- van Kuppeveld, F.J., J.T. van der Logt, A.F. Angulo, M.J. van Zoest, W.G. Quint, H.G. Niesters, J.M. Galama & W.J. Melchers, (1992) Genus- and species-specific identification of mycoplasmas by 16S rRNA amplification. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 2606-2615.

- Waites, K.B., C.M. Béb  ar, J.A. Roberston, D.F. Talkington & G.E. Kenny, (2001) Cumitech 34, Laboratory diagnosis of mycoplasmal infections. In: Cumitech. F.S. Nolte (ed). Washington D. C.: American Society for Microbiology.
- Waites, K.B., R.L. Schelonka, L. Xiao, P.L. Grigsby & M.J. Novy, (2009) Congenital and opportunistic infections: *Ureaplasma* species and *Mycoplasma hominis*. *Semin. Fetal Neonatal. Med.* 14: 190-199.
- Xu, Y., H. Li, W. Chen, X. Yao, Y. Xing, X. Wang, J. Zhong & G. Meng, (2013) *Mycoplasma hyorhinis* activates the NLRP3 inflammasome and promotes migration and invasion of gastric cancer cells. *PloS one* 8: e77955.

DONNÉES SUPPLÉMENTAIRES

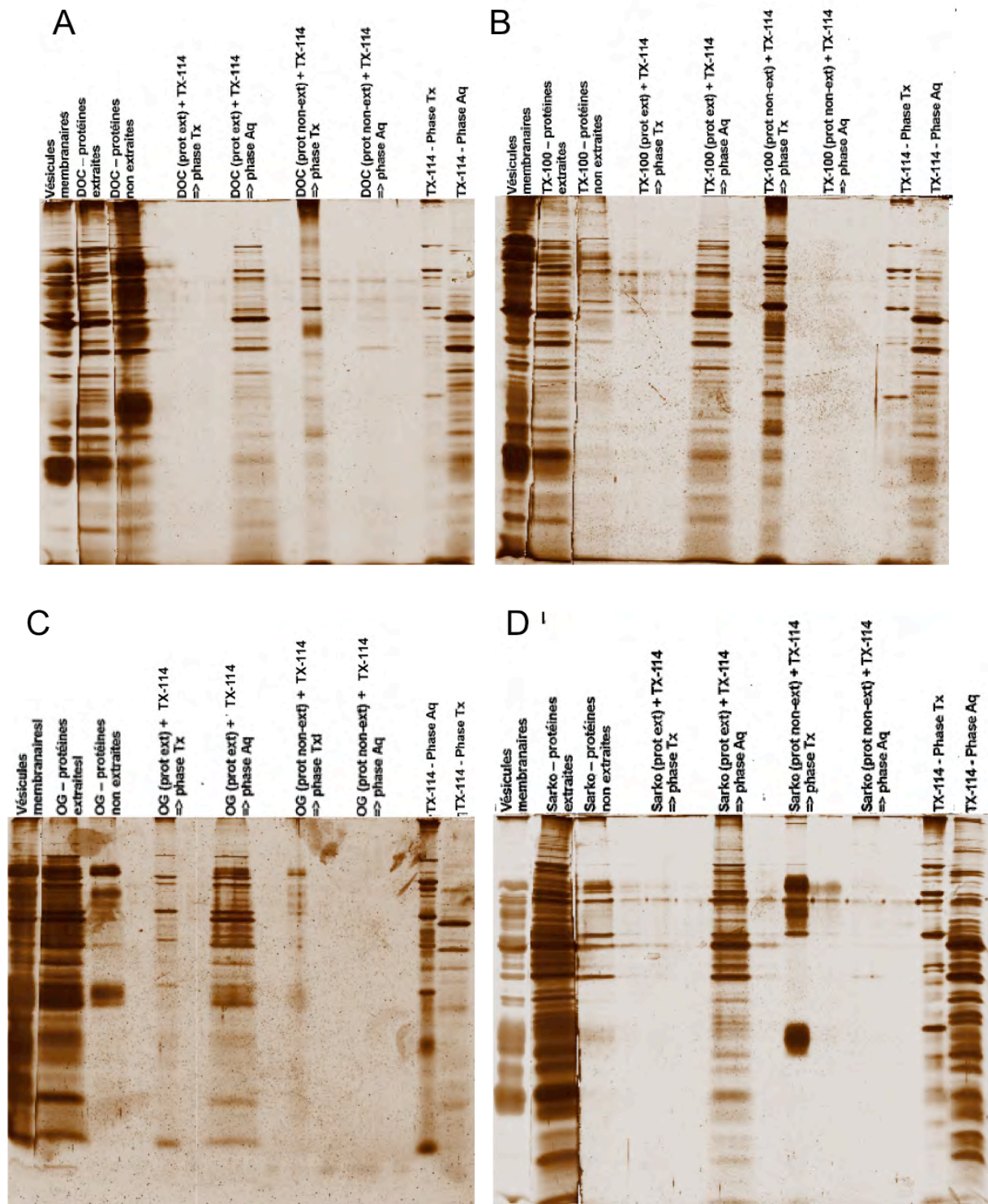


Figure S1. Profils électrophorétiques obtenus après extraction double des vésicules membranaires avec le DOC (A), le TX-100 (B), l'OG (C) ou le sarkosyl (D) puis le TX-114. Gel de SDS-PAGE à 12,5% d'acrylamide/bisacrylamide et coloration au nitrate d'argent.

DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Pour étudier les lipoprotéines de *M. hominis* impliquées dans l'interaction avec la cellule hôte, le contenu lipoprotéique de *M. hominis* PG1 a été évalué ainsi que les variations transcriptionnelles des gènes codant pour les lipoprotéines après contact avec les hDCs. Comme *M. hominis* se retrouve principalement dans le tractus uro-génital humain où il se fixe à des cellules épithéliales, nous souhaitons également évaluer l'expression des gènes des lipoprotéines lorsque la bactérie est incubée avec ce type de cellules. La co-incubation de *M. hominis* avec des cellules HeLa, lignée de cellules épithéliales humaines issue d'un cancer du col de l'utérus, a déjà été rapportée pour évaluer les voies de signalisation engagées par ces cellules lors de la stimulation de ces cellules par *M. hominis* (Hopfe *et al.*, 2013). *M. hominis* pouvant aussi être retrouvé au niveau des liquides articulaires dans le cas d'arthrites, nous serions intéressé par réaliser une co-incubation de la bactérie avec des cellules synoviales cultivées à partir de biopsies articulaires et extraites par l'utilisation de collagenase. Cette technique dérivée de l'isolement des fibroblastes cutanés (Vangipuram *et al.*, 2013) est réalisée à l'UMR CNRS 5164 de l'Université de Bordeaux et ce travail sera effectué en collaboration avec cette équipe. Nous pourrions ainsi comparer l'expression différentielle des lipoprotéines selon le type de cellules hôtes et identifier quelles sont les lipoprotéines qui favorisent la colonisation et l'infection de ces cellules.

Par ailleurs, notre laboratoire a précédemment montré que six souches de *M. hominis* isolées de liquides synoviaux de patients atteints de maladies rhumatologiques (arthrite septique, psoriasis rhumatoïde, ostéoarthrite) et qu'une souche isolée d'endométrite stimulaient les hDCs avec des ratio IL-23/IL-12 différents (Truchetet *et al.*, 2011). Ce ratio était significativement plus faible pour les souches isolées d'arthrose et plus élevé pour la souche isolée d'endométrite que pour *M. hominis* PG21. Il était significativement plus élevé pour la souche issue d'un patient hypogammaglobulinémique présentant une arthrite. La comparaison des profils électrophorétiques de ces différents isolats après une simple extraction au TX-114 a montré des différences dans le nombre et l'intensité des bandes (données non montrées). Nous envisageons que certaines lipoprotéines pourraient être différemment exprimées selon les souches et que cette expression différentielle pourrait être liée au pouvoir pathogène de la souche. La stratégie d'identification des lipoprotéines par spectrométrie de masse que nous avons utilisée nécessite de connaître le génome complet des souches considérées. Le séquençage et l'annotation des sept isolats cliniques préalablement étudiés étant actuellement en cours au laboratoire, nous souhaitons appliquer notre méthode de double extraction et d'identification par spectrométrie de masse sur ces

isolats et évaluer s'il existe des différences dans les lipoprotéines qu'ils expriment. Nous souhaitons aussi utiliser notre technique de qRT-PCR pour vérifier si nous retrouvons les mêmes variations de l'expression des lipoprotéines chez ces isolats cliniques lors de la co-incubation avec les hDCs.

Dans cette étude, nous avons synthétisé un lipopeptide bioactif, appelé DSL-1 et correspondant à la fraction N-terminale de la lipoprotéine MHO_4720, qui a la capacité de stimuler de façon dose-dépendante la production d'IL-23 par les hDCs. Parallèlement, nous avons caractérisé la réponse immunitaire innée des hDCs en démontrant l'activation d'inflammasome(s) par la mise en évidence de la production d'IL-1 β lors du contact avec le mycoplasme entier. Khare *et al.* (Khare *et al.*, 2012) ont décrit l'activation de l'inflammasome NLRP7 chez des cellules monocytaires humaines THP-1 par des lipopeptides dérivés des mycoplasmes, FSL-1 de *M. salivairum* et MALP-2 de *M. fermentans*. De la même façon, nous souhaitons mesurer la production d'IL-1 β lors de la co-incubation des hDCs avec DSL-1 afin de savoir si ce lipopeptide peut aussi activer les voies de l'inflammasome comme le fait *M. hominis* PG21 entier.

L'analyse par PCR array des voies de signalisation impliquées dans l'activation de(s) inflammasome(s) ne nous a pas permis d'identifier le récepteur de type NLR qui activerait la caspase 5 et qui induirait la production d'IL-1 β . En effet, si nous avons observé une diminution de l'expression de NLRP3 après 24 h de co-incubation des hDCs avec *M. hominis*, les autres récepteurs NLRs étudiés ne présentaient pas de régulation de leur expression. Deux explications sont possibles : soit nous n'avons pas réussi à identifier le récepteur de l'inflammasome activé par *M. hominis*, soit il s'agit de NLRP3 mais celui-ci est réprimé après 24h de co-incubation. En effet, Gurung *et al.* (Gurung *et al.*, 2015) ont observé que la capacité d'activation de NLRP3 par le LPS était transitoire et que l'activation de la production d'IL-1 β par des monocytes murins stimulés par du LPS pouvait varier selon le temps de contact du LPS avec les cellules. Alors qu'une stimulation brève (<4h) par le LPS activait l'inflammasome, une exposition prolongée (priming de 12 à 24 heures) inhibait l'activation de NLRP3 chez ces cellules. L'IL-10 était induite et agissait de façon autocrine pour diminuer l'expression de NLRP3. Dans nos expériences, la stimulation des hDCs par *M. hominis* est longue (24h), et pourrait donc expliquer l'inhibition de l'expression de NLRP3 et de la protéine adaptatrice ASC (PYCARD) que nous observons. De plus, nous avons montré précédemment que *M. hominis* PG21 induisait aussi la production d'IL-10 après 24 h de co-incubation avec des hDCs (Truchetet *et al.*, 2011), suggérant encore une possible activation d'un système de régulation. Nous envisageons donc de réaliser une évaluation

cinétique de l'expression des gènes impliqués dans les voies de l'inflammasome après 4 h, 8h et 12h de co-incubation, pour évaluer la régulation des voies de signalisation engagées, notamment l'expression de NLRP3. La cinétique de libération de l'IL-1 β pourra également être réalisée dans les mêmes conditions de temps par la mesure en ELISA de la concentration en IL-1 β dans les surnageants de co-culture de *M. hominis* PG21 avec les hDCs. De plus, tous les récepteurs de l'inflammasome n'étaient pas étudiés par la technique de PCR array utilisée. En particulier, le gène codant pour NLRP7 n'était pas présent sur la plaque Human Inflammasomes PCR Array. Comme mentionné précédemment, l'activation de l'inflammasome NLRP7 chez des monocytes humains THP-1 par des lipopeptides synthétiques Pam₂CSK4 et Pam₃CSK4, des lipopeptides dérivés de mycoplasmes, FSL-1, MALP-2, et par *Acholeplasma laidlawii* a été décrite (Khare *et al.*, 2012). *M. hominis* pourrait ainsi activer la production d'IL-1 β via NLRP7. La détermination de l'expression du gène de NLRP7 devra donc être réalisée lors de la co-incubation de *M. hominis* avec les hDCs. Des amorces ont été dessinées pour évaluer cette expression par qRT-PCR. Par ailleurs, d'autres NLRs pourraient être impliqués dans l'induction de la production d'IL-1 β . En particulier, l'expression de la protéine AIM2 pourrait être régulée car la valeur de p est proche de la significativité (p=0,057). AIM2 est un récepteur qui se lie à l'ADN double brin cytosolique à partir de diverses sources (bactérien, viral, cellulaire), indépendamment de leur séquence ou de leur contenu en G+C%, grâce à un domaine C-terminal HIN. Xu *et al.* (Xu *et al.*, 2013) ont ainsi montré que *M. hyorhinitis* vivant, traité à la chaleur ou aux UV induisait la production d'IL-1 β et d'IL-18 chez des cellules THP-1 par l'activation de l'inflammasome NLRP3 et partiellement par la liaison directe de l'ADN du mycoplasme à AIM2. L'activation du NLRP7 n'a pas été analysée dans cette étude. *M. hominis* pourrait donc aussi activer la production d'IL-1 β via la fixation de son ADN sur AIM2. Des manipulations supplémentaires de PCR array ou de qRT-PCR devront donc être réalisées pour évaluer avec une plus forte précision statistique l'expression de AIM2.

Une fois le ou les récepteur(s) NLRs identifié(s), leur implication pourra être confirmée par l'inhibition de leur expression avec des petits ARN interférents pouvant se lier spécifiquement à leur séquence d'ARN messager. Dans le cas des shRNA (small hairpin RNA) que nous souhaitons utiliser, la séquence codant pour l'ARN interférent sera clonée dans un vecteur lentiviral qui permettra une intégration stable de la construction dans le génome des cellules infectées et donc une expression durable du shRNA. Nous souhaitons développer des ARN interférents pour les NLRs identifiés par PCR array (tels que NLRP3, NLRP7 et AIM2) mais également pour les protéines adaptatrices ASC et la caspase 5. Les hDCs seront transfectées à l'aide du shRNA avant la co-incubation avec *M. hominis* PG21 et

une diminution de la production d'IL-1 β mesurée dans les surnageants de co-incubation affirmera le rôle de la protéine inhibée. Ce travail sera effectué en collaboration avec la Plateforme de Vectorologie de l'Université de Bordeaux. Une demande d'agrément OGM est actuellement en cours. Des shRNA du TLR2 pourront également être utilisés pour évaluer son rôle dans l'induction de la transcription de la pro-IL-1 β et de la pro-IL-18 via le NF- κ B comme cela a été démontré pour *Acholeplasma laidlawii* sur les cellules THP-1 (Khare *et al.*, 2012). En effet, dans cette étude, le silencing de TLR2 avait montré une diminution partielle de la production d'IL-1 β .

En conclusion, l'étude de l'interaction de *M. hominis* avec les hDCs a été abordée dans cette thèse par deux approches, l'étude des lipoprotéines immunomodulatrices exprimées par *M. hominis* PG21 et différenciellement exprimées lors de l'interaction avec la cellule hôte d'une part, et l'étude de la réponse immunitaire innée des hDCs d'autre part. La poursuite de ces deux approches complémentaires devrait permettre de mieux appréhender dans le futur la physiopathologie de ce pathogène génital humain.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abdel-Haq, N., B. Asmar & W. Brown,** (2002) *Mycoplasma hominis* scalp abscess in the newborn. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 21: 1171-1173.
- Aderem, A. & R.J. Ulevitch,** (2000) Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature* 406: 782-787.
- Al Masalma, M., M. Drancourt, H. Dufour, D. Raoult & P.E. Fournier,** (2011) *Mycoplasma hominis* brain abscess following uterus curettage: a case report. *J. Med. Case Rep.* 5: 278.
- al-Daccak, R., K. Mehindate, J. Hebert, L. Rink, S. Mecheri & W. Mourad,** (1994) *Mycoplasma arthritidis*-derived superantigen induces proinflammatory monokine gene expression in the THP-1 human monocytic cell line. *Infect. Immun.* 62: 2409-2416.
- Allen-Daniels, M.J., M.G. Serrano, L.P. Pflugner, J.M. Fettweis, M.A. Prestosa, V.N. Koparde, J.P. Brooks, J.F. Strauss, 3rd, R. Romero, T. Chaiworapongsa, D.A. Eschenbach, G.A. Buck & K.K. Jefferson,** (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.
- Alonso-Vega, C., N. Wauters, D. Vermeulen, M.F. Muller & E. Serruys,** (1997) A fatal case of *Mycoplasma hominis* meningoencephalitis in a full-term newborn. *J. Clin. Microbiol.* 35: 286-287.
- Asanuma, M., K. Kurokawa, R. Ichikawa, K.H. Ryu, J.H. Chae, N. Dohmae, B.L. Lee & H. Nakayama,** (2011) Structural evidence of alpha-aminoacylated lipoproteins of *Staphylococcus aureus*. *FEBS J.* 278: 716-728.
- Baczynska, A., H.F. Svenstrup, J. Fedder, S. Birkelund & G. Christiansen,** (2004) Development of real-time PCR for detection of *Mycoplasma hominis*. *BMC Microbiol.* 4: 35.
- Baier, J. & T.E. Kruger,** (2000) Induction of monocyte chemoattractant protein-1 by *Mycoplasma hominis* in respiratory epithelial cells. *J. Investig. Med.* 48: 457-464.
- Banchereau, J. & R.M. Steinman,** (1998) Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392: 245-252.
- Barbera, J., I. Gasser, B. Almirante & C. Pigrau,** (1995) Postpartum retroperitoneal abscess due to *Mycoplasma hominis*. *Clin. Infect. Dis.* 21: 698-699.
- Bayraktar, M.R., I.H. Ozerol, N. Gucluer & O. Celik,** (2010) Prevalence and antibiotic susceptibility of *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* in pregnant women. *Int. J. Infect. Dis.* 14: e90-95.
- Bébéar, C. & C.M. Bébéar,** (2007) Infections humaines à mycoplasmes. *Revue Francophone des Laboratoires.* 391: 63-69.
- Bébéar, C. & R. Quentin,** (2015) *Mycoplasma* spp. In: REMIC. Société Française de Microbiologie, pp. 559-566.
- Bébéar, C.M.,** (2006) *Mycoplasma, Ureaplasma*. In: AntibioGramme. P. Courvalin, R. Leclercq & E. Bingen. Paris: ESKA, pp. 491-500.
- Bébéar, C.M., B. de Barbeyrac, S. Pereyre, H. Renaudin, M. Clerc & C. Bébéar,** (2008) Activity of moxifloxacin against the urogenital mycoplasmas *Ureaplasma* spp., *Mycoplasma hominis* and *Mycoplasma genitalium* and *Chlamydia trachomatis*. *Clin. Microbiol. Infect.* 14: 801-805.
- Bébéar, C.M. & I. Kempf,** (2005) Antimicrobial therapy and antimicrobial resistance. In: *Mycoplasmas molecular biology pathogenicity and strategies for control*. A. Blanchard & G.F. Browning. Norfolk: Horizon bioscience, pp. 535-568.
- Bébéar, C.M., H. Renaudin, A. Charron, M. Clerc, S. Pereyre & C. Bébéar,** (2003) DNA gyrase and topoisomerase IV mutations in clinical isolates of *Ureaplasma* spp. and

- Mycoplasma hominis* resistant to fluoroquinolones. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47: 3323-3325.
- Bessler, W.G., M. Cox, A. Lex, B. Suhr, K.H. Wiesmuller & G. Jung**, (1985) Synthetic lipopeptide analogs of bacterial lipoprotein are potent polyclonal activators for murine B lymphocytes. *J. Immunol.* 135: 1900-1905.
- Bhugra, B., L.L. Voelker, N. Zou, H. Yu & K. Dybvig**, (1995) Mechanism of antigenic variation in *Mycoplasma pulmonis*: interwoven, site-specific DNA inversions. *Mol. Microbiol.* 18: 703-714.
- Blanchard, A., A. Yanez, K. Dybvig, H.L. Watson, G. Griffiths & G.H. Cassell**, (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.
- Boesen, T., J. Emmersen, L.T. Jensen, S.A. Ladefoged, P. Thorsen, S. Birkelund & G. Christiansen**, (1998) The *Mycoplasma hominis* *vaa* gene displays a mosaic gene structure. *Mol. Microbiol.* 29: 97-110.
- Bose, S., J.A. Segovia, S.R. Somarajan, T.H. Chang, T.R. Kannan & J.B. Baseman**, (2014) ADP-ribosylation of NLRP3 by *Mycoplasma pneumoniae* CARDS toxin regulates inflammasome activity. *mBio* 5.
- Botos, I., D.M. Segal & D.R. Davies**, (2011) The structural biology of Toll-like receptors. *Structure* 19: 447-459.
- Braun, V. & K. Rehn**, (1969) Chemical characterization, spatial distribution and function of a lipoprotein (murein-lipoprotein) of the *E. coli* cell wall. The specific effect of trypsin on the membrane structure. *Eur. J. Biochem.* 10: 426-438.
- Braun, V. & H.C. Wu**, (1994) *New comprehensive biochemistry: bacterial cell wall*. Elsevier, p. 319-341.
- Browning, G.F., M.S. Marena, A.H. Noormohammadi & P.F. Markham**, (2011) The central role of lipoproteins in the pathogenesis of mycoplasmoses. *Vet. Microbiol.* 153: 44-50.
- Butler, S.E., P. Augostini & W.E. Secor**, (2010) *Mycoplasma hominis* infection of *Trichomonas vaginalis* is not associated with metronidazole-resistant trichomoniasis in clinical isolates from the United States. *Parasitol. Res.* 107: 1023-1027.
- Calcutt, M.J. & M.F. Foeking**, (2015a) Analysis of the complete *Mycoplasma hominis* LBD-4 genome sequence reveals strain-variable prophage insertion and distinctive repeat-containing surface protein arrangements. *Genome Announc.* 3.
- Calcutt, M.J. & M.F. Foeking**, (2015b) Complete genome sequence of *Mycoplasma hominis* strain Sprott (ATCC 33131), isolated from a patient with nongonococcal urethritis. *Genome Announc.* 3.
- Cao, B., S. Wang, Z. Tian, P. Hu, L. Feng & L. Wang**, (2015) DNA microarray characterization of pathogens associated with sexually transmitted diseases. *PLoS one.* 10: e0133927.
- Capoccia, R., G. Greub & D. Baud**, (2013) *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma hominis* and adverse pregnancy outcomes. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 26: 231-240.
- Cecchini, K.R., T.S. Gorton & S.J. Geary**, (2007) Transcriptional responses of *Mycoplasma gallisepticum* strain R in association with eukaryotic cells. *J. Bacteriol.* 189: 5803-5807.
- Chakir, H., H. Wang, D.E. Lefebvre, J. Webb & F.W. Scott**, (2003) T-bet/GATA-3 ratio as a measure of the Th1/Th2 cytokine profile in mixed cell populations: predominant role of GATA-3. *J. Immunol. Methods.* 278: 157-169.
- Chambaud, I., H. Wroblewski & A. Blanchard**, (1999) Interactions between mycoplasma lipoproteins and the host immune system. *Trends Microbiol.* 7: 493-499.
- Chanock, R.M., L. Hayflick & M.F. Barile**, (1962) Growth on artificial medium of an agent associated with atypical pneumonia and its identification as a PPLO. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 48: 41-49.

- Chatenoud, L.**, (2008) Les récepteurs de l'immunité innée. In: Immunologie. Flammarion, pp. 34-47.
- Chernov, V.M., O.V. Gorshkov, O.A. Chernova, N.B. Baranova, T.A. Akopian & M.V. Trushin**, (2005) Variability of the Vaa cytoadhesin genes in clinical isolates of *Mycoplasma hominis*. *New Microbiol.* 28: 373-376.
- Choe, H.S., D.S. Lee, S.J. Lee, S.H. Hong, D.C. Park, M.K. Lee, T.H. Kim & Y.H. Cho**, (2013) Performance of Anyplex II multiplex real-time PCR for the diagnosis of seven sexually transmitted infections: comparison with currently available methods. *Int. J. Infect. Dis.* 17: e1134-1140.
- Choi, S.J., S.D. Park, I.H. Jang, Y. Uh & A. Lee**, (2012) The prevalence of vaginal microorganisms in pregnant women with preterm labor and preterm birth. *Ann. Lab. Med.* 32: 194-200.
- Christiansen, G., H. Andersen, S. Birkelund & E.A. Freundt**, (1987) Genomic and gene variation in *Mycoplasma hominis* strains. *Isr. J. Med. Sci.* 23: 595-602.
- Christiansen, G., S.A. Ladefoged, S. Hauge, S. Birkelund & H. Andersen**, (1990) Use of monoclonal antibodies for detection of gene and antigen variation in *Mycoplasma hominis*. *Int. J. Med. Microbiol. Suppl.* 20: 535-545.
- Christiansen, G., S.L. Mathiesen, C. Nyvold & S. Birkelund**, (1994) Analysis of a *Mycoplasma hominis* membrane protein, P120. *FEMS Microbiol. Lett.* 121: 121-127.
- Citti, C., L.X. Nouvel & E. Baranowski**, (2010) Phase and antigenic variation in mycoplasmas. *Future Microbiol.* 5: 1073-1085.
- Citti, C., R. Watson-McKown, M. Drosse & K.S. Wise**, (2000) Gene families encoding phase- and size-variable surface lipoproteins of *Mycoplasma hyorhinitis*. *J. Bacteriol.* 182: 1356-1363.
- Citti, C. & K.S. Wise**, (1995) *Mycoplasma hyorhinitis* vlp gene transcription: critical role in phase variation and expression of surface lipoproteins. *Mol. Microbiol.* 18: 649-660.
- Clough, W., G.H. Cassell, L.B. Duffy, R.Z. Rinaldi, R. Bluestone, M.A. Morgan & R.D. Meyer**, (1992) Septic arthritis and bacteremia due to *Mycoplasma* resistant to antimicrobial therapy in a patient with systemic lupus erythematosus. *Clin. Infect. Dis.* 15: 402-407.
- Cole, B.C., K.E. Aldridge & J.R. Ward**, (1977) *Mycoplasma*-dependent activation of normal lymphocytes: mitogenic potential of mycoplasmas for mouse lymphocytes. *Infect. Immun.* 18: 393-399.
- Cole, B.C., H.H. Mu, N.D. Pennock, A. Hasebe, F.V. Chan, L.R. Washburn & M.R. Peltier**, (2005) Isolation and partial purification of macrophage- and dendritic cell-activating components from *Mycoplasma arthritidis*: association with organism virulence and involvement with Toll-like receptor 2. *Infect. Immun.* 73: 6039-6047.
- Cowen, B.S. & S.C. Smith**, (1972) Nuclease activities of *Mycoplasma gallisepticum* as a function of culture age in different media. *J. Bacteriol.* 109: 21-24.
- Crouse, D.T., B.K. English, L. Livingston & E.A. Meals**, (1998) Genital mycoplasmas stimulate tumor necrosis factor-alpha and inducible nitric oxide synthase production from a murine macrophage cell line. *Pediatr. Res.* 44: 785-790.
- Dammann, O., E.N. Allred, D.R. Genest, R.B. Kundsin & A. Leviton**, (2003) Antenatal mycoplasma infection, the fetal inflammatory response and cerebral white matter damage in very-low-birthweight infants. *Paediatr. Perinat. Epidemiol.* 17: 49-57.
- Davis, K.L. & K.S. Wise**, (2000) Surface proteolysis determines variable posttranslational processing in the biogenesis of the immunomodulatory MALP-2 lipopeptide of *Mycoplasma fermentans*. In: IOM. Fukuoka, Japon, pp. 55.
- Dégrange, S., H. Renaudin, A. Charron, C. Bébéar & C.M. Bébéar**, (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. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52: 742-744.
- Dessi, D., G. Delogu, E. Emonte, M.R. Catania, P.L. Fiori & P. Rappelli**, (2005) Long-term survival and intracellular replication of *Mycoplasma hominis* in *Trichomonas vaginalis*

- cells: potential role of the protozoon in transmitting bacterial infection. *Infect. Immun.* 73: 1180-1186.
- Dessi, D., P. Rappelli, N. Diaz, P. Cappuccinelli & P.L. Fiori**, (2006) *Mycoplasma hominis* and *Trichomonas vaginalis*: a unique case of symbiotic relationship between two obligate human parasites. *Front. Biosci.* 11: 2028-2034.
- Di Musto, J.C., O. Bohjalian & M. Millar**, (1973) *Mycoplasma hominis* type I infection and pregnancy. *Obstet. Gynecol.* 41: 33-37.
- Diaz, N., D. Dessi, S. Dessole, P.L. Fiori & P. Rappelli**, (2010) Rapid detection of coinfections by *Trichomonas vaginalis*, *Mycoplasma hominis*, and *Ureaplasma urealyticum* by a new multiplex PCR. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 67: 30-36.
- Dillon, B.J., F.W. Holtsberg, C.M. Ensor, J.S. Bomalaski & M.A. Clark**, (2002) Biochemical characterization of the arginine degrading enzymes arginase and arginine deiminase and their effect on nitric oxide production. *Med. Sci. Monit.* 8: BR248-253.
- Donders, G.G., K. Van Calsteren, G. Bellen, R. Reybrouck, T. Van den Bosch, I. Riphagen & S. Van Lierde**, (2009) Predictive value for preterm birth of abnormal vaginal flora, bacterial vaginosis and aerobic vaginitis during the first trimester of pregnancy. *BJOG.* 116: 1315-1324.
- Driessen, A.J., P. Fekkes & J.P. van der Wolk**, (1998) The Sec system. *Curr. Opin. Microbiol.* 1: 216-222.
- Driessen, A.J., E.H. Manting & C. van der Does**, (2001) The structural basis of protein targeting and translocation in bacteria. *Nat. Struct. Biol.* 8: 492-498.
- Duan, H., L. Qu & C. Shou**, (2014) *Mycoplasma hyorhinis* induces epithelial-mesenchymal transition in gastric cancer cell MGC803 via TLR4-NF-kappaB signaling. *Cancer Lett.* 354: 447-454.
- Eaton, M.D., G. Meiklejohn & W. van Herick**, (1944) Studies on the etiology of primary atypical pneumonia : a filterable agent transmissible to cotton rats, hamsters, and chick embryos. *J. Exp. Med.* 79: 649-668.
- Eisenbarth, S.C. & R.A. Flavell**, (2009) Innate instruction of adaptive immunity revisited: the inflammasome. *EMBO Mol. Med.* 1: 92-98.
- Eitel, J., N. Suttorp & B. Opitz**, (2010) Innate immune recognition and inflammasome activation in listeria monocytogenes infection. *Front. Microbiol.* 1: 149.
- Erdile, L.F., M.A. Brandt, D.J. Warakowski, G.J. Westrack, A. Sadziene, A.G. Barbour & J.P. Mays**, (1993) Role of attached lipid in immunogenicity of *Borrelia burgdorferi* OspA. *Infect. Immun.* 61: 81-90.
- Falquet, L., M. Pagni, P. Bucher, N. Hulo, C.J. Sigrist, K. Hofmann & A. Bairoch**, (2002) The PROSITE database, its status in 2002. *Nuc. Acids Res.* 30: 235-238.
- Férandon, C., O. Peuchant, C. Janis, A. Benard, H. Renaudin, S. Pereyre & C. Bébéar**, (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.
- Fiori, P.L., N. Diaz, A.R. Cocco, P. Rappelli & D. Dessi**, (2013) Association of *Trichomonas vaginalis* with its symbiont *Mycoplasma hominis* synergistically upregulates the *in vitro* proinflammatory response of human monocytes. *Sex Transm. Infect.* 89: 449-454.
- Liew, F.Y., D. Xu, E.K. Brint & L.A. O'Neill**, (2005) Negative regulation of Toll-like receptor-mediated immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* 5: 446-458.
- Fraser, C.M., J.D. Gocayne, O. White, M.D. Adams, R.A. Clayton, R.D. Fleischmann, C.J. Bult, A.R. Kerlavage, G. Sutton, J.M. Kelley & et al.**, (1995) The minimal gene complement of *Mycoplasma genitalium*. *Science* 270: 397-403.
- Furr, P.M. & D. Taylor-Robinson**, (1993) The contrasting effects of progesterone and oestrogen on the susceptibility of mice to genital infection with *Mycoplasma pulmonis*. *J. Med. Microbiol.* 38: 160-165.

- Gerosa, F., B. Baldani-Guerra, L.A. Lyakh, G. Batoni, S. Esin, R.T. Winkler-Pickett, M.R. Consolaro, M. De Marchi, D. Giachino, A. Robbiano, M. Astegiano, A. Sambataro, R.A. Kastelein, G. Carra & G. Trinchieri, (2008)** Differential regulation of interleukin 12 and interleukin 23 production in human dendritic cells. *J. Exp. Med.* 205: 1447-1461.
- Gewitz, M., R. Dinwiddie, L. Rees, O. Volikas, T. Yuille, B. O'Connell & W.C. Marshall, (1979)** *Mycoplasma hominis*. A cause of neonatal meningitis. *Arch. Dis. Child.* 54: 231-233.
- Gibson, D.G., G.A. Benders, C. Andrews-Pfannkoch, E.A. Denisova, H. Baden-Tillson, J. Zaveri, T.B. Stockwell, A. Brownley, D.W. Thomas, M.A. Algire, C. Merryman, L. Young, V.N. Noskov, J.I. Glass, J.C. Venter, C.A. Hutchison, 3rd & H.O. Smith, (2008)** Complete chemical synthesis, assembly, and cloning of a *Mycoplasma genitalium* genome. *Science* 319: 1215-1220.
- Glass, J.I., N. Assad-Garcia, N. Alperovich, S. Yooseph, M.R. Lewis, M. Maruf, C.A. Hutchison, 3rd, H.O. Smith & J.C. Venter, (2006)** Essential genes of a minimal bacterium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103: 425-430.
- Glew, M.D., N. Baseggio, P.F. Markham, G.F. Browning & I.D. Walker, (1998)** Expression of the *pMGA* genes of *Mycoplasma gallisepticum* is controlled by variation in the GAA trinucleotide repeat lengths within the 5' noncoding regions. *Infect. Immun.* 66: 5833-5841.
- Glew, M.D., G.F. Browning, P.F. Markham & I.D. Walker, (2000a)** *pMGA* phenotypic variation in *Mycoplasma gallisepticum* occurs *in vivo* and is mediated by trinucleotide repeat length variation. *Infect. Immun.* 68: 6027-6033.
- Glew, M.D., M. Marendia, R. Rosengarten & C. Citti, (2002)** Surface diversity in *Mycoplasma agalactiae* is driven by site-specific DNA inversions within the *vpma* multigene locus. *J. Bacteriol.* 184: 5987-5998.
- Glew, M.D., L. Papazisi, F. Poumarat, D. Bergonier, R. Rosengarten & C. Citti, (2000b)** Characterization of a multigene family undergoing high-frequency DNA rearrangements and coding for abundant variable surface proteins in *Mycoplasma agalactiae*. *Infect. Immun.* 68: 4539-4548.
- Gong, M., L. Meng, B. Jiang, J. Zhang, H. Yang, J. Wu & C. Shou, (2008)** p37 from *Mycoplasma hyorhinis* promotes cancer cell invasiveness and metastasis through activation of MMP-2 and followed by phosphorylation of EGFR. *Mol. Cancer Ther.* 7: 530-537.
- Goodison, S., K. Nakamura, K.A. Iczkowski, S. Anai, S.K. Boehlein & C.J. Rosser, (2007)** Exogenous mycoplasmal p37 protein alters gene expression, growth and morphology of prostate cancer cells. *Cytogenet. Genome Res.* 118: 204-213.
- Grosjean, H., M. Breton, P. Sirand-Pugnet, F. Tardy, F. Thiaucourt, C. Citti, A. Barre, S. Yoshizawa, D. Fourmy, V. de Crecy-Lagard & A. Blanchard, (2014)** Predicting the minimal translation apparatus: lessons from the reductive evolution of mollicutes. *PLoS genetics* 10: e1004363.
- Haanen, J.B. & T.N. Schumacher, (2007)** Vaccine leads to memory loss. *Nat. Med.* 13: 248-250.
- Hagar, J.A., D.A. Powell, Y. Aachoui, R.K. Ernst & E.A. Miao, (2013)** Cytoplasmic LPS activates caspase-11: implications in TLR4-independent endotoxic shock. *Science* 341: 1250-1253.
- Hahn, R.G. & G.E. Kenny, (1974)** Differences in arginine requirement for growth among arginine-utilizing *Mycoplasma* species. *J. Bacteriol.* 117: 611-618.
- Hallamaa, K.M., S.L. Tang, N. Ficorilli & G.F. Browning, (2008)** Differential expression of lipoprotein genes in *Mycoplasma pneumoniae* after contact with human lung epithelial cells, and under oxidative and acidic stress. *BMC Microbiol.* 8: 124.
- Hantke, K. & V. Braun, (1973)** Covalent binding of lipid to protein. Diglyceride and amide-linked fatty acid at the N-terminal end of the murein-lipoprotein of the *Escherichia coli* outer membrane. *Eur. J. Biochem.* 34: 284-296.

- Hardy, R.D., J.J. Coalson, J. Peters, A. Chaparro, C. Techasaensiri, A.M. Cantwell, T.R. Kannan, J.B. Baseman & P.H. Dube**, (2009) Analysis of pulmonary inflammation and function in the mouse and baboon after exposure to *Mycoplasma pneumoniae* CARDS toxin. *PLoS one* 4: e7562.
- Hasebe, A., H.H. Mu & B.C. Cole**, (2014) A potential pathogenic factor from *Mycoplasma hominis* is a TLR2-dependent, macrophage-activating, P50-related adhesin. *Am. J. Reprod. Immunol.* 72: 285-295.
- Hata, A., Y. Honda, K. Asada, Y. Sasaki, T. Kenri & D. Hata**, (2008) *Mycoplasma hominis* meningitis in a neonate: case report and review. *J. Infect.* 57: 338-343.
- He, J., X. You, Y. Zeng, M. Yu, L. Zuo & Y. Wu**, (2009) *Mycoplasma genitalium*-derived lipid-associated membrane proteins activate NF- κ B through Toll-like receptors 1, 2, and 6 and CD14 in a MyD88-dependent pathway. *Clin. Vaccine Immunol.* 16: 1750-1757.
- Henrich, B., M. Hopfe, A. Kitzerow & U. Hadding**, (1999) The adherence-associated lipoprotein P100, encoded by an *opp* operon structure, functions as the oligopeptide-binding domain OppA of a putative oligopeptide transport system in *Mycoplasma hominis*. *J. Bacteriol.* 181: 4873-4878.
- Herbelin, A., E. Ruuth, D. Delorme, C. Michel-Herbelin & F. Praz**, (1994) *Mycoplasma arginini* TUH-14 membrane lipoproteins induce production of interleukin-1, interleukin-6, and tumor necrosis factor alpha by human monocytes. *Infect. Immun.* 62: 4690-4694.
- Hillier, S.L., R.P. Nugent, D.A. Eschenbach, M.A. Krohn, R.S. Gibbs, D.H. Martin, M.F. Cotch, R. Edelman, J.G. Pastorek, 2nd, A.V. Rao & et al.**, (1995) Association between bacterial vaginosis and preterm delivery of a low-birth-weight infant. The Vaginal Infections and Prematurity Study Group. *N. Engl. J. Med.* 333: 1737-1742.
- Himmelreich, R., H. Hilbert, H. Plagens, E. Pirkl, B.C. Li & R. Herrmann**, (1996) Complete sequence analysis of the genome of the bacterium *Mycoplasma pneumoniae*. *Nuc. Acids Res.* 24: 4420-4449.
- Hjelm, E., G. Jonsell, T. Linglof, P.A. Mardh, B. Moller & G. Sedin**, (1980) Meningitis in a newborn infant caused by *Mycoplasma hominis*. *Acta Paediatr. Scand.* 69: 415-418.
- Hopfe, M., R. Deenen, D. Degrandi, K. Kohrer & B. Henrich**, (2013) Host cell responses to persistent mycoplasmas--different stages in infection of HeLa cells with *Mycoplasma hominis*. *PLoS one* 8: e54219.
- Hopfe, M. & B. Henrich**, (2004) OppA, the substrate-binding subunit of the oligopeptide permease, is the major Ecto-ATPase of *Mycoplasma hominis*. *J. Bacteriol.* 186: 1021-1028.
- Hopfe, M. & B. Henrich**, (2008) OppA, the ecto-ATPase of *Mycoplasma hominis* induces ATP release and cell death in HeLa cells. *BMC Microbiol.* 8: 55.
- Hopfe, M., R. Hoffmann & B. Henrich**, (2004) P80, the HinT interacting membrane protein, is a secreted antigen of *Mycoplasma hominis*. *BMC Microbiol.* 4.
- Hos, N.J., C. Bauer, T. Liebig, G. Plum, H. Seifert & J. Hampl**, (2015) Autoinfection as a cause of postpartum subdural empyema due to *Mycoplasma hominis*. *Infection* 43: 241-244.
- Hutchings, M.I., T. Palmer, D.J. Harrington & I.C. Sutcliffe**, (2009) Lipoprotein biogenesis in Gram-positive bacteria: knowing when to hold 'em, knowing when to fold 'em. *Trends Microbiol.* 17: 13-21.
- Ilinskaya, O.N., Y.V. Sokurenko, V.V. Ulyanova, V.I. Vershinina, P.V. Zelenikhin, A.I. Kolpakov, E.S. Medvedeva, N.B. Baranova, M.N. Davidova & A.A. Mouzykantov**, (2014) Ribonucleolytic activity of mycoplasmas. *Mikrobiologiya* 83: 320-327.
- Inouye, S., S. Wang, J. Sekizawa, S. Halegoua & M. Inouye**, (1977) Amino acid sequence for the peptide extension on the prolipoprotein of the *Escherichia coli* outer membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 74: 1004-1008.
- Into, T., K. Kiura, M. Yasuda, H. Kataoka, N. Inoue, A. Hasebe, K. Takeda, S. Akira & K. Shibata**, (2004) Stimulation of human Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR6 with

membrane lipoproteins of *Mycoplasma fermentans* induces apoptotic cell death after NF-kappa B activation. *Cell. Microbiol.* 6: 187-199.

- Ito, S., T. Tsuchiya, M. Yasuda, S. Yokoi, M. Nakano & T. Deguchi,** (2012) Prevalence of genital mycoplasmas and ureaplasmas in men younger than 40 years-of-age with acute epididymitis. *Int. J. Urol.* 19: 234-238.
- Iverson-Cabral, S.L., S.G. Astete, C.R. Cohen, E.P. Rocha & P.A. Totten,** (2006) Intrastrain heterogeneity of the *mgpB* gene in *Mycoplasma genitalium* is extensive *in vitro* and *in vivo* and suggests that variation is generated via recombination with repetitive chromosomal sequences. *Infect. Immun.* 74: 3715-3726.
- Iverson-Cabral, S.L., S.G. Astete, C.R. Cohen & P.A. Totten,** (2007) *mgpB* and *mgpC* sequence diversity in *Mycoplasma genitalium* is generated by segmental reciprocal recombination with repetitive chromosomal sequences. *Mol. Microbiol.* 66: 55-73.
- Jan, G., C. Fontenelle, M. Le Henaff & H. Wroblewski,** (1995) Acylation and immunological properties of *Mycoplasma gallisepticum* membrane proteins. *Res. Microbiol.* 146.
- Jensen, L.T., S. Ladefoged, S. Birkelund & G. Christiansen,** (1995) Selection of *Mycoplasma hominis* PG21 deletion mutants by cultivation in the presence of monoclonal antibody 552. *Infect. Immun.* 63: 3336-3347.
- Jin, T., A. Perry, P. Smith, J. Jiang & T.S. Xiao,** (2013) Structure of the absent in melanoma 2 (AIM2) pyrin domain provides insights into the mechanisms of AIM2 autoinhibition and inflammasome assembly. *J. Biol. Chem.* 288: 13225-13235.
- Johansson, K.E. & B. Pettersson,** (2002) Taxonomy of *Mollicutes*. In: Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. S. Razin & R. Herrmann. London: Kluwer Academic/Plenum Publishers, pp. 1-29.
- Josefowicz, S.Z., L.F. Lu & A.Y. Rudensky,** (2012) Regulatory T cells: mechanisms of differentiation and function. *Annu. Rev. Immunol.* 30: 531-564.
- Josien, R.,** (2008) Les cellules dendritiques. In: Immunologie. Flammarion, pp. 96-107.
- Kacerovsky, M., M. Pavlovsky & J. Tosner,** (2009) Preterm premature rupture of the membranes and genital mycoplasmas. *Acta Medica (Hradec Kralove)* 52: 117-120.
- Kayagaki, N., M.T. Wong, I.B. Stowe, S.R. Ramani, L.C. Gonzalez, S. Akashi-Takamura, K. Miyake, J. Zhang, W.P. Lee, A. Muszynski, L.S. Forsberg, R.W. Carlson & V.M. Dixit,** (2013) Noncanonical inflammasome activation by intracellular LPS independent of TLR4. *Science* 341: 1246-1249.
- Ketcham, C.M., S. Anai, R. Reutzel, S. Sheng, S.M. Schuster, R.B. Brenes, M. Agbandje-McKenna, R. McKenna, C.J. Rosser & S.K. Boehlein,** (2005) p37 Induces tumor invasiveness. *Mol. Cancer Ther.* 4: 1031-1038.
- Khare, S., A. Dorfleutner, N.B. Bryan, C. Yun, A.D. Radian, L. de Almeida, Y. Rojanasakul & C. Stehlik,** (2012) An NLRP7-containing inflammasome mediates recognition of microbial lipopeptides in human macrophages. *Immunity* 36: 464-476.
- Kim, M., G. Kim, R. Romero, S.S. Shim, E.C. Kim & B.H. Yoon,** (2003) Biovar diversity of *Ureaplasma urealyticum* in amniotic fluid: distribution, intrauterine inflammatory response and pregnancy outcomes. *J. Perinat. Med.* 31: 146-152.
- Kirchner, L., H. Helmer, G. Heinze, M. Wald, M. Brunbauer, M. Weninger & D. Zakhun,** (2007) Amnionitis with *Ureaplasma urealyticum* or other microbes leads to increased morbidity and prolonged hospitalization in very low birth weight infants. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 134: 44-50.
- Kirk, N. & I. Kovar,** (1987) *Mycoplasma hominis* meningitis in a preterm infant. *J. Infect.* 15: 109-110.
- Koshiba, H., A. Koshiba, Y. Daimon, T. Noguchi, K. Iwasaku & J. Kitawaki,** (2011) Hematoma and abscess formation caused by *Mycoplasma hominis* following cesarean section. *Int. J. Womens Health* 3: 15-18.
- Kovacs-Simon, A., R.W. Titball & S.L. Michell,** (2011) Lipoproteins of bacterial pathogens. *Infect. Immun.* 79: 548-561.

- Krasteva, I., A. Liljander, A. Fischer, D.G. Smith, N.F. Inglis, M. Scacchia, A. Pini, J. Jores & F. Sacchini**, (2014) Characterization of the *in vitro* core surface proteome of *Mycoplasma mycoides subsp. mycoides*, the causative agent of contagious bovine pleuropneumonia. *Vet. Microbiol.* 168: 116-123.
- Kruger, T. & J. Baier**, (1997) Induction of neutrophil chemoattractant cytokines by *Mycoplasma hominis* in alveolar type II cells. *Infect. Immun.* 65: 5131-5136.
- Kurokawa, K., H. Lee, K.B. Roh, M. Asanuma, Y.S. Kim, H. Nakayama, A. Shiratsuchi, Y. Choi, O. Takeuchi, H.J. Kang, N. Dohmae, Y. Nakanishi, S. Akira, K. Sekimizu & B.L. Lee**, (2009) The Ttriacylated ATP binding cluster transporter substrate-binding lipoprotein of *Staphylococcus aureus* functions as a native ligand for Toll-like Receptor 2. *J. Biol. Chem.* 284: 8406-8411.
- Kurokawa, K., K.H. Ryu, R. Ichikawa, A. Masuda, M.S. Kim, H. Lee, J.H. Chae, T. Shimizu, T. Saitoh, K. Kuwano, S. Akira, N. Dohmae, H. Nakayama & B.L. Lee**, (2012) Novel bacterial lipoprotein structures conserved in low-GC content gram-positive bacteria are recognized by Toll-like receptor 2. *J. Biol. Chem.* 287: 13170-13181.
- Kweon, O.J., J.H. Choi, U.H. Song & A.J. Park**, (2015) Performance evaluation of a DNA chip assay in the identification of major genitourinary pathogens. *J. Microbiol. Methods.* 109: 117-122.
- Ladefoged, S.A., S. Birkelund, S. Hauge, B. Brock, L.T. Jensen & G. Christiansen**, (1995) A 135-kilodalton surface antigen of *Mycoplasma hominis* PG21 contains multiple directly repeated sequences. *Infect. Immun.* 63: 212-223.
- Ladefoged, S.A. & G. Christiansen**, (1992) Physical and genetic mapping of the genomes of five *Mycoplasma hominis* strains by pulsed-field gel electrophoresis. *J. Bacteriol.* 174: 2199-2207.
- Ladefoged, S.A. & G. Christiansen**, (1998) *Mycoplasma hominis* expresses two variants of a cell-surface protein, one a lipoprotein, and one not. *Microbiology* 144 (Pt 3): 761-770.
- Ladefoged, S.A., S. Hauge, H. Andersen, S. Birkelund & G. Christiansen**, (1990) Use of monoclonal antibodies for detection of antigen variation in *Mycoplasma hominis*. *Int. J. Med. Microbiol. Suppl.* 20: 634-639.
- Ladefoged, S.A., L.T. Jensen, B. Brock, S. Birkelund & G. Christiansen**, (1996) Analysis of 0.5-kilobase-pair repeats in the *Mycoplasma hominis Imp* gene system and identification of gene products. *J. Bacteriol.* 178: 2775-2784.
- Lamont, R.F., D. Taylor-Robinson, J.S. Wigglesworth, P.M. Furr, R.T. Evans & M.G. Elder**, (1987) The role of mycoplasmas, ureaplasmas and chlamydiae in the genital tract of women presenting in spontaneous early preterm labour. *J. Med. Microbiol.* 24: 253-257.
- Latz, E., T.S. Xiao & A. Stutz**, (2013) Activation and regulation of the inflammasomes. *Nat. Rev. Immunol.* 13: 397-411.
- Lechmann, M., S. Berchtold, J. Hauber & A. Steinkasserer**, (2002a) CD83 on dendritic cells: more than just a marker for maturation. *Trends Immunol.* 23: 273-275.
- Lechmann, M., D.J. Krooshoop, D. Dudziak, E. Kremmer, C. Kuhnt, C.G. Figdor, G. Schuler & A. Steinkasserer**, (2001) The extracellular domain of CD83 inhibits dendritic cell-mediated T cell stimulation and binds to a ligand on dendritic cells. *J. Exp. Med.* 194: 1813-1821.
- Lechmann, M., E. Zinser, A. Golka & A. Steinkasserer**, (2002b) Role of CD83 in the immunomodulation of dendritic cells. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 129: 113-118.
- Lee, S.J., D.C. Park, D.S. Lee, H.S. Choe & Y.H. Cho**, (2012) Evaluation of Seeplex(R) STD6 ACE Detection kit for the diagnosis of six bacterial sexually transmitted infections. *J. Infect. Chemother.* 18: 494-500.
- Liu, Y.C., I.H. Lin, W.J. Chung, W.S. Hu, W.V. Ng, C.Y. Lu, T.Y. Huang, H.W. Shu, K.J. Hsiao, S.F. Tsai, C.H. Chang & C.H. Lin**, (2012) Proteomics characterization of

- cytoplasmic and lipid-associated membrane proteins of human pathogen *Mycoplasma fermentans* M64. *PloS one* 7: e35304.
- Lu, A., V.G. Magupalli, J. Ruan, Q. Yin, M.K. Atianand, M.R. Vos, G.F. Schroder, K.A. Fitzgerald, H. Wu & E.H. Egelman,** (2014) Unified polymerization mechanism for the assembly of ASC-dependent inflammasomes. *Cell*. 156: 1193-1206.
- Luo, W., A.H. Tu, Z. Cao, H. Yu & K. Dybvig,** (2009) Identification of an isoschizomer of the HhaI DNA methyltransferase in *Mycoplasma arthritidis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 290: 195-198.
- Lysnyanski, I., K. Sachse, R. Rosenbusch, S. Levisohn & D. Yogev,** (1999) The *vsp* locus of *Mycoplasma bovis*: gene organization and structural features. *J. Bacteriol.* 181: 5734-5741.
- Lysnyanski, I., Y. Ron & D. Yogev,** (2001) Juxtaposition of an active promoter to *vsp* genes via site-specific DNA inversions generates antigenic variation in *Mycoplasma bovis*. *J. Bacteriol.* 183: 5698-5708.
- Ma, L., J.S. Jensen, M. Mancuso, R. Hamasuna, Q. Jia, C.L. McGowin & D.H. Martin,** (2010) Genetic variation in the complete MgPa operon and its repetitive chromosomal elements in clinical strains of *Mycoplasma genitalium*. *PloS one* 5: e15660.
- MacKenzie, C.R., N. Nischik, R. Kram, R. Krauspe, M. Jager & B. Henrich,** (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. *Int. J. Infect. Dis.* 14 Suppl 3: e307-309.
- Madsen, M.L., D. Nettleton, E.L. Thacker, R. Edwards & F.C. Minion,** (2006) Transcriptional profiling of *Mycoplasma hyopneumoniae* during heat shock using microarrays. *Infect. Immun.* 74: 160-166.
- Madsen, M.L., S. Puttamreddy, E.L. Thacker, M.D. Carruthers & F.C. Minion,** (2008) Transcriptome changes in *Mycoplasma hyopneumoniae* during infection. *Infect. Immun.* 76: 658-663.
- Malaguti, N., L.D. Bahls, N.S. Uchimura, F. Gimenes & M.E. Consolaro,** (2015) Sensitive detection of thirteen bacterial vaginosis-associated agents using multiplex PCR. *Biomed. Res. Int.* 2015: 645853.
- Manel, N., D. Unutmaz & D.R. Littman,** (2008) The differentiation of human Th-17 cells requires transforming growth factor-beta and induction of the nuclear receptor ROR-gammat. *Nat. Immunol.* 9: 641-649.
- Markham, P.F., M.D. Glew, G.F. Browning, K.G. Whithear & I.D. Walker,** (1998) Expression of two members of the *pMGA* gene family of *Mycoplasma gallisepticum* oscillates and is influenced by -specific antibodies. *Infect. Immun.* 66: 2845-2853.
- Markham, P.F., A. Kanci, G. Czifra, B. Sundquist, P. Hains & G.F. Browning,** (2003) Homologue of macrophage-activating lipoprotein in *Mycoplasma gallisepticum* is not essential for growth and pathogenicity in tracheal organ cultures. *J. Bacteriol.* 185: 2538-2547.
- McDonald, J.C. & D.L. Moore,** (1988) *Mycoplasma hominis* meningitis in a premature infant. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 7: 795-798.
- Mechai, F., G. Le Moal, S. Duchene, C. Burucoa, C. Godet & M. Freslon,** (2006) *Mycoplasma hominis* osteitis in an immunocompetent man. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 25: 715-717.
- Metzger, J.W., A.G. Beck-Sickinger, M. Loleit, M. Eckert, W.G. Bessler & G. Jung,** (1995) Synthetic S-(2,3-dihydroxypropyl)-cysteinyl peptides derived from the N-terminus of the cytochrome subunit of the photoreaction centre of *Rhodospseudomonas viridis* enhance murine splenocyte proliferation. *J. Pept. Sci.* 1: 184-190.
- Mian, A.N., A.C. Farney & S.R. Mendley,** (2005) *Mycoplasma hominis* septic arthritis in a pediatric renal transplant recipient: case report and review of the literature. *Am. J. Transplant.* 5: 183-188.

- Minion, F.C., K.J. Jarvill-Taylor, D.E. Billings & E. Tigges**, (1993) Membrane-associated nuclease activities in mycoplasmas. *J. Bacteriol.* 175: 7842-7847.
- Morada, M., M. Manzur, B. Lam, C. Tan, J. Tachezy, P. Rappelli, D. Dessi, P.L. Fiori & N. Yarlett**, (2010) Arginine metabolism in *Trichomonas vaginalis* infected with *Mycoplasma hominis*. *Microbiology* 156: 3734-3743.
- Motta, V., F. Soares, T. Sun & D.J. Philpott**, (2015) NOD-like receptors: versatile cytosolic sentinels. *Physiol. Rev.* 95: 149-178.
- Mu, H.H., N.D. Pennock, J. Humphreys, C.J. Kirschning & B.C. Cole**, (2005) Engagement of Toll-like receptors by mycoplasmal superantigen: downregulation of TLR2 by MAM/TLR4 interaction. *Cell. Microbiol.* 7: 789-797.
- Mu, H.H., J. Humphreys, F.V. Chan & B.C. Cole**, (2006) TLR2 and TLR4 differentially regulate B7-1 resulting in distinct cytokine responses to the mycoplasma superantigen MAM as well as to disease induced by *Mycoplasma arthritidis*. *Cell. Microbiol.* 8: 414-426.
- Muhradt, P.F., M. Kiess, H. Meyer, R. Sussmuth & G. Jung**, (1997) Isolation, structure elucidation, and synthesis of a macrophage stimulatory lipopeptide from *Mycoplasma fermentans* acting at picomolar concentration. *J. Exp. Med.* 185: 1951-1958.
- Muhradt, P.F., M. Kiess, H. Meyer, R. Sussmuth & G. Jung**, (1998) Structure and specific activity of macrophage-stimulating lipopeptides from *Mycoplasma hyorhinis*. *Infect. Immun.* 66: 4804-4810.
- Muhradt, P.F., H. Meyer & R. Jansen**, (1996) Identification of S-(2,3-dihydroxypropyl)cystein in a macrophage-activating lipopeptide from *Mycoplasma fermentans*. *Biochemistry* 35: 7781-7786.
- Muhradt, P.F., H. Quentmeier & E. Schmitt**, (1991) Involvement of interleukin-1 (IL-1), IL-6, IL-2, and IL-4 in generation of cytolytic T cells from thymocytes stimulated by a *Mycoplasma fermentans*-derived product. *Infect. Immun.* 59: 3962-3968.
- Muin, D.A., M.T. Takes, I. Hosli & O. Lapaire**, (2015) Severe pelvic abscess formation following caesarean section. *BMJ Case Rep.* 2015.
- Nassar, F.A., F.H. Abu-Elamreen, M.E. Shubair & F.A. Sharif**, (2008) Detection of *Chlamydia trachomatis* and *Mycoplasma hominis*, *M. genitalium* and *Ureaplasma urealyticum* by PCR in patients with sterile pyuria. *Adv. Med. Sci.* 53: 80-86.
- Natale, P., T. Bruser & A.J. Driessen**, (2008) Sec- and Tat-mediated protein secretion across the bacterial cytoplasmic membrane--distinct translocases and mechanisms. *Biochim. Biophys. Acta.* 1778: 1735-1756.
- Neman-Simha, V., H. Renaudin, B. de Barbeyrac, J.J. Leng, J. Horovitz, D. Dallay, C. Billeaud & C. Bébéar**, (1992) Isolation of genital mycoplasmas from blood of febrile obstetrical-gynecologic patients and neonates. *Scand. J. Infect. Dis.* 24: 317-321.
- Neumayr, L., E. Lennette, D. Kelly, A. Earles, S. Embury, P. Groncy, M. Grossi, R. Grover, L. McMahon, P. Swerdlow, P. Waldron & E. Vichinsky**, (2003) Mycoplasma disease and acute chest syndrome in sickle cell disease. *Pediatrics* 112: 87-95.
- Noh, E.J., S.W. Kang, Y.J. Shin, D.C. Kim, I.S. Park, M.Y. Kim, B.G. Chun & B.H. Min**, (2002) Characterization of mycoplasma arginine deiminase expressed in *E. coli* and its inhibitory regulation of nitric oxide synthesis. *Mol. Cells.* 13: 137-143.
- Noormohammadi, A.H., P.F. Markham, M.F. Duffy, K.G. Whithear & G.F. Browning**, (1998) Multigene families encoding the major hemagglutinins in phylogenetically distinct mycoplasmas. *Infect. Immun.* 66: 3470-3475.
- Noormohammadi, A.H., P.F. Markham, A. Kanci, K.G. Whithear & G.F. Browning**, (2000) A novel mechanism for control of antigenic variation in the haemagglutinin gene family of *Mycoplasma synoviae*. *Mol. Microbiol.* 35: 911-923.
- Nouvel, L.X., P. Sirand-Pugnet, M.S. Marena, E. Sagne, V. Barbe, S. Mangenot, C. Schenowitz, D. Jacob, A. Barre, S. Claverol, A. Blanchard & C. Citti**, (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.
- Nyvold, C., S. Birkelund & G. Christiansen**, (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.
- Okusawa, T., M. Fujita, J. Nakamura, T. Into, M. Yasuda, A. Yoshimura, Y. Hara, A. Hasebe, D.T. Golenbock, M. Morita, Y. Kuroki, T. Ogawa & K. Shibata**, (2004) Relationship between structures and biological activities of mycoplasmal diacylated lipopeptides and their recognition by Toll-like receptors 2 and 6. *Infect. Immun.* 72: 1657-1665.
- Olson, L.D., C.A. Renshaw, S.W. Shane & M.F. Barile**, (1991a) Successive synovial *Mycoplasma hominis* isolates exhibit apparent antigenic variation. *Infect. Immun.* 59: 3327-3329.
- Olson, L.D., S.W. Shane, A.A. Karpas, T.M. Cunningham, P.S. Probst & M.F. Barile**, (1991b) Monoclonal antibodies to surface antigens of a pathogenic *Mycoplasma hominis* strain. *Infect. Immun.* 59: 1683-1689.
- Omuetti, K.O., J.M. Beyer, C.M. Johnson, E.A. Lyle & R.I. Tapping**, (2005) Domain exchange between human Toll-like receptors 1 and 6 reveals a region required for lipopeptide discrimination. *J. Biol. Chem.* 280: 36616-36625.
- O'Neill, L.A., D. Golenbock & A.G. Bowie**, (2013) The history of Toll-like receptors - redefining innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 13: 453-460.
- Paetzel, M., A. Karla, N.C. Strynadka & R.E. Dalbey**, (2002) Signal peptidases. *Chem. Rev.* 102: 4549-4580.
- Pailhories, H., V. Rabier, M. Eveillard, C. Mahaza, M.L. Joly-Guillou, J.M. Chenebault, M. Kempf & C. Lemarie**, (2014) A case report of *Mycoplasma hominis* brain abscess identified by MALDI-TOF mass spectrometry. *Int. J. Infect. Dis.* 29: 166-168.
- Pascual, A., K. Jatón, B. Ninet, J. Bille & G. Greub**, (2010) New Diagnostic Real-Time PCR for Specific Detection of *Mycoplasma hominis* DNA. *Int. J. Microbiol.* II: 317512.
- Paul, V.K., U. Gupta, M. Singh, V.L. Nag, D. Takkar & M.K. Bhan**, (1998) Association of genital mycoplasma colonization with low birth weight. *Int. J. Gynaecol. Obstet.* 63: 109-114.
- Peltier, M.R., A.J. Freeman, H.H. Mu & B.C. Cole**, (2005) Characterization and partial purification of a macrophage-stimulating factor from *Mycoplasma hominis*. *Am. J. Reprod. Immunol.* 54: 342-351.
- Pereyre, S. & C.M. Bébéar**, (2012) Infections à *Mycoplasma hominis*. In: *Encycl. Méd. Chir., Maladies infectieuses*. Elsevier.
- Pereyre, S., P. Gonzalez, B. de Barbeyrac, A. Darnige, H. Renaudin, A. Charron, S. Raherison, C. Bébéar & C.M. Bébéar**, (2002) Mutations in 23S rRNA account for intrinsic resistance to macrolides in *Mycoplasma hominis* and *Mycoplasma fermentans* and for acquired resistance to macrolides in *M. hominis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46: 3142-3150.
- Pereyre, S., P. Sirand-Pugnet, L. Béven, A. Charron, H. Renaudin, A. Barre, P. Avenaoud, D. Jacob, A. Couloux, V. Barbe, A. de Daruvar, A. Blanchard & C. Bébéar**, (2009) Life on arginine for *Mycoplasma hominis*: clues from its minimal genome and comparison with other human urogenital mycoplasmas. *PLoS genetics* 5: e1000677.
- Petit, C.M., J.R. Brown, K. Ingraham, A.P. Bryant & D.J. Holmes**, (2001) Lipid modification of prelipoproteins is dispensable for growth *in vitro* but essential for virulence in *Streptococcus pneumoniae*. *FEMS Microbiol. Lett.* 200: 229-233.
- Phuah, C.L., B. Javid, S.H. Aliyu & A.M. Lever**, (2007) A case of *Mycoplasma hominis* septic arthritis postpartum. *J. Infect.* 55: e135-137.
- Potempa, J. & R.N. Pike**, (2009) Corruption of innate immunity by bacterial proteases. *J. Innate Immun.* 1: 70-87.

- Prajeeth, C.K., A.C. Jirmo, J.K. Krishnaswamy, T. Ebsen, C.A. Guzman, S. Weiss, H. Constabel, R.E. Schmidt & G.M. Behrens**, (2010) The synthetic TLR2 agonist BPPcysMPEG leads to efficient cross-priming against co-administered and linked antigens. *Eur. J. Immunol.* 40: 1272-1283.
- Quentmeier, H., E. Schmitt, H. Kirchhoff, W. Grote & P.F. Muhlradt**, (1990) *Mycoplasma fermentans*-derived high-molecular-weight material induces interleukin-6 release in cultures of murine macrophages and human monocytes. *Infect. Immun.* 58: 1273-1280.
- Quentmeier, H., G. Schumann-Kindel, P.F. Muhlradt & H.G. Drexler**, (1994) Induction of proto-oncogene and cytokine expression in human peripheral blood monocytes and the monocytic cell line THP-1 after stimulation with mycoplasma-derived material MDHM. *Leuk. Res.* 18: 319-325.
- Rao, R.P., N.S. Ghanayem, B.A. Kaufman, K.S. Kehl, D.C. Gregg & M.J. Chusid**, (2002) *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma* species brain abscess in a neonate. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 21: 1083-1085.
- Rappelli, P., M.F. Addis, F. Carta & P.L. Fiori**, (1998) *Mycoplasma hominis* parasitism of *Trichomonas vaginalis*. *Lancet* 352: 1286.
- Rappelli, P., F. Carta, G. Delogu, M.F. Addis, D. Dessi, P. Cappuccinelli & P.L. Fiori**, (2001) *Mycoplasma hominis* and *Trichomonas vaginalis* symbiosis: multiplicity of infection and transmissibility of *M. hominis* to human cells. *Arch. Microbiol.* 175: 70-74.
- Rathinam, V.A., S.K. Vanaja & K.A. Fitzgerald**, (2012a) Regulation of inflammasome signaling. *Nat. Immunol.* 13: 333-342.
- Rathinam, V.A., S.K. Vanaja, L. Waggoner, A. Sokolovska, C. Becker, L.M. Stuart, J.M. Leong & K.A. Fitzgerald**, (2012b) TRIF licenses caspase-11-dependent NLRP3 inflammasome activation by gram-negative bacteria. *Cell* 150: 606-619.
- Redelinghuys, M.J., M.M. Ehlers, A.W. Dreyer, H.A. Lombaard & M.M. Kock**, (2013) Comparison of the new Mycofast Revolution assay with a molecular assay for the detection of genital mycoplasmas from clinical specimens. *BMC Infect. Dis.* 13: 453.
- Rengarajan, J., S.J. Szabo & L.H. Glimcher**, (2000) Transcriptional regulation of Th1/Th2 polarization. *Immunol. Today.* 21: 479-483.
- Romano, N., G. Scarlata, G. Cadili & F. Carollo**, (1976) Mycoplasmas in pregnant women and in newborn infants. *Boll. Ist. Sieroter. Milan.* 55: 568-572.
- Rosenstein, I.J., D.J. Morgan, M. Sheehan, R.F. Lamont & D. Taylor-Robinson**, (1996) Bacterial vaginosis in pregnancy : distribution of bacterial species in different gram-stain categories of the vaginal flora. *J. Med. Microbiol.* 45: 120-126.
- Samra, Z., S. Rosenberg & L. Madar-Shapiro**, (2011) Direct simultaneous detection of 6 sexually transmitted pathogens from clinical specimens by multiplex PCR and auto-capillary electrophoresis. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 70: 17-21.
- Sankaran, K. & H.C. Wu**, (1994) Lipid modification of bacterial prolipoprotein. Transfer of diacylglycerol moiety from phosphatidylglycerol. *J. Biol. Chem.* 269: 19701-19706.
- Saraya, T., K. Nakata, K. Nakagaki, N. Motoi, K. Iihara, Y. Fujioka, T. Oka, D. Kurai, H. Wada, H. Ishii, H. Taguchi, S. Kamiya & H. Goto**, (2011) Identification of a mechanism for lung inflammation caused by *Mycoplasma pneumoniae* using a novel mouse model. *Results Immunol.* 1: 76-87.
- Sarlangue, J. & C. Bébéar**, (1999) Infections néonatales à mycoplasmes. *Med. Ther. Ped.* 2: 105-109.
- Sato, H., N. Iino, R. Ohashi, T. Saeki, T. Ito, M. Saito, Y. Tsubata, S. Yamamoto, S. Murakami, T. Kuroda, Y. Tanabe, J. Fujisawa, T. Murai, M. Nakano, I. Narita & F. Gejyo**, (2012) Hypogammaglobulinemic patient with polyarthritis mimicking rheumatoid arthritis finally diagnosed as septic arthritis caused by *Mycoplasma hominis*. *Intern. Med.* 51: 425-429.

- Schmidt, J.A., G.F. Browning & P.F. Markham**, (2007) *Mycoplasma hyopneumoniae* mhp379 is a Ca²⁺-dependent, sugar-nonspecific exonuclease exposed on the cell surface. *J. Bacteriol.* 189: 3414-3424.
- Scott, K., M. Manunta, C. Germain, P. Smith, M. Jones, P. Mitchell, D. Dessi, K. Branigan Bamford, R.I. Lechler, P.L. Fiori, G.R. Foster & G. Lombardi**, (2005) Qualitatively distinct patterns of cytokines are released by human dendritic cells in response to different pathogens. *Immunology* 116: 245-254.
- Selvan, A.T. & K. Sankaran**, (2008) Localization and characterization of prolipoprotein diacylglycerol transferase (Lgt) critical in bacterial lipoprotein biosynthesis. *Biochimie* 90: 1647-1655.
- Serebryakova, M.V., I.A. Demina, M.A. Galyamina, I.G. Kondratov, V.G. Ladygina & V.M. Govorun**, (2011) The acylation state of surface lipoproteins of mollicute *Acholeplasma laidlawii*. *J. Biol. Chem.* 286: 22769-22776.
- Shen, X., J. Gumulak, H. Yu, C.T. French, N. Zou & K. Dybvig**, (2000) Gene rearrangements in the *vsa* locus of *Mycoplasma pulmonis*. *J. Bacteriol.* 182: 2900-2908.
- Shi, J., Y. Zhao, Y. Wang, W. Gao, J. Ding, P. Li, L. Hu & F. Shao**, (2014) Inflammatory caspases are innate immune receptors for intracellular LPS. *Nature* 514: 187-192.
- Shibata, K., A. Hasebe, T. Into, M. Yamada & T. Watanabe**, (2000) The N-terminal lipopeptide of a 44-kDa membrane-bound lipoprotein of *Mycoplasma salivarium* is responsible for the expression of intercellular adhesion molecule-1 on the cell surface of normal human gingival fibroblasts. *J. Immunol.* 165: 6538-6544.
- Shimizu, T., Y. Kida & K. Kuwano**, (2004) Lipid-associated membrane proteins of *Mycoplasma fermentans* and *M. penetrans* activate human immunodeficiency virus long-terminal repeats through Toll-like receptors. *Immunology* 113: 121-129.
- Shimizu, T., Y. Kida & K. Kuwano**, (2007) Triacylated lipoproteins derived from *Mycoplasma pneumoniae* activate NF-kappaB through Toll-like receptors 1 and 2. *Immunology* 121: 473-483.
- Shimizu, T., Y. Kida & K. Kuwano**, (2008a) A triacylated lipoprotein from *Mycoplasma genitalium* activates NF-kappaB through Toll-like receptor 1 (TLR1) and TLR2. *Infect. Immun.* 76: 3672-3678.
- Shimizu, T., Y. Kida & K. Kuwano**, (2008b) *Ureaplasma parvum* lipoproteins, including MB antigen, activate NF-kappaB through TLR1, TLR2 and TLR6. *Microbiology* 154: 1318-1325.
- Shimizu, T., Y. Kida & K. Kuwano**, (2011) Cytoadherence-dependent induction of inflammatory responses by *Mycoplasma pneumoniae*. *Immunology* 133: 51-61.
- Shimizu, T., Y. Kimura, Y. Kida, K. Kuwano, M. Tachibana, M. Hashino & M. Watarai**, (2014) Cytoadherence of *Mycoplasma pneumoniae* induces inflammatory responses through autophagy and Toll-like receptor 4. *Infect. Immun.* 82: 3076-3086.
- Siber, G.R., S. Alpert, A.L. Smith, J.S. Lin & W.M. McCormack**, (1977) Neonatal central nervous system infection due to *Mycoplasma hominis*. *J. Pediatr.* 90: 625-627.
- Simons, K. & E. Ikonen**, (1997) Functional rafts in cell membranes. *Nature* 387: 569-572.
- Sippel, K.H., A.H. Robbins, R. Reutzel, S.K. Boehlein, K. Namiki, S. Goodison, M. Agbandje-McKenna, C.J. Rosser & R. McKenna**, (2009) Structural insights into the extracytoplasmic thiamine-binding lipoprotein p37 of *Mycoplasma hyorhinae*. *J. Bacteriol.* 191: 2585-2592.
- Sirand-Pugnet, P., C. Citti, A. Barre & A. Blanchard**, (2007a) Evolution of mollicutes: down a bumpy road with twists and turns. *Res. Microbiol.* 158: 754-766.
- Sirand-Pugnet, P., C. Lartigue, M. Marena, D. Jacob, A. Barre, V. Barbe, C. Schenowitz, S. Mangenot, A. Couloux, B. Segurens, A. de Daruvar, A. Blanchard & C. Citti**, (2007b) Being pathogenic, plastic, and sexual while living with a nearly minimal bacterial genome. *PLoS Genet.* 3: 744-758.
- Somarajan, S.R., T.R. Kannan & J.B. Baseman**, (2010) *Mycoplasma pneumoniae* Mpn133 is a cytotoxic nuclease with a glutamic acid-, lysine- and serine-rich region essential

- for binding and internalization but not enzymatic activity. *Cell. Microbiol.* 12: 1821-1831.
- Srugo, I., J. Steinberg, R. Madeb, R. Gershtein, I. Elias, J. Tal & O. Nativ,** (2003) Agents of non-gonococcal urethritis in males attending an Israeli clinic for sexually transmitted diseases. *Isr. Med. Assoc. J* 5: 24-27.
- Steinemann, C., M. Fenner, R.W. Parish & H. Binz,** (1984) Studies of the invasiveness of the chemically induced mouse sarcoma FS9.I. Monoclonal antibodies to a 37,000 dalton membrane glycoprotein inhibit invasion of fibroblasts *in vitro*. *Int. J. Cancer.* 34: 407-414.
- Steinman, R.M.,** (2007) Dendritic cells: understanding immunogenicity. *Eur. J. Immunol.* 37 Suppl 1: S53-60.
- Stellrecht, K.A., A.M. Woron, N.G. Mishrik & R.A. Venezia,** (2004) Comparison of multiplex PCR assay with culture for detection of genital mycoplasmas. *J. Clin. Microbiol.* 42: 1528-1533.
- Steuer, A., A. Franz, P.M. Furr, D. Taylor-Robinson, A.D. Webster & G.R. Hughes,** (1996) Common variable immunodeficiency presenting as a *Mycoplasma hominis* septic arthritis. *J. Infect.* 33: 235-237.
- Sugiyama, M., A. Saeki, A. Hasebe, R. Kamesaki, Y. Yoshida, Y. Kitagawa, T. Suzuki & K. Shibata,** (2015) Activation of inflammasomes in dendritic cells and macrophages by *Mycoplasma salivarium*. *Mol Oral Microbiol.*
- Sutcliffe, I.C. & D.J. Harrington,** (2002) Pattern searches for the identification of putative lipoprotein genes in Gram-positive bacterial genomes. *Microbiology* 148: 2065-2077.
- Takanashi, M., S. Ito, H. Kaneto, Y. Tanahashi, M. Kitanohara, A. Yanagihara, H. Nakazima & M. Yasuda,** (2015) Development and clinical application of an InvaderPlus assay for the detection of genital mycoplasmas. *J. Infect. Chemother.* 21: 516-519.
- Taylor-Robinson, D.,** (2007) The role of mycoplasmas in pregnancy outcome. *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* 21: 425-438.
- Taylor-Robinson, D., J.G. Ainsworth & W.M. McCormack,** (1999) Genital mycoplasmas. In: Sexually transmitted diseases. K.K. Holmes, P.F. Sparling, P.A. Mardh, S.M. Lemon, W.E. Stamm, P. P. & J.N. Wasserheit. New York: McGraw Hill, pp. 533-548.
- Taylor-Robinson, D. & R.F. Lamont,** (2011) Mycoplasmas in pregnancy. *BJOG.* 118: 164-174.
- Terhune, J., E. Berk & B.J. Czerniecki,** (2013) Dendritic cell-Induced Th1 and Th17 cell differentiation for cancer therapy. *Vaccines* 1: 527-549.
- Ting, J.P., J.A. Duncan & Y. Lei,** (2010) How the noninflammasome NLRs function in the innate immune system. *Science* 327: 286-290.
- Truchetet, M.E., L. Béven, H. Renaudin, I. Douchet, C. Ferandon, A. Charron, P. Blanco, T. Schaefferbeke, C. Contin-Bordes & C. Bébéar,** (2011) Potential role of *Mycoplasma hominis* in interleukin (IL)-17-producing CD4+ T-cell generation via induction of IL-23 secretion by human dendritic cells. *J. Infect. Dis.* 204: 1796-1805.
- Tully, J.G., J.M. Bové, F. Laigret & R.F. Whitcomb,** (1993) "Notes: Revised taxonomy of the class Mollicutes: proposed elevation of a monophyletic cluster of arthropod-associated Mollicutes to ordinal rank (Entomoplasmatales ord. nov.), with provision for familial rank to separate species with nonhelical morphology (Entomoplasmataceae fam. nov.) from helical species (Spiroplasmataceae), and emended descriptions of the order Mycoplasmatales, family Mycoplasmataceae.". *Int. J. Syst. Bacteriol.* 43: 378 - 385.
- Vanaja, S.K., V.A. Rathinam & K.A. Fitzgerald,** (2015) Mechanisms of inflammasome activation: recent advances and novel insights. *Trends Cell. Biol.* 25: 308-315.
- van Belkum, A., C. van der Schee, W.I. van der Meijden, H.A. Verbrugh & H.J. Sluiter,** (2001) A clinical study on the association of *Trichomonas vaginalis* and *Mycoplasma hominis* infections in women attending a sexually transmitted disease (STD) outpatient clinic. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 32: 27-32.

- Vancini, R.G., A. Pereira-Neves, R. Borojevic & M. Benchimol**, (2008) *Trichomonas vaginalis* harboring *Mycoplasma hominis* increases cytopathogenicity *in vitro*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 27: 259-267.
- Vangipuram, M., D. Ting, S. Kim, R. Diaz & B. Schule**, (2013) Skin punch biopsy explant culture for derivation of primary human fibroblasts. *J. Vis. Exp.*: e3779.
- Volpe, E., N. Servant, R. Zollinger, S.I. Bogiatzi, P. Hupe, E. Barillot & V. Soumelis**, (2008) A critical function for transforming growth factor-beta, interleukin 23 and proinflammatory cytokines in driving and modulating human Th-17 responses. *Nat. Immunol.* 9: 650-657.
- Waites, K., I. Lysnyanski & C. Bébéar**, (2014) Emerging antimicrobial resistance in mycoplasmas of humans and animals. In: Browning GF, Citti C. *Mollicutes : molecular biology and pathogenesis*. C.A. Press. Norfolk, UK, pp. 289-322.
- Waites, K. & D. Talkington**, (2005) New developments in human diseases due to mycoplasmas. In: *Mycoplasmas molecular biology pathogenicity and strategies for control*. A. Blanchard & G.F. Browning. Norfolk: Horizon Bioscience, pp. 289-354.
- Waites, K.B., D.J. Bade, C. Bébéar, B. S.D., M. Davidson, L.B. Duffy, G.E. Kenny, A. Matlow, D. Shortridge, D.F. Talkington, P.A. Totten, J.L. Watts & X. Zheng**, (2011) Methods for antimicrobial susceptibility testing for human mycoplasmas : Approved guideline. In: Wayne (PA): Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Waites, K.B. & C.M. Bébéar**, (2013) Chemotherapy of *Mycoplasma* and *Ureaplasma* infections. In: *Encyclopedia of Pharmaceutical Microbiology*. C.H. Nightingale & C. Gahan.
- Waites, K.B., C.M. Bébéar, J.A. Roberston, D.F. Talkington & G.E. Kenny**, (2001) Cumitech 34, Laboratory diagnosis of mycoplasmal infections. In: Cumitech. F.S. Nolte. Washington D. C.: American Society for Microbiology.
- Waites, K.B., L.B. Duffy, D.T. Crouse, M.E. Dworsky, M.J. Strange, K.G. Nelson & G.H. Cassell**, (1990) Mycoplasmal infections of cerebrospinal fluid in newborn infants from a community hospital population. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 9: 241-245.
- Waites, K.B., B. Katz & R.L. Schelonka**, (2005) Mycoplasmas and ureaplasmas as neonatal pathogens. *Clin. Microbiol. Rev.* 18: 757-789.
- Waites, K.B., P.T. Rudd, D.T. Crouse, K.C. Canupp, K.G. Nelson, C. Ramsey & G.H. Cassell**, (1988) Chronic *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* infections of central nervous system in preterm infants. *Lancet* 1: 17-21.
- Waites, K.B., R.L. Schelonka, L. Xiao, P.L. Grigsby & M.J. Novy**, (2009) Congenital and opportunistic infections: *Ureaplasma* species and *Mycoplasma hominis*. *Semin. Fetal. Neonatal Med.* 14: 190-199.
- Waites, K.B., D.F. Talkington & C.M. Bébéar**, (In press) Mycoplasmas. In: *Manual of commercial methods in clinical microbiology*. A.L. Truant, Washington D.C.. American Society for Microbiology.
- Wallace, R.J., Jr., S. Alpert, K. Browne, J.S. Lin & W.M. McCormack**, (1978) Isolation of *Mycoplasma hominis* from blood cultures in patients with postpartum fever. *Obstet. Gynecol.* 51: 181-185.
- Watt, K.M., M.M. Massaro, B. Smith, M. Cohen-Wolkowicz, D.K. Benjamin, Jr. & M.M. Laughon**, (2012) Pharmacokinetics of moxifloxacin in an infant with *Mycoplasma hominis* meningitis. *Pediatr. Infect. Dis.* 31: 197-199.
- Wealthall, S.R.**, (1975) Mycoplasma meningitis in infants with spina bifida. *Dev. Med. Child. Neurol. Suppl. Supplement*: 117-122.
- Weisburg, W.G., J.G. Tully, D.L. Rose, J.P. Petzel, H. Oyaizu, D. Yang, L. Mandelco, J. Sechrest, T.G. Lawrence, J. Van Etten & et al.**, (1989) A phylogenetic analysis of the mycoplasmas : basis for their classification. *J. Bacteriol.* 171: 6455-6467.
- Whitson, W.J., P.A. Ball, S.S. Lollis, J.D. Balkman & D.F. Bauer**, (2014) Postoperative *Mycoplasma hominis* infections after neurosurgical intervention. *J. Neurosurg. Pediatr.* 14: 212-218.

- Woese, C.R., J. Maniloff & L.B. Zablen**, (1980) Phylogenetic analysis of the mycoplasmas. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 494-498.
- Wynes, J., W.t. Harris, R.A. Hadfield & D.S. Malay**, (2013) Subtalar joint septic arthritis in a patient with hypogammaglobulinemia. *J. Foot. Ankle. Surg.* 52: 242-248.
- Xiao, J.C., L.F. Xie, S.L. Fang, M.Y. Gao, Y. Zhu, L.Y. Song, H.M. Zhong & Z.R. Lun**, (2006) Symbiosis of *Mycoplasma hominis* in *Trichomonas vaginalis* may link metronidazole resistance in vitro. *Parasitol. Res.* 100: 123-130.
- Xie, K. & R.E. Dalbey**, (2008) Inserting proteins into the bacterial cytoplasmic membrane using the Sec and YidC translocases. *Nat. Rev. Microbiol.* 6: 234-244.
- Xu, Y., H. Li, W. Chen, X. Yao, Y. Xing, X. Wang, J. Zhong & G. Meng**, (2013) *Mycoplasma hyorhinitis* activates the NLRP3 inflammasome and promotes migration and invasion of gastric cancer cells. *PLoS one* 8: e77955.
- Yagihashi, Y., K. Kato, K. Nagahama, M. Yamamoto, H. Kanamaru, H. Nishizawa, S. Ueda, T. Nagano & G. Ito**, (2011) [A case of *Mycoplasma hominis* infection after bladder injury during cesarean section]. *Nihon Hinyokika Gakkai Zasshi* 102: 705-708.
- Yamaguchi, M., A. Kikuchi, K. Ohkusu, M. Akashi, J. Sasahara, K. Takakuwa & K. Tanaka**, (2009) Abscess formation due to *Mycoplasma hominis* infection after cesarean section. *J. Obstet. Gynaecol. Res.* 35: 593-596.
- Yarlett, N., M.P. Martinez, M.A. Moharrami & J. Tachezy**, (1996) The contribution of the arginine dihydrolase pathway to energy metabolism by *Trichomonas vaginalis*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 78: 117-125.
- Yogev, D., R. Watson-McKown, R. Rosengarten, J. Im & K.S. Wise**, (1995) Increased structural and combinatorial diversity in an extended family of genes encoding Vlp surface proteins of *Mycoplasma hyorhinitis*. *J. Bacteriol.* 177: 5636-5643.
- Zdrodowska-Stefanow, B., W.M. Klosowska, I. Ostaszewska-Puchalska, V. Bulhak-Koziol & B. Kotowicz**, (2006) *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* infections in male urethritis and its complications. *Adv. Med. Sci.* 51: 254-257.
- Zhang, Q. & K.S. Wise**, (1996) Molecular basis of size and antigenic variation of a *Mycoplasma hominis* adhesin encoded by divergent vaa genes. *Infect. Immun.* 64: 2737-2744.
- Zhang, Q. & K.S. Wise**, (1997) Localized reversible frameshift mutation in a adhesin gene confers a phase-variable adherence phenotype in mycoplasma. *Mol. Microbiol.* 25: 859-869.
- Zhang, Q. & K.S. Wise**, (2001) Coupled phase-variable expression and epitope masking of selective surface lipoproteins increase surface phenotypic diversity in *Mycoplasma hominis*. *Infect. Immun.* 69: 5177-5181.
- Zhao, Y., J. Yang, J. Shi, Y.N. Gong, Q. Lu, H. Xu, L. Liu & F. Shao**, (2011) The NLRC4 inflammasome receptors for bacterial flagellin and type III secretion apparatus. *Nature* 477: 596-600.
- Zheng, X., D.A. Olson, J.G. Tully, H.L. Watson, G.H. Cassell, D.R. Gustafson, K.A. Svien & T.F. Smith**, (1997) Isolation of *Mycoplasma hominis* from a brain abscess. *J. Clin. Microbiol.* 35: 992-994.

Titre : Etude de l'interaction de *Mycoplasma hominis* PG21 avec les cellules dendritiques humaines. Caractérisation de la fraction bioactive du mycoplasme et réponse immunitaire innée de la cellule

Résumé : *Mycoplasma hominis* est une bactérie opportuniste qui peut être responsable d'infections du tractus urogénital, d'infections néonatales ou d'infections disséminées notamment chez les patients immunodéprimés. La membrane des mycoplasmes constitue l'interface d'interaction directe avec le milieu extérieur en raison de l'absence de paroi. Cette membrane contient de nombreuses lipoprotéines qui ont le pouvoir d'activer des cellules dendritiques humaines (hDCs), d'induire la production de cytokines et de polariser le système immunitaire adaptatif. Nous avons étudié l'interaction de *M. hominis* PG21 avec les hDCs en nous penchant d'une part sur la fraction du mycoplasme qui active les hDCs et d'autre part sur la réponse immunitaire innée des hDCs. Après avoir déterminé les lipoprotéines contenues dans un extrait TX-114 de *M. hominis* PG21, nous avons enrichi en lipoprotéines bioactives une fraction de vésicules membranaires du mycoplasme par une double extraction utilisant deux détergents non dénaturant, le Sarkosyl puis le Triton X-114. Après séparation par SDS-PAGE, nous avons identifié 20 lipoprotéines qui pourraient entraîner la sécrétion d'IL-23 par les hDCs, notamment la lipoprotéine MHO_4720. Un lipopeptide synthétique correspondant à la fraction N-terminale de MHO_4720 est capable de stimuler les hDCs. En analysant les variations transcriptionnelles des gènes codant pour les 48 lipoprotéines de *M. hominis* PG21 par qRT-PCR, nous avons également déterminé que 21 lipoprotéines sont surexprimées après 4h ou 24h de contact entre le mycoplasme et les hDCs. Enfin, la réponse cellulaire a été évaluée par PCR array et ELISA. Nous avons observé l'activation d'inflammasome(s) par la mise en évidence de la production d'IL-1 β dépendant de la caspase 5.

Mots clés : *Mycoplasma hominis*, cellules dendritiques, interaction hôte-pathogène, lipoprotéines, lipopeptide, inflammasome, qRT-PCR, PCR array, Triton X-114

Title : Interaction of *Mycoplasma hominis* PG21 with human dendritic cells: bioactive fraction of the mycoplasma and innate immune response of the cells

Abstract : *Mycoplasma hominis* is involved in urogenital tract infections, neonatal infections or disseminated infections particularly in immunocompromised patients. Mycoplasmas have no cell wall and their membrane is the main interface mediating the interaction between the mycoplasma and its environment. Lipoproteins that are anchored to the extracellular side of the plasma membrane are known to induce the maturation of human dendritic cells (hDCs), to stimulate the pro-inflammatory cytokine production by hDCs and to polarize the adaptive immune system. We studied the interaction of *M. hominis* PG21 with hDCs in order to assess the lipoproteins that can induce the stimulation of hDCs, to determine the lipoproteins that are regulated upon interaction of the mycoplasma with the host cell and to evaluate the innate host cell response. Using a double extraction strategy with two non-denaturing detergents, Sarkosyl then Triton X-114, and separation by SDS-PAGE, we found that 20 lipoproteins may induce the secretion of IL-23 by the hDCs, especially the MHO_4720 lipoprotein. We showed that a synthetic lipopeptide corresponding to the N-terminus part of the MHO_4720 lipoprotein can stimulate the hDCs in a dose-dependent manner. Using qRT-PCR for the evaluation of the transcriptional regulation of the 48 lipoprotein-coding genes of *M. hominis* PG21, we also determined that 21 lipoproteins were upregulated upon 4h and 24h of contact of *M. hominis* with hDCs. Finally, the hDC innate immune response was evaluated by PCR array and ELISA. We observed a caspase 5-dependent production of IL-1 β corresponding to the activation of an inflammasome.

Keywords : *Mycoplasma hominis*, dendritic cells, lipoproteins, host-pathogen interaction, lipopeptide, inflammasome, PCR array, qRT-PCR, Triton X-114

**INRA, USC EA 3671, Infections humaines à mycoplasmes et à chlamydiae
Professeuse Cécile Bébéar**

Université de Bordeaux, Campus Bordeaux Carreire,
146 rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux cedex, France