

Université Victor Segalen Bordeaux 2

Année 2010

Thèse n° 1725

THESE

pour le

DOCTORAT DE L'UNIVERSITE BORDEAUX 2

Mention : Sciences, Technologie, Santé

Option : Microbiologie

Présentée et soutenue publiquement le
27 octobre 2010

par

Charles CAZANAVE

Né le 4 juillet 1975 à Orthez

**Analyse du polymorphisme associé aux répétitions en tandem
pour le typage de deux espèces de mycoplasmes pathogènes
chez l'homme : *Mycoplasma genitalium* et
*Mycoplasma pneumoniae***

Membres du Jury :

M. Alain Blanchard, Professeur à l'Université Victor Segalen Bordeaux 2
M^{me} Sophie Jarraud, Maître de Conférences des Universités à l'Université Lyon 1
M. Jean-Louis Koeck, Professeur Agrégé de Médecine à l'Ecole du Val-de-Grâce
M. François Thiaucourt, Directeur de Recherche au CIRAD de Montpellier
M. Michel Dupon, Professeur à l'Université Victor Segalen Bordeaux 2
M^{me} Cécile Bébéar, Professeur à l'Université Victor Segalen Bordeaux 2

Président
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Directeur de thèse

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé au sein du laboratoire de Bactériologie EA 3671, « Infections humaines à mycoplasmes et à chlamydiae », de l'Université Victor Segalen Bordeaux 2, dirigé par le Professeur Cécile Bébéar.

Au Professeur Cécile Bébéar,

Cécile, je te remercie pour la confiance que tu m'as accordée en m'accueillant dans ton laboratoire. Tu as encadré mes premiers pas en Bactériologie dès mon externat où j'ai bénéficié de ton enseignement durant les TP. Tu m'as fait ensuite découvrir les Sciences lors de mon Master 2. Merci pour ta patience, un clinicien dans un laboratoire de recherche, c'est un peu comme un éléphant dans un magasin de porcelaine... Il faut être patient et indulgent pour obtenir des résultats et tu y es parvenue, avec sourire et sympathie. Merci d'avoir encadré avec tant de générosité, de disponibilité et de rigueur ce travail. Merci enfin pour ton aide pour la recherche de mon stage de mobilité à l'étranger.

Au Professeur Christiane Bébéar,

J'ai découvert la Bactériologie clinique lors de vos cours magistraux lorsque j'étais en troisième année de Médecine. Vous m'avez accueilli dans votre laboratoire pour mon Master 2 et vous avez ensuite encadré le début de ma thèse. Merci pour tout, veuillez croire en mon profond et sincère respect.

Au Professeur Alain Blanchard,

Vous me faites l'honneur de présider ce jury de thèse. Veuillez croire en mon profond respect.

Au Docteur Sophie Jarraud, au Professeur Jean-Louis Koeck,

Je vous adresse mes remerciements pour avoir accepté d'examiner et de juger ce travail.

Au Docteur François Thiaucourt,

Je vous remercie de participer au jury de cette thèse et de nous faire part de votre expertise.

Au Professeur Michel Dupon,

Je vous remercie de participer au jury. Je vous remercie de l'enseignement que vous m'avez dispensé durant mon externat et mon stage d'interne, confirmant mon choix de me spécialiser en Infectiologie. J'apprécie vos connaissances, votre curiosité scientifique et surtout votre rigueur. Je vous remercie également pour le soutien que vous m'avez toujours porté, notamment pour mon futur au sein votre service. Pour toutes ces raisons, veuillez trouver le témoignage de ma sincère reconnaissance.

Au Professeur Jean-Marie Ragnaud,

Interne dans votre service, j'ai bénéficié de votre enseignement et je garde le souvenir de vos qualités pédagogiques. J'apprécie votre expertise médicale, votre sens clinique et votre humanité. Pour toutes ces qualités, veuillez recevoir le témoignage de mon profond respect. Je voulais également vous remercier pour la confiance que vous m'avez accordée en me proposant un clinicat dans votre service et pour avoir soutenu ma candidature auprès de Madame Bébéar et de Cécile pour mon Master 2.

A ma Famille,

A ma grand-mère,

Tu as toujours soutenu mes choix. Je pense tout particulièrement à toi en rédigeant cette thèse et en ce jour de soutenance, tu aurais tellement aimé être parmi nous.

A mes parents,

Vous avez toujours cru en moi. Cette thèse et cette dédicace sont pour moi le moyen de vous témoigner toute ma gratitude, ma reconnaissance et mon affection.

A mes frères, à Lydie et Sandrine,

Je vous remercie pour votre soutien et pour les bons moments passés et à venir.

A Sophie, Emilie et Mathilde,

Vous êtes les plus belles et les plus adorables des nièces. Restez les mêmes !

A Katy,

Tu m'as toujours encouragé et soutenu. Tu as supporté mes sautes d'humeur durant ces quatre années de thèse. Accepte mes remerciements.

**A mes amis,
A Nadège,**

Nous avons tant partagé sur les bancs du lycée, puis de la Faculté et même après. Les occasions de se voir sont rares, mais c'est toujours avec plaisir.

A Anne,
Ta fidélité et ta droiture sont pour moi un soutien sans faille.

A Hervé,
Tu m'as énormément soutenu et je t'en suis très reconnaissant. Merci pour tout !

A Hélène,
Nos petites « escapades gourmandes » mensuelles m'ont aidé à faire le vide et à évacuer la pression.

A Patricia,
Une pensée particulière pour une collègue devenue amie, confidente et toujours de bon conseil dans les moments de doute durant l'écriture de cette thèse. Veuillez croire en ma profonde sympathie.

**A tous mes autres amis du Béarn et d'ailleurs,
A tous mes anciens internes et co-internes de Médecine et de Pharmacie, à mes anciens collègues de Master 2,**
Je ne me lancerai pas dans l'énumération de vos prénoms. J'ai partagé avec chacun de vous de très bons moments, j'ai beaucoup appris à vos côtés. Vous êtes devenus des amis et c'est toujours avec un grand plaisir que nous nous revoyons.
Spéciale dédicace à Esti et Cécile, fidèles parmi les fidèles.

**A l'équipe du laboratoire de Bactériologie EA 3671 du Professeur Cécile Bébéar,
A Alain,**
« Que serais-je sans toi ? » disait J. Ferrat, mais que serait cette thèse sans toi ? Sans ton aide, tes précieux conseils, ta patience et ta rigueur... Bref, un très grand Merci !

A Hélène,
Tu as beaucoup contribué à l'élaboration de ce travail et je t'en remercie. J'ai apprécié ta rigueur et ta bonne humeur. J'ai également apprécié ces deux IOM passées avec toi et Joël.

A Sabine,
Je t'ai d'abord connu au laboratoire hospitalier quand j'étais interne, puis tu m'as appris à faire un « mix » de PCR lors de mon Master. Tu m'as ensuite conseillé pour la préparation de mon départ à l'étranger. Pour tout cela, je te suis très reconnaissant.

A Brigitte, à Cathy (« la Mamma »),
Merci pour votre bonne humeur et pour votre fidélité !

A Chloé,
Merci pour ton aide précieuse.

A Bertille, Cyril, Jeannette, Maïthé et à tous les autres anciens et actuels,

A tout le personnel du laboratoire de Bactériologie de l'hôpital Pellegrin,
Merci pour votre accueil et pour tout ce que vous m'avez appris à la paillasse.
Spéciale dédicace à Jamila pour ton aide dans les congélateurs à -80° C et pour les extractions...

A tous les membres des différents services où j'ai été interne et chef de clinique,
Je ne peux tous vous citer, mais sachez que vous resterez dans mon cœur. J'ai appris à vos côtés l'altruisme et l'humanité. Je suis admiratif du travail que vous accomplissez tout en discrétion et en efficacité dans chacun de vos services. Une pensée particulière aux services des Professeurs Ragnaud et Dupon qui m'ont accueilli et entouré durant ces quatre très belles années.
Spéciale dédicace aux formidables secrétaires (Amandine, Brigitte, Gigi, Jojo, Sylvette) et à Anne.

J'espère n'avoir oublié personne dans ces remerciements !

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN : acide désoxyribonucléique	MLSK : macrolides, lincosamides, streptogramines, kétolides
AFLP : amplified-fragment length polymorphism	MLST : multi locus sequence typing
ARN : acide ribonucléique	MLVA : multi-locus variable-number tandem-repeat analysis
ARNr : acide ribonucléique ribosomique	MST : minimal spanning tree
ARNt : acide ribonucléique de transfert	MST : multispacer typing
ATCC : american type culture collection	MTRT PCR : multitarget real-time PCR
BURST : based upon related sequence types	NASBA : nucleic acid sequence based amplification
CARDS : community acquired respiratory distress syndrome	pb : paire de bases
CLSI : clinical and laboratory standards institute	PCR : polymerase chain reaction
Da : Dalton	PCR-SSCP : PCR-single strand conformation polymorphism
DDGE : denaturing gradient gel electrophoresis	PFGE : pulsed-field gel electrophoresis
DLV : double locus variant	pH : potentiel d'hydrogène
ELGA : enzyme-linked gel assay	PID : pelvic inflammatory disease
ETR : exact tandem repeats	QRDR : quinolone resistance determining regions
GTS : gene-targeted sequencing	RAPD : random amplification of polymorphic DNA
HGDI : Hunter-Gaston diversity index	REA : restriction endonuclease analysis
HRM : high-resolution melting	RFLP : restriction fragment length polymorphism
IL : interleukine	SLV : single locus variant
IS : insertion sequence	SNP : single nucleotide polymorphism
ITS : internal transcribed spacer	ST : sequence type
kDa : kilo-Dalton	STR : short tandem repeat
kpb : kilo-paire de bases	TMA : transmission-mediated amplification
LAMP : lipid-associated membrane proteins	TR : tandem repeat
LCR : liquide céphalo-rachidien	TRF : tandem repeats finder
mbp : méga-paire de bases	UPGMA : unweighted pair group method using arithmetic averages
Mgpar : MgPa repeats	VNTR : variable number of tandem repeat
MIRU : mycobacterial interspersed repeats units	

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION ET OBJECTIFS	8
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	10
I <i>MYCOPLASMA GENITALIUM</i> ET <i>MYCOPLASMA PNEUMONIAE</i>.....	10
A. Généralités sur les mycoplasmes.....	10
1. Introduction.....	10
2. Mycoplasmes isolés chez l'homme	10
3. Taxonomie.....	11
4. Structure et métabolisme	11
5. Génome	12
B. <i>Mycoplasma genitalium</i>.....	13
1. Introduction.....	13
2. Epidémiologie	14
2.1 Chez les hommes et les femmes en population générale	14
2.2 Chez les hommes	15
2.3 Chez les femmes	16
2.4 Chez les patients immunodéprimés	16
2.5 Conséquences pratiques : dépistage systématique ?	17
2.6 Agent d'IST et mode de transmission	17
3. Physiopathologie	18
4. Pouvoir pathogène	19
4.1 Infections génitales masculines	19
4.2 Infections gynécologiques	20
4.3 Conséquences obstétricales	23
4.4 Autres localisations.....	24
4.5 En résumé.....	24
5. Diagnostic bactériologique.....	25
5.1 Diagnostic direct.....	25
5.2 Diagnostic sérologique.....	27
6. Sensibilité aux antibiotiques et traitement	27
6.1 Méthodes d'étude	27
6.2 Résistance naturelle	28
6.3 Résistance acquise.....	29
6.4 Traitement.....	30
C. <i>Mycoplasma pneumoniae</i>.....	32
1. Introduction.....	32
2. Epidémiologie	32
3. Physiopathologie	33
3.1 Adhésion et organelle d'attachement.....	33
3.2 Cytotoxicité et toxine CARDS	33
3.3 Réponse immunitaire de l'hôte	34
3.4 Physiopathologie des atteintes extra-respiratoires	35

3.5 Facteurs de risque d'infection	36
4. Pouvoir pathogène	36
4.1 Infections respiratoires	36
4.2 Rôle dans l'asthme	37
4.3 Manifestations extra-respiratoires	38
5. Diagnostic bactériologique	40
5.1 Diagnostic sérologique	41
5.2 Diagnostic direct.....	42
6. Sensibilité aux antibiotiques et traitement	44
6.1 Méthodes d'étude	44
6.2 Résistance naturelle	45
6.3 Résistance acquise.....	45
6.4 Traitement.....	47
6.5 Vaccin	48
II METHODES DE TYPAGE MOLECULAIRE	49
A. <i>Génotypage des bactéries pathogènes</i>	49
1. Définition et classification des marqueurs épidémiologiques.....	49
2. Mécanismes d'évolution bactérienne	49
3. Intérêt du génotypage des bactéries pathogènes et notion d'espèce	50
4. Concept de clonalité	51
4.1 Définition du déséquilibre de liaison.....	51
4.2 Structure des populations bactériennes, de la clonalité à la panmixie.....	51
4.3 Vitesse de mutation des marqueurs.....	52
B. <i>Méthodes de génotypage chez les Mollicutes</i>	52
1. Méthodes basées sur l'analyse de fragments.....	53
1.1 Méthodes avec restriction enzymatique	53
1.1.1 Electrophorèse en champ pulsé ou PFGE	53
1.1.2 Analyse du profil de restriction obtenu par une endonucléase	55
1.2 Méthodes avec amplification d'ADN	56
1.2.1 Amplification d'ADN par PCR suivie d'une migration sur gel.....	56
1.2.2 Amplification aléatoire.....	56
1.2.3 PCR suivi d'une électrophorèse sur gel en gradient dénaturant (PCR-DDGE)	57
1.2.4 PCR en temps réel HRM (« High-Resolution Melting »).....	58
1.2.5 Analyse Multilocus du nombre d'éléments répétés en tandem ou MLVA	59
1.3 Digestion enzymatique suivant une amplification de l'ADN.....	64
1.3.1 PCR avec analyse de polymorphisme de restriction intragénique	64
1.3.2 PCR avec analyse de polymorphisme de conformation de l'ADN simple brin (PCR-SSCP)	66
1.3.3 Amplification sélective de fragments de restriction génomique ou AFLP	66
2. Méthodes avec séquençage.....	68
2.1 Séquençage de gène	69
2.1.1 Séquençage d'un seul gène et analyse du polymorphisme de mutation ponctuelle	69
2.1.2 Séquençage de plusieurs gènes.....	71
2.2 Séquençage d'ADN non codant	73
2.2.1 ITS 16S-23S.....	73

2.2.2 Typage sur les espaces intergéniques	74
2.3 Séquençage de génomes	74
2.3.1 Principe	74
2.3.2 Application aux espèces bactériennes homogènes	75
2.3.3 Application aux <i>Mollicutes</i>	75
3. Méthodes basées sur l'hybridation	75
3.1 Analyse d'éléments répétés par hybridation ADN / ADN	75
3.1.1 PCR « ribotyping »	75
3.1.2 Utilisation de sondes de type séquences d'insertion ou IS	76
3.2 Hybridation sur puce à ADN	77
3.2.1 Principe	77
3.2.2 Microarrays	78
4. En résumé	80
C. Analyse et interprétation des résultats obtenus par les marqueurs génotypiques	80
1. Les profils électrophorétiques	80
1.1 Analyse visuelle	80
1.2 Analyse sur ordinateur	80
1.2.1 Principe	80
1.2.2 Dendrogrammes	81
2. Les séquences d'ADN	81
2.1 Comparaison des séquences d'ADN	81
2.2 Représentations : maximum de parcimonie, arbre minimal couvrant (MST), eBURST	82
3. Logiciel BioNumerics	83
D. Critères de performance des marqueurs	83
1. Typabilité	83
2. Reproductibilité	83
3. Stabilité	83
4. Pouvoir discriminant	84
5. Concordance épidémiologique	84
6. Choix et validation des marqueurs	84
E. Comparaison des performances des méthodes de génotypage	84
III METHODES DE GENOTYPAGE UTILISEES POUR <i>M. GENITALIUM</i> ET <i>M. PNEUMONIAE</i>	85
A. Méthodes utilisées pour <i>M. genitalium</i>	85
1. Méthodes basées sur l'analyse de fragments	85
1.1 Digestion enzymatique suivant une amplification de l'ADN	85
1.2 MLVA	85
2. Méthodes avec séquençage	85
2.1 Séquençage du gène de l'adhésine <i>mgpB</i>	85
2.2. Analyse multilocus	86
2.3 Séquençage de génomes	86
B. Méthodes utilisées pour <i>M. pneumoniae</i>	87
1. Méthodes basées sur l'analyse de fragments	87
1.1 PFGE	87
1.2 Avec amplification d'ADN	87

1.3 Avec amplification d'ARN	87
1.4 Digestion enzymatique suivant une amplification de l'ADN.....	88
2. Méthodes avec séquençage.....	88
2.1 Séquençage du gène de l'adhésine P1.....	88
2.2 Séquençage de plusieurs gènes	89
C. Synthèse	89
RESULTATS DES TRAVAUX.....	90
CHAPITRE 1 : PROTOCOLE FEMINIST	90
CHAPITRE 2 : DEVELOPPEMENT DE LA MLVA POUR LE TYPAGE MOLECULAIRE DE <i>M. GENITALIUM</i>	111
CHAPITRE 3 : DEVELOPPEMENT DE LA MLVA POUR LE TYPAGE MOLECULAIRE DE <i>M. PNEUMONIAE</i>.....	141
DISCUSSION - PERSPECTIVES.....	143
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	151
ANNEXES	166

LISTE DES FIGURES ET DES TABLEAUX

LISTE DES FIGURES

Etude bibliographique

I A. Généralités sur les mycoplasmes

Figure 1. Arbre phylogénétique des *Mollicutes* construit à partir des séquences d'ARNr 16S selon la méthode des distances.

I B. *Mycoplasma genitalium*

Figure 2. Trente études évaluant l'association entre *M. genitalium* et les urétrites non gonococciques chez les hommes.

Figure 3. Etudes évaluant l'association entre *M. genitalium* et les infections gynécologiques et leurs conséquences obstétricales.

Figure 4. Structure secondaire de l'ARNr 23S.

I C. *Mycoplasma pneumoniae*

Figure 5. Microscopie électronique à balayage d'une cellule de *M. pneumoniae* cultivée sur verre.

Figure 6. Microscopie électronique à transmission d'un anneau de trachée de hamster infecté par *M. pneumoniae*.

Figure 7. Illustration schématique de la localisation des protéines dans l'organelle d'attachement de *M. pneumoniae* en coupe longitudinale et transversale.

Figure 8. Rôle de *M. pneumoniae* dans l'asthme chronique.

Figure 9. Croissance de *M. pneumoniae* en milieu liquide.

Figure 10. Colonies de *M. pneumoniae* sur milieu Hayflick gélosé.

Figure 11. Structure secondaire de la boucle peptidyltransférase du domaine V de l'ARNr 23S de *M. pneumoniae*.

Figure 12. Fréquence de la résistance aux macrolides chez *M. pneumoniae* au Japon entre 2002 et 2005.

II A. Génomique des bactéries pathogènes

Figure 13. Arbre phylogénétique hypothétique décrivant la divergence évolutive de génotypes de pathogènes.

II B. Méthodes de génomique chez les *Mollicutes*

Figure 14. Principe général de la PFGE.

Figure 15. Représentation schématique de la méthode MLVA.

Figure 16. Page d'accueil de la base de données de répétitions en tandem.

Figure 17. Critères de recherche de répétitions en tandem dans la base de données « Tandem repeats database ».

Figure 18. Exemple des résultats d'une recherche de répétitions en tandem dans la base de données « Tandem repeats database » pour *M. genitalium* G37.

Figure 19. Différentes étapes de l'AFLP.

Figure 20. Différentes étapes du typage d'une bactérie par MLST.

II C. Analyse et interprétation des résultats obtenus par les marqueurs génotypiques

Figure 21. Exemples de représentations d'arbres selon un maximum de parcimonie ou un Minimal Spanning Tree.

Figure 22. Minimal Spanning Tree à partir des résultats de MLVA de 85 souches allemandes et sept souches de référence de *N. meningitidis*.

Figure 23. Représentation de complexes clonaux de souches de *S. aureus* typées par MLST.

Figure 24. Représentation selon un diagramme eBURST d'une population de souches de *S. aureus* typées par MLST.

Figure 25. Marqueurs génétiques et leur pouvoir discriminant au sein d'une espèce bactérienne.

Figure 26. Couverture du génome par les méthodes génotypiques.

III Méthodes de géotypage utilisées pour *M. genitalium* et *M. pneumoniae*

Figure 27. Exemples de types SNP d'après la séquence du gène *mgpB*.

Figure 28. Distribution en fonction du type P1 de 154 souches cliniques de *M. pneumoniae* isolées en France entre janvier 1994 et août 2006.

Figure 29. Représentation schématique des types 1 et 2 et du variant 2a du gène de l'adhésine P1 de *M. pneumoniae*.

Figure 30. Représentation schématique des divergences de séquence du gène de l'adhésine P1 de la souche Mp3896 et de trois souches de type 2, 1842, variants 2a et 2b.

LISTE DES TABLEAUX

Etude bibliographique

I A. Généralités sur les mycoplasmes

Tableau 1. Mycoplasmes isolés chez l'homme.

Tableau 2. Taille et pourcentage GC des génomes des mycoplasmes humains entièrement séquencés.

I B. *Mycoplasma genitalium*

Tableau 3. Prévalence de l'infection à *M. genitalium* selon le type de population.

Tableau 4. *Mycoplasma genitalium* et urétrites masculines : revue de la littérature.

Tableau 5. *Mycoplasma genitalium* et infections gynécologiques (avec leurs conséquences obstétricales) : revue de la littérature.

Tableau 6. Méthodes d'amplification d'acides nucléiques de *M. genitalium*.

Tableau 7. CMI des antibiotiques vis-à-vis de *M. genitalium* et *M. pneumoniae*.

Tableau 8. Revue des études de cohorte évaluant le traitement des infections à *M. genitalium*.

I C. *Mycoplasma pneumoniae*

Tableau 9. Principales manifestations extra-respiratoires au cours des infections à *M. pneumoniae*.

Tableau 10. PCR en point final décrites pour la détection de *M. pneumoniae*.

Tableau 11. Exemples de trousse commercialisées utilisant la PCR en point final pour la détection de *M. pneumoniae*.

Tableau 12. PCR multiplexes en point final décrites pour la détection simultanée de plusieurs agents responsables de pneumopathies atypiques dont *M. pneumoniae*.

Tableau 13. Exemples de trousse commercialisées multiplexes utilisant la PCR en point final pour la détection simultanée de plusieurs agents responsables de pneumopathies atypiques dont *M. pneumoniae*.

Tableau 14. Techniques de PCR en temps réel décrites pour la détection de *M. pneumoniae*.

Tableau 15. Exemples de trousse commercialisées monoplexes ou multiplexes utilisant la PCR en temps réel pour la détection de *M. pneumoniae*.

Tableau 16. CMI des antibiotiques du groupe MLSK pour des souches cliniques de *M. pneumoniae* résistantes aux macrolides et génétiquement caractérisées.

II B. Méthodes de génotypage chez les *Mollicutes*

Tableau 17. Critères d'interprétation du lien épidémiologique de souches bactériennes d'après l'analyse des profils de macrorestriction.

Tableau 18. Application de la PFGE aux *Mollicutes*.

Tableau 19. Comparaison des méthodes de génotypage basées sur l'analyse de fragments.

II C. Analyse et interprétation des résultats obtenus par les marqueurs génotypiques

Tableau 20. Comparaison des performances des principales méthodes de génotypage.

III Méthodes de génotypage utilisées pour *M. genitalium* et *M. pneumoniae*

Tableau 21. Différentes méthodes de génotypage appliquées à *M. genitalium* et *M. pneumoniae*.

INTRODUCTION ET OBJECTIFS

INTRODUCTION ET OBJECTIFS

Les mycoplasmes, bactéries très évoluées, ont des propriétés originales, absence de paroi, petit génome, exigences nutritionnelles complexes. Selon leur site primaire d'isolement, les mycoplasmes humains peuvent être séparés en espèces d'origine génitale et espèces d'origine respiratoire. Parmi les mycoplasmes génitaux, trois ont un pouvoir pathogène certain chez les sujets immunocompétents, *Mycoplasma genitalium*, *M. hominis*, et *Ureaplasma urealyticum*. *M. genitalium* est un agent infectieux émergent, connu depuis 1981 et responsable d'infections sexuellement transmissibles (IST), urétrites chez l'homme et cervicites et infections de l'appareil génital haut chez la femme. Sa recherche n'est pas systématiquement réalisée lors des bilans d'IST et son identification, par technique d'amplification d'acides nucléiques, reste rare. Ainsi, l'épidémiologie et le mode de dissémination de ce mycoplasme ne sont pas bien connus. Seul *M. pneumoniae* possède un pouvoir pathogène reconnu au niveau des voies respiratoires. Il est ainsi responsable d'infections respiratoires, le plus souvent d'évolution favorable mais pouvant s'accompagner d'atteintes extra-respiratoires aux conséquences parfois sévères. Ce mycoplasme se transmet sur un mode endémique, avec des poussées épidémiques décrites tous les quatre à sept ans, dont le mécanisme n'est pas clairement élucidé. Ainsi le développement d'outils d'épidémiologie moléculaire, simples et efficaces, est nécessaire à la compréhension de l'épidémiologie et de la dissémination des infections liées à ces deux mycoplasmes pathogènes humains.

Les méthodes de typage des bactéries sont de deux ordres, les méthodes phénotypiques et les méthodes génotypiques. Les dernières analysant plus spécifiquement le génome bactérien sont actuellement préférées aux premières, au pouvoir discriminant plus limité. Les méthodes génotypiques peuvent s'intéresser à une partie du chromosome bactérien, ou bien à l'ensemble du chromosome, ce qui est en général plus discriminant. De nombreuses méthodes génotypiques ont été appliquées aux *Mollicutes* depuis l'avènement de la PCR et de la Biologie moléculaire au début des années 90. Cependant, avant l'initiation de ce travail, il existait dans la littérature peu ou pas de méthodes génotypiques, discriminantes et automatisées, appliquées à *M. genitalium* et *M. pneumoniae*. Ce sont des espèces fastidieuses et rarement isolées en culture, particulièrement *M. genitalium*, d'où la nécessité d'établir une méthode de génotypage avec amplification d'ADN, réalisable directement à partir d'échantillons de patients infectés. Enfin, d'après les premières analyses génotypiques disponibles au début de ce travail, *M. pneumoniae* apparaissait être une espèce très homogène et peu variable, nous incitant à mettre au point une méthode de typage basée sur l'analyse de l'ensemble du chromosome.

C'est dans ce cadre que s'inscrit mon projet de thèse. **Mes objectifs** ont été tout d'abord de mettre en place un protocole de recherche clinique proposant un dépistage systématique du portage de *M. genitalium* chez les femmes infectées par le VIH de la cohorte Aquitaine (**protocole FeminIST**), dans le but d'enrichir notre collection de prélèvements positifs pour *M. genitalium* et de préciser la prévalence de cette infection dans cette population. Le deuxième et le troisième objectifs ont été de développer pour les deux espèces de mycoplasmes humains, *M. genitalium* et *M. pneumoniae*, la **MLVA pour « Multi-Locus Variable-Number of Tandem-Repeats Analysis »**, une méthode de génotypage automatisée étudiant sur la

globalité du génome le polymorphisme associé aux répétitions en tandem. Cette méthode a été mise au point directement à partir de 123 échantillons de patients positifs pour *M. genitalium* ou à partir de 265 souches cliniques pour *M. pneumoniae* en comparant les résultats obtenus à ceux des méthodes de typage classiquement décrites pour ces deux espèces.

L'étude bibliographique constitue la première partie de ce travail, suivie des résultats de nos travaux présentés en trois chapitres. Le premier chapitre décrit la mise en place et les résultats préliminaires du protocole de recherche clinique FeminIST. Le deuxième et le troisième chapitres décrivent, sous la forme de deux articles, la mise au point et les résultats de la MLVA pour *M. genitalium* et *M. pneumoniae*. Ces résultats sont suivis d'une discussion – perspectives et une conclusion globale termine le manuscrit. Est jointe en annexe la liste des publications et communications relatives aux mycoplasmes.

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Tableau 1. Mycoplasmes isolés chez l'homme (adapté d'après la référence 39).

Espèces	Site d'isolement primaire		Métabolisme	
	Oropharynx	Génital	Glucose	Arginine
Espèces pathogènes				
<i>M. pneumoniae</i>	+	-	+	-
<i>M. genitalium</i>	-	+	+	-
<i>M. hominis</i>	-	+	-	+
<i>Ureaplasma</i> spp. ^a	-	+	-	-
Espèces potentiellement pathogènes				
<i>M. fermentans</i>	+	+	+	+
<i>M. penetrans</i>	-	+	+	+
<i>M. amphoriforme</i>	+	-	+	-
Espèces commensales^b				
<i>M. salivarium</i>	+	-	-	+
<i>M. orale</i>	+	-	-	+
<i>M. buccale</i>	+	-	-	+
<i>M. faucium</i>	+	-	-	+
<i>M. lipophilum</i>	+	-	-	+
<i>M. primatum</i>	-	+	-	+
<i>M. spermatophilum</i>	-	+	-	+
<i>M. pirum</i>	?	?	+	+
<i>A. laidlawii</i>	+	-	+	-
<i>A. oculi</i>	?	?	+	-

^a Hydrolyse l'urée.

^b Les espèces les plus fréquemment retrouvées sont *M. salivarium* et *M. orale*.

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I *Mycoplasma genitalium* et *Mycoplasma pneumoniae*

A. Généralités sur les mycoplasmes

1. Introduction

Les mycoplasmes sont les plus petits organismes procaryotes capables de réplication autonome. Ils appartiennent à la classe des *Mollicutes* (de *mollis cutis* : peau molle), qui constitue un groupe de microorganismes ubiquitaires retrouvés chez l'homme, l'animal, les insectes et les plantes. Ils sont dotés de propriétés particulières comme l'absence de paroi ou la très petite taille de leur génome. L'absence de paroi a pour conséquences une insensibilité totale aux bêta-lactamines et autres antibiotiques agissant à ce niveau (18). Ce sont essentiellement des microorganismes extracellulaires, mais certaines espèces, dont *M. genitalium* et *M. pneumoniae*, peuvent pénétrer et survivre à l'intérieur des cellules (72, 322).

2. Mycoplasmes isolés chez l'homme

Connus dans le monde animal depuis la fin du XIX^e siècle, ce n'est qu'en 1937 que le premier cas d'infection humaine a été décrit. Il s'agissait d'une infection génitale, un abcès de la glande de Bartholin, dont le mycoplasme responsable était probablement *M. hominis*. Depuis, 16 autres espèces de mycoplasmes ont été isolées chez l'homme.

Selon leur site primaire d'isolement, les mycoplasmes peuvent être séparés en espèces d'origine respiratoire et espèces d'origine génitale.

- Les premières appartiennent au genre *Mycoplasma* et *Acholeplasma*. Beaucoup d'entre elles sont commensales, *M. salivarium* et *M. orale* étant les plus fréquentes (Tableau 1). Seul *M. pneumoniae* possède un pouvoir pathogène certain au niveau des voies respiratoires. *M. amphoriforme* est une nouvelle espèce de mycoplasme, rarement responsable d'infections des voies respiratoires (380, 389).

- Sept espèces ont été isolées au niveau des voies génitales. Six appartiennent au genre *Mycoplasma*, la dernière, *U. urealyticum*, au genre *Ureaplasma*. *U. urealyticum* est une espèce hétérogène chez laquelle 14 sérovars ont été initialement identifiés puis séparés en deux biovars, le biovar 1 rassemblant les sérovars 1, 3, 6 et 14 et le biovar 2 rassemblant les sérovars 2, 4, 5, et 7 à 13 (403, 405). Il est aujourd'hui proposé d'en faire deux espèces distinctes, *U. parvum* (ancien biovar 1) et *U. urealyticum* (ancien biovar 2) (232, 404). Parmi les mycoplasmes génitaux, trois ont un pouvoir pathogène certain chez les sujets immunocompétents, *M. genitalium*, *M. hominis* et *Ureaplasma* spp. Cependant, *M. hominis* et surtout *Ureaplasma* spp. peuvent être présents à l'état commensal dans les voies génitales basses de l'adulte. Enfin, il faut rappeler la place des mycoplasmes dans les infections chez les immunodéprimés, notamment chez les sujets hypogammaglobulinémiques.

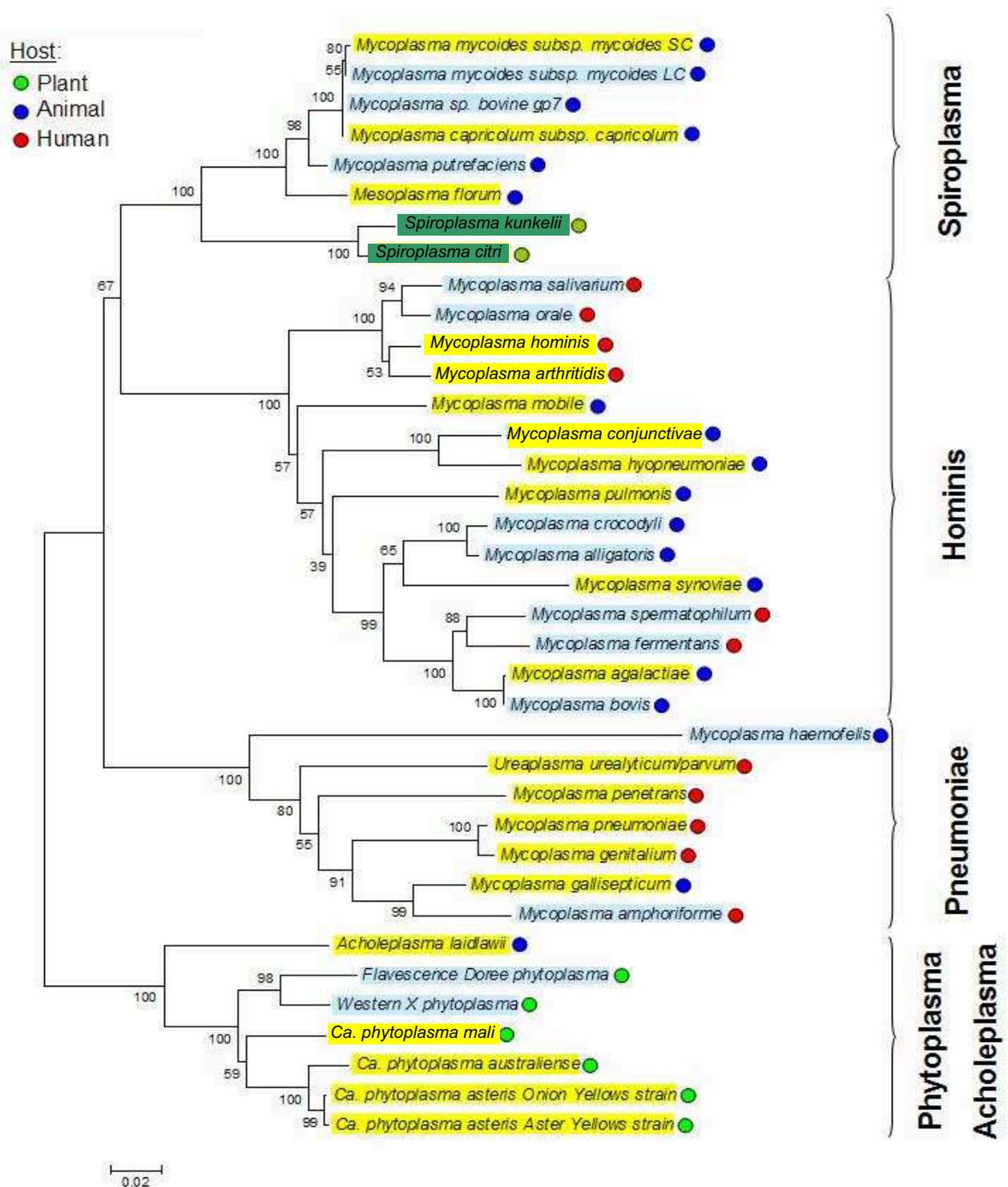


Figure 1. Arbre phylogénétique des *Mollicutes* construit à partir des séquences d'ADNr 16S selon la méthode des distances (adapté d'après le site MolliGen 3.0). Les groupes phylogénétiques sont indiqués à droite. Les nombres sur les branches correspondent aux valeurs statistiques de bootstrap. Encadré jaune, génome séquencé, encadré bleu, génome en cours de séquençage, encadré vert, génome séquencé incomplet.

3. Taxonomie

Les espèces isolées chez l'homme et l'animal appartiennent en très grande majorité à l'ordre des *Mycoplasmatales*, famille des *Mycoplasmataceae*, qui comprend les genres *Mycoplasma* et *Ureaplasma*. *M. genitalium* et *M. pneumoniae* sont deux des 108 espèces du genre *Mycoplasma*.

Sur le plan phylogénétique, l'étude des séquences des gènes codant les ARN ribosomiques (ARNr) 16S a montré que les mycoplasmes sont des eubactéries très évoluées, descendant d'un ancêtre commun avec les bactéries à Gram positif à faible pourcentage en guanine plus cytosine (GC %) tels que certains *Clostridia*, *Clostridium innocuum* et *C. ramosum* (516, 527), (Figure 1). Ils auraient évolué, à partir de ces ancêtres, par une réduction de la taille de leur génome et la perte de leur paroi. Selon les séquences des gènes des ARNr 16S, les *Mollicutes* sont divisés en cinq groupes phylogénétiques, le groupe *Anaeroplama*, le groupe *Spiroplasma*, le groupe *Hominis*, le groupe *Pneumoniae* et le groupe *Asteroleplasma* (Figure 1). Les espèces *M. pneumoniae* et *M. genitalium* appartiennent au groupe *Pneumoniae* (204, 205).

Il faut noter que la taxonomie et la phylogénie des *Mollicutes* ne sont pas superposables. Ainsi, le genre *Mycoplasma* est distribué dans plusieurs groupes phylogénétiques et certains groupes comprennent plusieurs genres de *Mollicutes*. Seul le groupe *Hominis* contient uniquement des membres du genre *Mycoplasma*.

4. Structure et métabolisme

Les mycoplasmes sont des bactéries de petite taille dont la caractéristique principale est l'absence de paroi. Microorganismes polymorphes, ils ne peuvent pas être colorés par la coloration de Gram et ne sont pas identifiables en microscopie optique. Limités seulement par une membrane cytoplasmique qui renferme des stérols, ils peuvent se déformer et traverser les filtres qui retiennent habituellement les bactéries.

Les mycoplasmes sont cultivables en milieu acellulaire mais présentent des exigences nutritionnelles complexes en raison de la petite taille de leur génome. Ainsi, *M. pneumoniae* et *M. genitalium* ne possèdent pas les gènes nécessaires à la synthèse des acides aminés et l'ensemble des espèces pathogènes pour l'homme sont exigeantes en cholestérol. Les milieux de cultures doivent donc être riches pour parer à ces carences. Ils renferment une base, du sérum source de cholestérol, des facteurs de croissance fournis par un extrait de levure et un substrat métabolique. Ces milieux sont rendus sélectifs par adjonction de pénicilline G ou d'ampicilline. Cependant, aucun milieu ne convient à toutes les espèces. Le milieu de Hayflick modifié et le milieu SP4 (510) conviennent pour les espèces du genre *Mycoplasma*, notamment *M. pneumoniae*, *M. hominis* et *M. genitalium*.

Des milieux liquides et des milieux gélosés peuvent être utilisés. La croissance en milieu liquide est détectée par le virage d'un indicateur coloré, le rouge de phénol, lié au métabolisme du mycoplasme. *M. pneumoniae* et *M. genitalium* qui fermentent le glucose, acidifient le milieu et font virer l'indicateur coloré au jaune. Les milieux gélosés ont une composition voisine de celle des milieux liquides, sans substrat

Tableau 2. Taille et pourcentage GC des génomes des mycoplasmes humains entièrement séquencés (adapté d'après les références 119, 137, 167, 381 et 417).

Espèces	Taille du génome (kpb)	GC %
<i>M. genitalium</i> G37	580	32
<i>M. pneumoniae</i> M129	816	40
<i>U. parvum</i> sérovar 3 ATCC 700970	752	25
<i>U. parvum</i> sérovar 3 ATCC 27815	752	25
<i>U. urealyticum</i> Western sérovar 10 ATCC 33699	874	26
<i>M. penetrans</i> HF-2	1359	26
<i>M. hominis</i> PG21	665	27

métabolique ni rouge de phénol. Les colonies sont de petite taille, de 50 à 300 µm de diamètre, et visibles seulement à la loupe binoculaire. Les mycoplasmes humains sont aéro-anaérobies facultatifs. Leur croissance en milieu gélosé est facilitée par une atmosphère enrichie en CO₂. Les délais nécessaires à la croissance des mycoplasmes sont variables. Pour *M. hominis* et *Ureaplasma* spp., la croissance est rapide, en 2 à 5 jours (j), tandis que pour *M. pneumoniae*, elle est beaucoup plus lente et nécessite 1 à 3 semaines. Enfin, la culture de *M. genitalium* est très fastidieuse, voire impossible en routine à partir d'échantillons cliniques. En revanche une souche de *M. genitalium* déjà isolée en culture poussera en 5 à 7 j.

5. Génome

Les connaissances fondamentales sur les mycoplasmes humains ont beaucoup progressé depuis 1995, avec l'obtention de la séquences complète du génome des 4 espèces pathogènes pour l'homme, *M. genitalium*, *M. pneumoniae*, *U. urealyticum* et tout récemment *M. hominis*, dont le séquençage a été coordonné par notre laboratoire (381).

La taille des génomes des *Mollicutes* varie de 580 kpb pour *M. genitalium* (119) à 2200 kpb pour *Spiroplasma ixodetis* (354), (Tableau 2). A ce jour, 29 génomes de *Mollicutes*, correspondant à 25 espèces, ont été séquencés et beaucoup d'autres sont en cours de séquençage. Parmi les mycoplasmes humains, *M. genitalium* (119), *M. pneumoniae* (167), deux génomes de *U. parvum* sérovar 3 (137), *U. urealyticum* sérovar 10, *M. penetrans* (417) et *M. hominis* (381) ont été séquencés et certains ont été publiés (Tableau 2).

Le site internet MolliGen rassemble les données disponibles des génomes de *Mollicutes* publiés. Ce site fournit diverses informations, comme les données sur les voies métaboliques, et une collection d'outils, notamment un navigateur permettant une comparaison de génomes inter-espèces, ainsi que des ensembles de données téléchargeables. Ce site a été créé par des chercheurs de l'Université Victor Segalen Bordeaux 2, il est désormais disponible dans sa version 3.0 à l'adresse suivante <http://cbi.labri.fr/outils/molligen> (15, 16).

Les génomes des mycoplasmes présentent un faible GC %, compris entre 23 et 40 selon les espèces. Il en existe de faibles variations le long du génome à l'exception de quelques régions comme celles des gènes des ARNr et des ARN de transfert (ARNt) dont le GC % est plus élevé. Par exemple, chez *M. genitalium*, le GC % des gènes des ARNr et des ARNt est de respectivement 44 et 52 alors que le GC % moyen du génome est de 32 (119). Ceci est en accord avec la nature très conservée des gènes des ARNr et des ARNt chez les procaryotes. Il existe chez les *Mollicutes*, à l'exception des acholeplasmes, phytoplasmes, asteroplasmes et anaeroplasmes, un usage particulier du code génétique. Le codon UGA n'est pas un codon de terminaison mais code pour le tryptophane (398).

Par ailleurs, des plasmides ont été détectés chez *S. citri* (46), chez *M. mycoides* subsp. *mycoides* et chez les phytoplasmes (398). Des virus ont aussi été décrits chez les *Mollicutes*, essentiellement chez les acholeplasmes et les spiroplasmes, plus rarement chez les mycoplasmes animaux.

Le génome des mycoplasmes est tellement réduit que beaucoup d'études de génétique comparée, de transcriptomique et de protéomique sont réalisées sur ces bactéries, notamment sur *M. genitalium* et *M. pneumoniae* (147, 238). Le concept de cellule minimale sera abordé ultérieurement.

Dans la course à la synthèse de génomes, des expériences inédites de transfert de génomes ont été récemment réalisées, en remplaçant le génome d'un mycoplasme par le génome synthétique d'un mycoplasme d'une autre espèce. Ce « tour de force » a été réalisé en plusieurs étapes. La première étape a été la synthèse et l'assemblage du génome de *M. genitalium* (*M. genitalium* JCVI-1.0) (131). Le génome de 583 kpb a été initialement synthétisé sous la forme de 101 cassettes de 5 à 7 kpb. Ces cassettes ont été ensuite assemblées *in vitro* par recombinaison entre quatre fragments de 144 kpb chacun. Enfin, pour produire une seule molécule d'ADN représentant l'ensemble du génome, les chercheurs ont réalisé une recombinaison *in vivo* dans la levure. La deuxième étape était de remplacer le génome d'un mycoplasme par celui d'une autre espèce de mycoplasme. Lartigue *et al.* ont cloné le génome de *M. mycoides* subsp. *mycoides* Large Colony (MMLC) dans un plasmide de levure qui a été introduit avec succès dans des cellules de *M. capricolum* par transformation (245, 246). La troisième étape a été de générer synthétiquement le génome de MMLC (*M. mycoides* JCVI-syn1.0), sur le même principe que pour la synthèse du génome de *M. genitalium*, et de le transférer dans la cellule receveuse *M. capricolum* (132). Pour distinguer leur génome de celui de souches non synthétiques, les chercheurs ont incorporé des séquences nucléotidiques spécifiques. Les cellules résultantes contenaient uniquement le génome synthétique, étaient capables de se répliquer et possédaient toutes les caractéristiques phénotypiques de MMLC. Cette avancée permettra la synthèse de nouvelles souches bactériennes, ceci étant particulièrement intéressant pour les espèces bactériennes, comme *M. mycoides*, pour lesquelles peu d'outils génétiques sont disponibles. Une des applications serait la création de vaccins vivants (246).

B. *Mycoplasma genitalium*

1. Introduction

Une nouvelle espèce de mycoplasme urogénital a été isolé pour la première fois en 1980 chez deux patients atteints d'urétrites non gonococciques (UNG) (489). Cette nouvelle espèce a été appelée *M. genitalium* en 1983 (491). C'est un agent reconnu d'IST chez l'homme (19, 412). *M. genitalium* fait partie, avec *M. hominis* et *U. urealyticum*, des trois espèces de mycoplasmes trouvées au niveau du tractus urogénital ayant un pouvoir pathogène (24). Son rôle, de mieux en mieux connu, est important à préciser en raison des échecs thérapeutiques dont il est responsable (191).

Il existe à ce jour sept souches de référence. La souche G37 est la première souche de référence, isolée d'un prélèvement urétral aux Etats-Unis. La deuxième souche de référence est la souche M30, également isolée d'un prélèvement urétral aux Etats-Unis. Les cinq autres souches sont extra-génitales. Quatre sont d'origine respiratoire, TW 10-5G, TW10-6G, R32G et TW48-5G, isolées de prélèvements de militaires américains en 1988 (17). La septième souche, UTMB-10G, est une souche

articulaire isolée en 1986 et déposée à l'American Type Culture Collection (ATCC) en 1988 (488). Ces cinq souches ont été isolées de cultures de *M. pneumoniae*. Plusieurs études (169, 229, 280) ont montré que ces sept souches ATCC étaient identiques et étaient probablement le fruit d'une contamination de laboratoire avec la souche G37 (169).

Après *Haemophilus influenzae* (117), c'est une des premières bactéries à avoir été totalement séquencée en 1995 (119). Son génome est le plus petit des *Mollicutes* entièrement séquencés. Il est composé de 580 kpb, soit 485 gènes, avec un minimum de bases entre eux. C'est le plus petit génome de bactérie capable de réplication autonome. *M. genitalium* illustre le concept de cellule minimale (136, 279). En effet, *M. genitalium* contient le set minimal de gènes nécessaires pour la croissance bactérienne (458). Récemment le génome de *M. genitalium* a été totalement synthétisé *in vitro*, assemblé et cloné dans la levure *Saccharomyces cerevisiae* (131, 246). Une centaine de gènes codant des protéines ne sont pas indispensables dans des conditions de culture de laboratoire, ceci ayant été mis en évidence par des expériences d'interruption de gènes par mutagenèse aléatoire par transposition (131, 135). Malgré cette petite taille, 4 % du génome est composé d'éléments répétés appelés Mgpar pour « MgPa repeats ». Ces éléments sont au nombre de neuf dans tout le génome. Ils présentent une homologie avec le gène *mgpB*, codant la protéine immunodominante MgPa, principale protéine d'adhésion de *M. genitalium* (183, 382).

2. Epidémiologie

Les principales études de prévalence des infections à *M. genitalium* sont représentées sur les Tableaux 3 à 5.

2.1 Chez les hommes et les femmes en population générale

Les études de prévalence de *M. genitalium* n'ont pu être possibles qu'avec l'avènement des méthodes de Biologie moléculaire mises au point au début des années 90, 10 ans après sa découverte (369).

L'une des premières véritables études de prévalence de l'infection à *M. genitalium* en population générale a été publiée par une équipe suédoise en 2005. Neuf cent quarante six patients symptomatiques et asymptomatiques, 445 femmes et 501 hommes, ont été inclus entre septembre 1995 et octobre 1997. Chez les hommes, *M. genitalium* et *C. trachomatis* étaient isolés chez 6,3 % et 4 % des patients, respectivement. L'âge médian des patients était de 25 ans. Sur les 125 patients avec une urétrite symptomatique, 17 étaient positifs pour *M. genitalium*, soit 13,6 %. Sur les 161 patients asymptomatiques, seulement 2 étaient positifs, soit 1,2 %. Chez les femmes, *M. genitalium* et *C. trachomatis* étaient isolés chez 6 % et 5,4 % des patientes, respectivement. L'âge médian des patientes était de 26 ans. Sur les 130 patientes symptomatiques (cervicite et/ou urétrite), 16 avaient une PCR positive, soit 12,3 %, contre seulement 3 des 138 asymptomatiques (2,2 %) (5).

Deux études récentes sur l'épidémiologie de l'infection à *M. genitalium* en population générale sont à signaler. La première est une étude danoise visant à

Tableau 3. Prévalence de l'infection à *M. genitalium* selon le type de population.

Lieu de l'étude	Période de l'étude	Effectif	Type de population	Caractéristiques des patients	Hommes (%)	Femmes (%)	<i>M. genitalium</i> + (%)	Référence
Etats-Unis	1991-1992	2 932	Population générale	Asymptomatiques 18 à 27 ans	1 218 (42 %)	1 714 (58 %)	33 (1 %)	(292)
Danemark	1997-1998	1 652	Population générale	Asymptomatiques 21 à 23 ans	731 (44 %)	921 (56 %)	1,1 % 2,3 %	(6)
Indiana, États-Unis	1999-2006	383	Population générale	Asymptomatiques 14-17 ans 90 % afro-américaines	NA ^a	383 (100 %)	52 (13,6 %) ^b	(485)
Melbourne, Australie	2001-2002	521	Population générale	Patients homosexuels asymptomatiques	521 (100 %)	NA	2,1 %	(43)
Madagascar	2002	643	Population générale	Asymptomatiques 15 à 49 ans	310 (48 %)	333 (52 %)	14 (4,5 %) 9 (2,7 %)	(251)
Miyazaki, Japon	2005-2006	298	Population générale	Asymptomatiques	NA	298 (100 %)	2,8 %	(154)
Japon	ND ^c	100	Population générale	100 étudiants hétérosexuels asymptomatiques	100 (100 %)	NA	1 (1 %)	(464)
Hanoi, Vietnam	ND	990	Population générale	Asymptomatiques 18 à 49 ans Milieu rural	NA	990 (100 %)	8 (0,8 %)	(363)
Garífunas, Honduras	ND	817	Population générale	Asymptomatiques 49 % de milieu rural	418 (51 %)	399 (49 %)	7,1 %	(372)
Londres, Angleterre	ND	169	Population générale	Asymptomatiques < 26 ans	NA	169 (100 %)	5 (3 %)	(460)
Pologne	ND	80	Patientes immunodéprimées	40 cas (greffées rénales, hémodialysées) 40 témoins	NA	80 (100 %)	2 (5 %) 1 (2,5 %)	(99)

-Suite-

Tableau 3. Suite.

Lieu de l'étude	Période de l'étude	Effectif	Type de population	Caractéristiques des patients	Hommes (%)	Femmes (%)	<i>M. genitalium</i> + (%)	Référence
Suède	1995-1997	946	A risque d'IST ^d	Patients symptomatiques et asymptomatiques	501 (53 %)	445 (47 %)	58 (6,1 %)	(5)
Suède	1997-2001	2 609	A risque d'IST	Patients symptomatiques et asymptomatiques	1 856 (71 %)	753 (29 %)	177 (6,8 %)	(193)
Oslo, Norvège	2005-2006	10 109	A risque d'IST	Patients symptomatiques et asymptomatiques	5 423 (54 %)	4 683 (46 %)	442 (4,5 %)	(202) ^e
Melbourne, Australie	2005-2007	1 851	A risque d'IST	Patients symptomatiques	1 538 (83 %)	313 (17 %)	191/1 846 (10,3 %)	(42)
Angleterre	2006	308	A risque d'IST	Asymptomatiques	168 (54 %)	140 (46 %)	14 (4,5 %)	(410)
St-Pétersbourg, Russie	2006-2007	406	A risque d'IST	Patients symptomatiques	125 (31 %)	281 (69 %)	12 (9,6 %) 7 (2,5 %)	(429)
Londres, Angleterre	1998-2000	1216	Femmes enceintes	ND	NA	1216 (100 %)	6/915 (0,7 %)	(361)
Pennsylvanie, Etats-Unis	1999-2001	216	Femmes enceintes	90 % afro-américaines 14 à 40 ans	NA	216 (100 %)	12 (5,6 %)	(431)
Danemark	2005-2006	102	Femmes enceintes	Patientes consultant pour IVG	NA	102 (100 %)	1 (0,98 %)	(12)
Nouvelle-Zélande	2005-2006	300	Femmes enceintes	Patientes consultant pour IVG	NA	300 (100 %)	26 (8,7 %)	(247)
Alabama, Etats-Unis	ND	124	Femmes enceintes	ND	NA	124 (100 %)	5 (3,9 %)	(272)

^a NA, non applicable, ^b Prévalence cumulée, ^c ND, non déterminé, ^d IST, infection sexuellement transmissible, ^e Etude rétrospective.

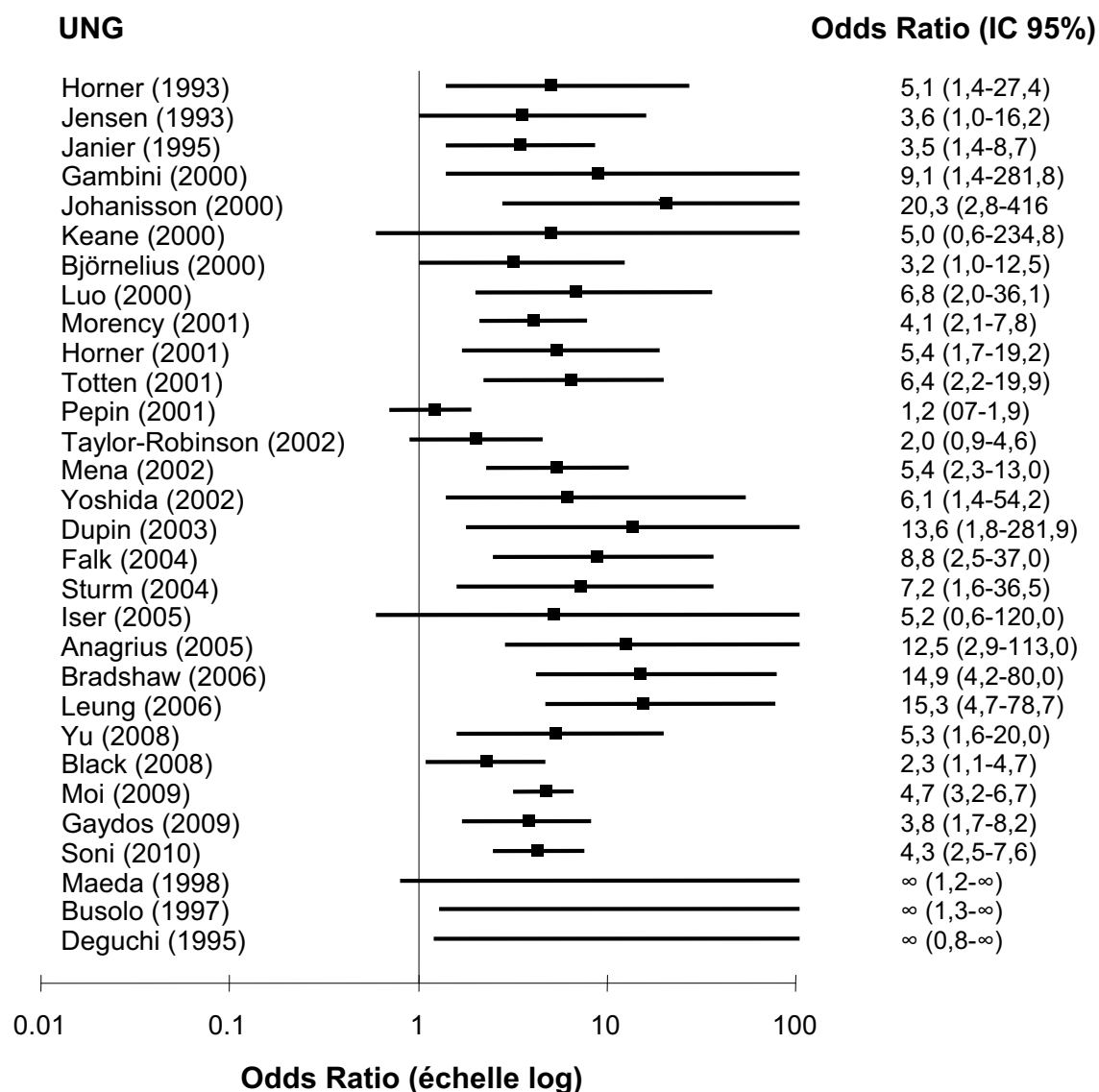


Figure 2. Trente études évaluant l'association entre *M. genitalium* et les urétrites non gonococciques (UNG) chez les hommes (avec l'autorisation de L. Manhart, (290)).

évaluer la prévalence de l'infection à *M. genitalium* dans la population générale chez 1 652 sujets asymptomatiques, par une PCR en temps réel sur des échantillons biologiques, premier jet d'urine pour l'homme et auto-écouvillonnage vaginal pour la femme. La prévalence d'infection était de 1,1 % chez les hommes et de 2,3 % chez les femmes, différence non significative (6). La deuxième portant sur 2 932 adolescents américains, 1 714 de sexe féminin et 1 218 de sexe masculin a évalué la prévalence de *M. genitalium* dans les urines à 1 % (292). Les résultats de ces études sont représentés sur le Tableau 3.

2.2 Chez les hommes

Les études cliniques sur les infections à *M. genitalium* à grande échelle ont objectivé un lien entre cette bactérie et les UNG. *M. genitalium* peut aussi être détecté chez des patients asymptomatiques (182). Nous avons identifié 30 études, publiées entre 1993 et 2010, incluant au moins 10 hommes présentant une UNG et utilisant la PCR pour évaluer la présence de *M. genitalium* (Figure 2). Dix huit de ces études (60 %) ont été publiées depuis la dernière revue de Jensen de 2004 (191). Vingt quatre de ces 30 études concernaient des pays développés (Etats-Unis, Europe, Japon, Australie et Hong-Kong) (5, 37, 44, 50, 79, 96, 104, 125, 127, 175, 176, 181, 186, 199, 203, 217, 250, 283, 320, 330, 444, 486, 539, 542). Quatre autres études incluaient des hommes dans des pays en voie de développement (Afrique sub-saharienne (38, 375, 455, 472), Afrique centrale (335), Chine (277)). Les 24 études menées dans les pays développés incluaient un total de 6 143 hommes présentant une UNG aiguë. Parmi toutes ces études, 794 des 6 143 (13 %) hommes avec une UNG présentaient une PCR *M. genitalium* positive. Dans ces mêmes études, 22 % des hommes présentaient une PCR *C. trachomatis* positive. *M. genitalium* serait donc responsable de 15 à 20 % des cas d'UNG et serait la deuxième cause d'UNG derrière *C. trachomatis* (127, 191, 250, 486). Certaines études placent même *M. genitalium* comme premier agent d'UNG, devant *C. trachomatis* (335).

Chez les hommes hétérosexuels, le taux de portage asymptomatique de *M. genitalium* est évalué à 1 % (464). Chez les hommes homosexuels, une étude récente portant sur 438 hommes, majoritairement asymptomatiques, a montré une prévalence de *M. genitalium* de 6,6 % avec une positivité des urines chez 2,7 % des patients et de l'écouvillonnage rectal chez 4,4 %. Le portage de *M. genitalium* était associé de façon significative à l'infection par le VIH à la différence de *C. trachomatis*. Enfin, la positivité des urines était corrélée à des symptômes cliniques à type de dysurie, alors qu'il n'y avait pas d'association entre le portage rectal et des symptômes cliniques rectaux (444). Une autre étude sur 521 hommes a été réalisée entre octobre 2001 et septembre 2002, la prévalence globale d'infection à *M. genitalium* était de 2,1 % et elle était inférieure à celle de *C. trachomatis* et *N. gonorrhoeae*. Cette étude trouvait des portages rectaux asymptomatiques, mais aucun portage pharyngé (43). Une étude bordelaise portant aussi sur des patients homosexuels infectés par le VIH ne trouvait pas de portage de *M. genitalium* au niveau rectal et pharyngé (353).

Chez l'homme, les facteurs de risque associés à l'infection à *M. genitalium* sont le jeune âge et un rapport dans le mois précédant la consultation avec un

partenaire sexuel ayant un antécédent récent de diagnostic ou de traitement d'IST (320).

2.3 Chez les femmes

Chez les femmes, concernant les études épidémiologiques en population générale, citons une étude américaine dont l'objectif était d'évaluer la prévalence du portage, symptomatique ou non, de *M. genitalium* au sein d'une population d'adolescentes par auto-écouvillonnage vaginal. La prévalence d'échantillons positifs pour *M. genitalium* était de 0,8 à 4,1 % (485). Dans un travail japonais réalisé sur 298 adolescentes, la prévalence de *M. genitalium* était de 2,8 % (154). D'après un très récent travail anglais, la prévalence globale du portage de *M. genitalium* était de 3 % (460), (Tableau 3).

Dans des populations à haut risque d'IST le portage de *M. genitalium* est élevé. Dans les centres à vocation de dépistage des IST, la prévalence de *M. genitalium* varie entre 4 % et 38 % (55, 179, 289). Elle est évaluée à 7,1 % dans une étude récente réalisée au Honduras où la prévalence du VIH est de 4,5 % (372) et à 26,3 % chez des prostituées africaines (374). A l'inverse dans les populations où le risque d'IST est faible la prévalence de *M. genitalium* est basse, par exemple 0,8 % chez des femmes mariées rurales au Vietnam (363), (Tableau 3).

Chez la femme, les facteurs de risque associés à l'infection à *M. genitalium* sont une relation sexuelle récente, un nombre élevé de partenaires sexuels, la durée plus brève d'une relation stable et un plus jeune âge lors du premier rapport sexuel (68, 154, 179, 293, 485). Une récente étude épidémiologique américaine, réalisée sur 586 femmes, a montré que l'âge inférieur à 25 ans et le tabagisme étaient indépendamment associés à l'infection par *M. genitalium* (433).

2.4 Chez les patients immunodéprimés

Concernant les patients infectés par le VIH, quelques études de la littérature ont évalué la fréquence des infections génitales à *M. genitalium* chez les hommes (303). Une première étude cas-témoin réalisée en Italie en 1999 a rapporté un portage de *M. genitalium* significativement plus élevé chez les patient au stade SIDA (56 %), comparé aux patients infectés par le VIH au stade A ou B (10 %) et aux patients non infectés par le VIH (7 %).

Peu d'études ont analysé spécifiquement la prévalence de l'infection à *M. genitalium* chez les femmes infectées par le VIH. Une étude de prévalence et d'incidence dans une population à haut risque de VIH a été menée chez des prostituées africaines (68). Il en ressortait une prévalence initiale d'infections à *M. genitalium* de 16 % et une incidence importante de 22,7/100 femmes/années, supérieure à celle de *C. trachomatis* et de *N. gonorrhoeae*. De plus, l'incidence des infections à *M. genitalium* était supérieure chez les femmes séropositives pour le VIH par rapport aux femmes séronégatives, suggérant des conduites à risques ou une immunodépression supérieures chez les femmes infectées par le VIH favorisant l'acquisition et la persistance de ce mycoplasme (68). Une autre étude portant sur 303 femmes séropositives pour le VIH est à signaler (293). Il s'agissait de femmes africaines kényanes, prostituées pour les trois quarts. Cette étude portait sur des

prélèvements réalisés entre 1994 et 1996. La prévalence du portage de *M. genitalium* était évaluée à 17 %.

Enfin, une méta-analyse sur les études épidémiologiques analysant l'association entre infections à *M. genitalium* et VIH a été publiée en 2009 (349). Dix neuf études ont été identifiées et analysées. La prévalence de *M. genitalium* variait de 3,1 % à 47,5 %. Dix sept études trouvaient que les patients infectés par *M. genitalium* étaient plus susceptibles d'être infectés par le VIH et cette association était statistiquement significative dans 12 études avec un odds ratio (OR) cumulé de 2,01 (intervalle de confiance à 95 % (IC 95 %) : 1,44-2,79).

Concernant d'autres causes d'immunodépression, *M. genitalium* n'était pas plus présent chez des femmes greffées rénales ou hémodialysées que chez les femmes du groupe témoin (5 % et 2,5 %, respectivement, différence non significative) (99), (Tableau 3).

2.5 Conséquences pratiques : dépistage systématique ?

En terme de santé publique, Ross *et al.* ont récemment évalué la prévalence des porteurs asymptomatiques de *M. genitalium* chez 1304 patients britanniques, 561 asymptomatiques et 743 symptomatiques, se présentant à un centre à vocation de dépistage des IST. Au total, 308 patients asymptomatiques avaient un prélèvement analysable et la prévalence de portage asymptomatique de *M. genitalium* était de 4,5 % (2,98 % chez les hommes, 6,43 % chez les femmes), (Tableau 3), celle de *N. gonorrhoeae* et de *C. trachomatis* étaient de 3,4 % et 9,8 %, respectivement. Il n'y avait pas d'association entre la présence de *M. genitalium* et l'âge des patients, leur sexe, leur origine ethnique, ni le site de prélèvement (410). Le taux d'infection à *M. genitalium* dans ce centre à vocation de dépistage des IST chez des patients asymptomatiques était comparable à celui de *N. gonorrhoeae* et de *C. trachomatis*, soulevant la question d'un dépistage systématique de *M. genitalium* dans cette population (410). En effet, à ce jour dans la plupart des pays, dont la Grande-Bretagne, les recommandations ne font pas état du dépistage systématique de *M. genitalium*. La question du dépistage systématique de *M. genitalium* chez les patients symptomatiques consultant dans les centres à vocation de dépistage des IST est également posée par les équipes nord-américaines (289).

2.6 Agent d'IST et mode de transmission

M. genitalium est sexuellement transmissible, comme ceci a été démontré dans plusieurs études. En effet, la prévalence de *M. genitalium* est significativement supérieure chez les partenaires des patients positifs à *M. genitalium* par rapport aux partenaires des patients négatifs pour *M. genitalium* présentant une urétrite ou une cervicite (5).

Le taux de transmission de *M. genitalium* est équivalent à celui de *C. trachomatis*, mais indépendamment de celui-ci (5, 103, 104). Keane *et al.* ont étudié 39 hommes présentant une UNG et leurs partenaires féminines. *C. trachomatis* était détecté chez six partenaires féminines (43 %) de 14 hommes positifs pour *C. trachomatis* et *M. genitalium* était détecté chez sept partenaires féminines (58 %) de 12 hommes positifs pour *M. genitalium* (216).

Dans une étude plus récente le rôle de *M. genitalium* comme agent d'IST a été démontré à l'échelon moléculaire. En effet, chez des couples infectés les prélèvements positifs à *M. genitalium* présentaient les mêmes génotypes au niveau du gène *mgpB* (169) ou avec d'autres marqueurs moléculaires (281).

La transmission de *M. genitalium* semble davantage liée aux relations sexuelles « génito-génitales » qu'aux rapports oro-génitaux. En effet dans une étude prospective japonaise portant sur 403 prostituées, *M. genitalium* a été trouvé dans 1,7 % des écouvillonnages vaginaux, mais dans aucun écouvillonnage pharyngé (81). De plus, d'après une étude de Bradshaw *et al.*, les UNG masculines à *M. genitalium* étaient davantage associées aux rapports vaginaux non protégés (45).

3. Physiopathologie

La principale cytoadhésine de *M. genitalium* est la protéine MgPa, ou protéine P140, dont le poids moléculaire est de 140 kDa. Elle est codée par le gène *mgpB*, présent sur le locus MG191 (49). C'est une protéine immunodominante, à l'origine de la réponse immunitaire de l'hôte. Des variations de séquences du gène *mgpB* ont été décrites et sont à l'origine des stratégies d'évasion immunologique de *M. genitalium* (184). La recombinaison homologue de portions de ce gène avec des éléments répétés du génome, les « MgPar », représente le mécanisme à l'origine de ces variations antigéniques, par l'intermédiaire de RecA et d'une protéine homologue de RecA, codée par le gène MG339 (440). La protéine P110 est une cytoadhésine accessoire de 110 kDa, codée par le gène *mgpC*, situé sur le locus MG192. Les mêmes variations de séquences de *mgpC*, par recombinaison homologue avec les régions MgPar, ont été décrites (184, 279). Ces deux cytoadhésines sont codées par l'opéron d'adhésion MgPa comprenant trois gènes, *mgpA*, *mgpB* et *mgpC* (279, 343).

Concernant les mécanismes d'adhésion, *M. genitalium* adhère à la surface des cellules épithéliales génitales très rapidement. En effet, une étude *in vitro* réalisées sur des cellules épithéliales cervicovaginales montre que *M. genitalium* adhère 2 h après l'infection. A 3 h, il y a même des bactéries internalisées dans les cellules (315). *M. genitalium* est donc une bactérie intra- et extracellulaire.

L'infection induit une réponse immunitaire innée. Bien que la phagocytose par les macrophages soit efficace pour éradiquer les mycoplasmes, la localisation intracellulaire dans les cellules épithéliales pourrait permettre à *M. genitalium* de survivre en échappant à la réponse immunitaire, permettant ainsi une infection chronique du tractus génital (315).

Les LAMP, « Lipid-associated Membrane Proteins », sont des lipoprotéines bactériennes qui sont exprimées à la surface cellulaire des mycoplasmes ; elles représentent les principales structures à l'origine de l'interaction entre les mycoplasmes et les cellules de l'hôte (413). Ces lipoprotéines sont connues pour être biologiquement très actives, elles sont les plus importantes protéines à l'origine de l'initiation de la réponse inflammatoire lors des infections à mycoplasmes (83, 352). Les récepteurs Toll-like ou TLR jouent un rôle essentiel dans l'initiation de la réponse inflammatoire, induisant l'activation de la voie NF- κ B. A ce jour 13 types de TLR ont été identifiés chez l'homme, ils sont indispensables pour induire la réponse

Tableau 4. *Mycoplasma genitalium* et urétrites masculines : revue de la littérature.

REFERENCE	« DESIGN » DE L'ETUDE	POPULATION ETUDIEE	DEFINITIONS URETRITE	RESULTATS
Urétrite aiguë				
Horner, 1993 (176)	Cas-témoins	N = 156 hommes britanniques (103 cas/53 contrôles) dans un centre à vocation de dépistage des IST Ages 19-53	≥ 5 PNN/champ ^a ET signes OU symptômes	Association significative avec UNG ^b 23 % vs. 6 % ; OR ^c = 5,1 (1,4-27,4) [†]
Jensen, 1993 (199)	Cas-témoins	N = 99 hommes danois (52 cas/47 contrôles) dans un centre à vocation de dépistage des IST Age NR ^d	≥ 5 PNN/champ ET signes de dysurie ET/OU écoulement	Association significative avec UNG 25 % vs. 9 % ; OR = 3,6 (1,0-16,2) [†]
Janier, 1995 (186)	Cas-témoins	N = 219 hommes français (122 cas/97 contrôles) dans un centre à vocation de dépistage des IST Age NR	Quels que soient les symptômes urétraux	Association significative avec écoulement 24 % vs. 8 % ; OR = 3,5 (1,4-8,7) [†]
Deguchi, 1995 (79)	Cas-témoins	N = 142 hommes japonais (114 cas/28 contrôles), site de recrutement NR Ages 18-48	≥ 5 PNN/champ ET signes/symptômes	Association significative avec UNG 15 % vs. 0 % ; OR = ∞ (1,2-∞) [†]
Busolo, 1997 (50)	Cas-témoins	N = 100 hommes italiens (56 cas/44 contrôles) dans un hôpital Ages 17-57	Quels que soient les symptômes urétraux	Association significative avec UNG 11 % vs. 0 % ; OR = ∞ (1,3-∞) [†]
Maeda, 1998 (283)	Cas-témoins	N = 171 hommes japonais (150 cas/21 contrôles) dans un service d'Urologie Ages 18-65	≥ 5 PNN/champ ET signes ET symptômes	Pas d'association significative avec UNG 13 % vs. 0 % ; OR = ∞ (0,8-∞) [†] Association significative avec UNGNC ^e 26 % vs. 0 % ; OR = ∞ (1,8-∞) [†]
Gambini, 2000 (125)	Cas-témoins	N = 201 hommes italiens (178 cas/23 contrôles) dans un centre à vocation de dépistage des IST Ages 17-70	< 5 PNN/champ ET signes	Association significative avec UNG 29 % vs. 4 % ; OR = 9,1 (1,4-381,8) [†]
Johannisson, 2000 (203)	Etudes transversales	N=233 hommes suédois dans un centre à vocation de dépistage des IST Ages 18-60	≥ 4 PNN/champ	Association significative avec UNG 15 % vs. 0,8 % ; OR = 20,3 (2,8-416) [†]

REFERENCE	« DESIGN » DE L'ETUDE	POPULATION ETUDIEE	DEFINITIONS URETRITE	RESULTATS
Keane, 2000 (217)	Cas-témoins	N = 51 hommes britanniques (39 cas/12 contrôles) dans un centre à vocation de dépistage des IST	≥ 5 PNN/champ sur écouvillon urétral OU ≥ 10 PNN/champ sur 1 ^{er} jet d'urine	Pas d'association significative avec UNG 33 % vs. 9 % ; OR = 5,0 (0,6-234,8) [†]
Björnellus, 2000 (37)	Cas-témoins	Age NR N = 101 hommes suédois (50 cas/51 contrôles) dans un centre à vocation de dépistage des IST	≥ 4 PNN/champ	Association significative avec UNG 26 % vs. 10 % ; OR = 3,2 (1,0-11,6) [†]
Luo, 2000 (277)	Etude transversale	Ages 18-51 N = 183 hommes chinois dans un centre à vocation de dépistage des IST	Symptômes urétraux	Association significative avec UNGNC 36 % vs. 10 % ; OR = 5,3 (2,0-8,2) [†]
Morency, 2001 (335)	Cas-témoins	Ages 13-58 N = 510 hommes d'Afrique Centrale (410 cas/100 contrôles) dans un centre à vocation de dépistage des IST	Ecoulement urétral	Association significative avec UNG 42 % vs. 15 % ; OR = 4,1 (2,1-7,8)
Horne, 2001 (175)	Cas-témoins	Age NR N = 178 hommes britanniques (114 cas/64 contrôles) dans un centre à vocation de dépistage des IST	≥ 5 PNN/champ ET signes	Association significative avec UNG 28 % vs. 7 % ; OR = 5,4 (1,7-19,2) [†]
Totten, 2001 (486)	Cas-témoins	Age NR N = 238 hommes des Etats-Unis (121 cas/117 contrôles) dans un centre à vocation de dépistage des IST	≥ 5 PNN/champ ET écoulement urétral	Association significative avec UNG 22 % vs. 4 % ; AOR [†] = 6,4 (2,2-19,9)
Pépin, 2001 (375)	Cas-témoins	Ages 16-49 N = 998 hommes d'Afrique de l'Ouest (659 cas/339 contrôles) dans un centre à vocation de dépistage des IST	Ecoulement urétral	Pas d'association avec UNG 10 % vs. 9 % ; OR = 1,2 (0,7-1,9)
Taylor-Robinson, 2002 (472)	Cas-témoins	Age NR N=182 hommes sud-africains (96 cas/169 contrôles) dans une clinique générale Ages 18-45	Ecoulement urétral ou dysurie	Association significative avec UNGNC 18 % vs. 9 % ; OR = 2,2 (1,3-3,9) Pas d'association significative avec UNG 17 % vs. 9 % ; OR = 2,0 (0,9-4,6) [†] Association significative avec UNGNC 20 % vs. 9 % ; OR = 2,5 (1,1-5,8) [†]

REFERENCE	« DESIGN » DE L'ETUDE	POPULATION ETUDIEE	DEFINITIONS URETRITE	RESULTATS
Mena, 2002 (320)	Cas-témoins	N = 281 hommes des Etats-Unis (97 cas/184 contrôles) dans un centre à vocation de dépistage des IST Ages 16-54	≥ 4 PNN/champ ET symptômes	Association significative avec UNG 31 % vs. 8 % ; OR = 5,4 (2,3-13) [†]
Yoshida, 2002 (539)	Cas-témoins	N=376 hommes japonais (300 cas/76 contrôles) dans un service d'Urologie Age NR	≥ 5 PNN/champ ET signes ET symptômes	Association significative avec UNGNC 28 % vs. 8 % ; OR = 4,8 (1,7-13,4) [†] Association significative avec UNG 14 % vs. 3 % ; OR = 6,1 (1,4-54,2) [†] Association significative avec UNGNC 20 % vs. 3 % ; OR = 9,1 (1,9-59,4) [†] Association significative avec UNG 22 % vs. 2 % ; OR = 13,6 (1,8-281,9) [†]
Dupin, 2003 (96)	Cas-témoins	N = 193 hommes français (83 cas/60 cas/50 contrôles) dans un centre à vocation de dépistage des IST Age NR	> 10 PNN/champ ET symptômes	
Falk, 2004 (104)	Cas-témoins	N = 519 hommes suédois (281 cas/238 contrôles) dans un centre à vocation de dépistage des IST Ages 16-67	≥ 10 PNN/champ	Association significative avec UNG 10 % vs. 1 % ; OR = 8,8 (2,5-37,0) [†] Association significative avec UNGNC 13 % vs. 1 % ; OR = 11,2 (3,1-47,6) [†]
Sturm, 2004 (455)	Cas-témoins	N = 435 hommes sud-africains (335 cas/100 contrôles) dans un centre à vocation de dépistage des IST Age NR	Symptômes urétraux	Association significative avec UNG 18 % vs. 3 % ; OR = 7,2 (1,6-36,5) [†] Association significative avec UNGNC 40 % vs. 3 % ; OR = 14,7 (2,6-93) [†]
Iser, 2005 (181)	Cas-témoins	N = 159 hommes australiens (80 cas/79 contrôles) dans un centre à vocation de dépistage des IST Age NR	≥ 5 PNN/champ ET symptômes depuis moins d'un mois	Pas d'association significative avec UNG 6 % vs. 1 % ; OR = 5,2 (0,6-120) [†]
Anagrus, 2005 (5)	Cas-témoins	N = 500 hommes suédois (125 cas/276 cas/222 contrôles) dans un centre à vocation de dépistage des IST Ages 17-67	> 4 PNN/champ ET symptômes	Association significative avec UNGNC 14 % vs. 1 % ; OR = 12,5 (2,9-113,0) [†]
Bradshaw, 2006 (44)	Cas-témoins	N = 636 hommes australiens (329 cas/307 contrôles) dans un centre à vocation de dépistage des IST Age NR	Groupe 1: symptômes urétraux Groupe 2: ≥ 5 PNN/champ ET symptômes	Association significative avec UNG Groupe 1 : 9 % vs. 1 % ; AOR = 14,7 (4,3-50,6) Groupe 2 : 13 % vs. 1 % ; OR = 14,9 (4,2-80,0) [†]

REFERENCE	« DESIGN » DE L'ETUDE	POPULATION ETUDIEE	DEFINITIONS URETRITE	RESULTATS
Leung, 2006 (250)	Cas-témoins	N = 680 hommes britanniques (302 cas/378 contrôles) dans un centre à vocation de dépistage des IST Age NR	≥ 5 PNN/champ OU ≥ 10 sur 1 ^{er} jet d'urine	Association significative avec urétrite 11 % vs. 0,8 % ; OR = 15,3 (4,7-78,7) Association significative avec UNGNC OR = 15,7 (4,7-81,8)
Yu, 2008 (542)	Etude transversale	N = 334 hommes de Hong Kong dans un centre à vocation de dépistage des IST Ages 18-75	≥ 5 PNN/champ ET signes OU symptômes	Association significative avec UNG 10 % vs. 2 % ; OR = 5,3 (1,6-20,0) [†]
Black, 2008 (38)	Etude transversale	N = 664 hommes sud-africains dans un centre à vocation de dépistage des IST Age NR	Cas (symptômes) Groupe contrôle 1 (ulcères génitaux, sans symptômes d'urétrite) Groupe contrôle 2 (sans symptômes d'urétrite, sans IST)	Association significative avec urétrite Groupe 1 : 14 % vs. 13 % ; OR = 1,1 (0,5-2,4) [†] Groupe 2 : 14 % vs. 7 % ; OR = 2,3 (1,1-4,7) [†]
Moi, 2009 (330)	Cas-témoins	N = 8 424 hommes norvégiens (3 024 cas/5 400 contrôles) dans un centre à vocation de dépistage des IST Age NR	Groupe 1 (symptômes) Groupe 2 (> 9 PNN/champ ET symptômes)	Association significative avec UNGNC Groupe 1 : 7 % vs. 2 % ; OR = 4,3 (3,4-5,5) Groupe 2 : 9 % vs. 2 % ; OR = 4,7 (3,2-6,7)
Gaydos, 2009 (127)	Etude transversale	N = 290 hommes des Etats-Unis dans un centre à vocation de dépistage des IST Age NR	≥ 5 PNN/champ	Association significative avec urétrite 22 % vs. 7 % ; AOR = 3,8 (1,7-8,2)
Soni, 2010 (444)	Etude transversale	N = 438 hommes britanniques dans un centre à vocation de dépistage des IST Ages 16-81	≥ 5 PNN/champ ET signes et symptômes	Association significative avec UNGNC 19 % vs. 5 % ; AOR = 4,3 (2,5-7,6) [‡]
Urétrite chronique ou récurrente				
Hooton, 1988 (174)	Cas-témoins	N = 121 hommes des Etats-Unis (37 cas/84 contrôles) dans un centre à vocation de dépistage des IST Age NR	≥ 5 PNN/champ ET persistance après ≥ 1 traitement(s) chez des hommes rapportant une abstinence ou l'utilisation de préservatifs	Association significative avec urétrite persistante 27 % vs. 12 % ; OR = 2,7 (0,9-8,1) [†]
Horner, 2001 (175)	Cas-témoins	N = 178 hommes britanniques (114 cas/64 contrôles) dans un centre à vocation de dépistage des IST Age NR	≥ 5 PNN/champ ET symptômes au moins une fois durant le suivi	Pas d'association significative avec urétrite chronique ou récurrente 13 % vs. 0 % ; OR = ∞ (0,9-∞) [†]

REFERENCE	« DESIGN » DE L'ETUDE	POPULATION ETUDIEE	DEFINITIONS URETRITE	RESULTATS
Taylor-Robinson, 2004 (471)	Cas-témoins	N = 78 hommes britanniques (52 cas/26 contrôles) dans un centre à vocation de dépistage des IST Ages 18-53	UNG chronique : ≥ 5 PNN/champ ET signes et symptômes UNG récurrente : urétrite résolutive après traitement mais récidivant ensuite	Pas d'association avec UNG chronique ou récurrente 21 % vs. 19 % ; OR = 1,13 (0,31-4,69) [†]

^a PNN/champ : polynucléaires neutrophiles par champ, ^b UNG : urétrite non gonococcique, ^c OR : odds ratio, ^d NR : non rapporté, ^e UNGNC : urétrite non gonococcique non chlamydienne, ^f AOR : odds ratio ajusté.

[†] Les odds ratios ont été calculés d'après les informations fournies par les articles.

[‡] Incluant les rectites à *M. genitalium*.

immunitaire. Parmi ces TLR, le TLR2, associé au TLR1 ou au TLR6, est un récepteur important de l'immunité innée contre les bactéries à Gram positif. Une étude récente a montré que les LAMP dérivées de *M. genitalium* activaient NF- κ B via TLR1, TLR2 et TLR6 (164).

4. Pouvoir pathogène

Le pouvoir pathogène des mycoplasmes urogénitaux, *M. hominis* et *Ureaplasma* spp., est souvent difficile à établir en raison de leurs présence à l'état commensal. Il peut exister un portage asymptomatique de *M. genitalium* comme il en a été discuté plus haut (410). Des modifications des postulats de Koch (critères épidémiologiques, réponse immunitaire, réponse au traitement, pouvoir pathogène expérimental) ont été proposées pour *M. genitalium* et ce mycoplasme paraît bien répondre à ces critères modifiés (191).

4.1 Infections génitales masculines

Chez l'homme, *M. genitalium* est une cause reconnue d'IST, essentiellement d'UNG aiguës mais aussi chroniques (191), (Tableau 4).

Les premières études cliniques utilisant la PCR, comme méthode diagnostique, datent de 1993. L'équipe danoise de Jensen a étudié des prélèvements urétraux, rectaux et pharyngés de 99 hommes se présentant à un centre à vocation de dépistage des IST. *M. genitalium* a été isolé sur 17 % des prélèvements urétraux, mais dans aucun des prélèvements rectaux et pharyngés, suggérant que le tractus urogénital est le site primaire d'infection. Des 48 patients avec une UNG, 27 % étaient positifs pour *M. genitalium* alors que seulement 9 % des 47 patients sans urétrite étaient positifs. Pour ceux présentant une urétrite, *M. genitalium* était trouvé plus souvent dans les UNG non chlamydiennes (35 %) que dans les UNG chlamydiennes (7 %), indiquant que ces deux microorganismes étaient à l'origine d'urétrites de façon indépendante (199). Simultanément, Horner *et al.* ont publié une étude avec les mêmes conclusions (176).

Les études qui ont suivi ont montré que *M. genitalium* était plus souvent associé à des urétrites symptomatiques qu'à des urétrites asymptomatiques (5, 37, 177, 479). Vingt études de prévalence des UNG, réalisées dans les pays développés, présentaient un groupe contrôle composé de sujets asymptomatiques. Toutes trouvaient que *M. genitalium* était plus souvent présent chez les hommes avec une UNG que chez les hommes sans urétrite, et cette différence était significative dans 16 études (80 %), avec des OR de 2,2 à 20,3 (Figure 2).

L'importance des symptômes semble corrélée à la charge bactérienne déterminée par PCR en temps réel (96, 194, 462, 539). Dans l'étude de Yoshida *et al.*, les patients présentant une UNG avaient des concentrations de *M. genitalium* significativement supérieures dans leur urines que les patients avec une urétrite gonococcique ou que les patients asymptomatiques. De même, les patients avec une UNG non chlamydienne avaient une charge bactérienne supérieure aux patients asymptomatiques (539). Pour l'étude de Jensen, les écouvillons urétraux de patients avec un écoulement urétral avaient un taux d'ADN significativement supérieur aux

écouvillons des patients sans écoulement, mais cette corrélation n'était pas retrouvée dans les urines (194).

Dix-neuf études cas témoins portant sur 3 879 patients ont été revues (191). Sur les 2 069 patients présentant une UNG, 21,1 % étaient positifs pour *M. genitalium* en PCR contre 6,7 % dans le groupe témoin sans UNG, il en résultait un OR de 3,8 (IC 95 % : 3,0-4,9, $p < 0,0001$). La prévalence de *M. genitalium* seul, déterminée dans les UNG non chlamydiennes de 15 études, était de 19,2 %, comparée à une prévalence de 28 % pour *C. trachomatis*. Une étude plus récente anglaise de grande ampleur, réalisée dans trois centres à vocation de dépistage des IST, confirme bien la place de *M. genitalium* comme deuxième agent d'UNG. En effet, il était retrouvé chez 10,9 % des patients symptomatiques, contre 20,9 % pour *C. trachomatis*, et seulement chez 0,8 % des patients asymptomatiques (250). Là aussi *M. genitalium* était fortement associé aux urétrites symptomatiques (OR : 10,76, IC 95 % : 3,10-37,29, $p < 0,0001$).

M. genitalium est aussi responsable d'urétrites chroniques (471). Concernant ces urétrites chroniques, il a été plusieurs fois suggéré que la persistance de *M. genitalium* dans l'urètre, après un traitement antibiotique, serait responsable de recrudescence d'UNG (82, 175, 284, 321, 471).

Concernant les urétrites post-gonococciques (UPG), la co-infection par *M. genitalium* est associée à un risque très accru d'UPG (538). D'où les recommandations de traiter de façon probabiliste les urétrites gonococciques avec des antibiotiques actifs contre *C. trachomatis* et *M. genitalium* (4).

Quelques études ont analysé l'implication de *M. genitalium* dans l'induction de cancer de la prostate. En effet, des travaux suggèrent qu'un pourcentage non négligeable de cancers, dont le cancer de la prostate, serait la conséquence d'une infection chronique. Ainsi, la société américaine de cancérologie estime que 20 % des cancers dans le monde seraient la conséquence d'une infection. A ce sujet, une étude récente a montré que *M. genitalium* pouvait induire *in vitro* la transformation de cellules prostatiques bénignes (BPH-1) en cellules malignes après 19 semaines de co-cultures (348). Cette découverte ouvre une voie de recherche sur les relations entre prostatite chronique et cancer de la prostate.

4.2 Infections gynécologiques

Le rôle des mycoplasmes est moins bien connu dans les infections féminines bien que les premières publications ayant isolé par PCR *M. genitalium* dans le tractus urogénital féminin (col et urètre) sont anciennes (201, 368). Le nombre d'études concernant le rôle pathogène de *M. genitalium* chez la femme est un peu moins important que chez l'homme, cependant *M. genitalium* semble effectivement impliqué dans les infections du tractus génital à différents niveaux.

4.2.1 Cervicites et urétrites

L'une des premières études démontrant le lien entre *M. genitalium* et cervicite date de 1997. La cervicite était définie par des critères cliniques (leucorrhées) et microscopiques (≥ 20 polynucléaires/champ). *M. genitalium* était détecté chez 5

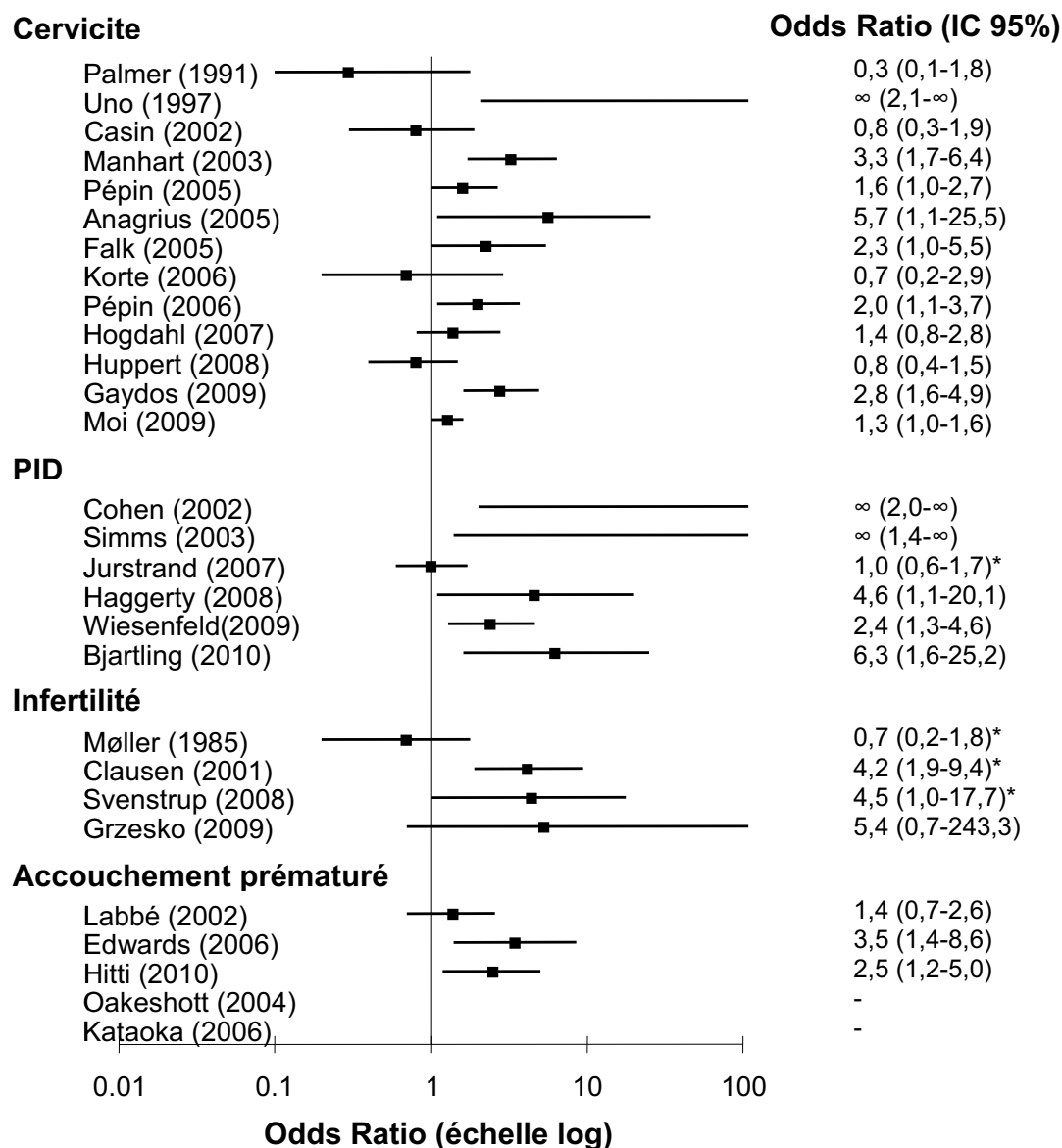


Figure 3. Etudes évaluant l'association entre *M. genitalium* et les infections gynécologiques et leurs conséquences obstétricales (avec l'autorisation de L. Manhart, (290)).

**M. genitalium* détecté par sérologie.

L'OR ne pouvait être calculé pour les études sur les accouchements prématurés d'Oakeshott (2004) et de Kataoka (2006) car aucun cas d'infection à *M. genitalium* n'avait été détecté dans ces deux études.

Tableau 5. *Mycoplasma genitalium* et infections gynécologiques (avec leur conséquences obstétricales) : revue de la littérature.

REFERENCE	« DESIGN » DE L'ETUDE	POPULATION ETUDIEE	DEFINITIONS CLINIQUES	RESULTATS
Cervicite et Urétrite				
Palmer, 1991 (368)	Etude transversale	N = 57 femmes britanniques dans un centre à vocation de dépistage des IST Ages 16-40	Inflammation observable ET pus cervical ET/OU ≥ 20 PNN/champ ^a	Pas d'association avec cervicite 13 % vs. 31 % ; OR ^b = 0,3 (0,1-1,8) [†]
Uno, 1997 (493)	Cas-témoins	N = 200 femmes japonaises (120 cas/80 contrôles) dans une clinique gynécologique Ages 19-49	Ecoulement endocervical OU ≥ 20 PNN/champ	Association significative avec cervicite 9 % vs. 0 % ; OR = ∞ (2,1-∞) [†]
Casin, 2002 (55)	Etude transversale	N = 170 femmes françaises dans un centre à vocation de dépistage des IST Ages 18-50	Col érythémateux OU écoulement cervical mucopurulent OU ≥ 10 PNN/champ	Pas d'association avec cervicite 37 % avec écoulement mucopurulent vs. 43 % sans ; OR = 0,8 (0,3-1,9)
Manhart, 2003 (291)	Etude transversale	N = 719 femmes des Etats-Unis dans un centre à vocation de dépistage des IST Ages 16-45	Ecoulement cervical mucopurulent OU ≥ 30 PNN/champ	Association significative avec cervicite 11 % vs. 5 % ; AOR ^c = 3,3 (1,7-6,4)
Pépin, 2005 (374)	Etude transversale	N = 826 femmes d'Afrique de l'Ouest dans un centre à vocation de dépistage des IST Ages > 18 (24% > 40 ans)	Ecoulement cervical OU pus sur écouvillon cervical OU saignement cervical après prélèvement OU érythème cervical	Association significative avec cervicite et pus sur écouvillon cervical ; AOR = 1,6 (1,0-2,7)
Anagrus, 2005 (5)	Etude transversale	N = 443 femmes suédoises dans un centre à vocation de dépistage des IST Ages 14-55	Cervicite (≥ 30 PNN/champ) Urétrite (> 4 PNN/champ)	Association significative avec cervicite 11 % vs. 5 % ; OR = 5,7 (1,1-25,5) [†] Association significative avec urétrite 9 % vs. 4 % ; OR = 3,4 (1,1-11,6) [†]
Falk, 2005 (103)	Etude transversale	N = 461 femmes suédoises dans un centre à vocation de dépistage des IST Ages 15-54	Cervicite, définition clinique Urétrite (> 4 PNN/champ)	Association significative avec cervicite 9 % vs. 4 % ; OR = 2,3 (1,0-5,5) [†] Pas d'association avec urétrite 7 % vs. 5 % ; OR = 1,4 (0,5-3,5) [†]
Korte, 2006 (233)	Cas-témoins	N = 390 femmes des Etats-Unis (283 cas/107 contrôles) Ages 17-49	Pus sur écouvillon cervical	Pas d'association avec cervicite Culture : 50 % vs. 18 % ; AOR = 4,1 (0,8-22,4) PCR : 70 % vs. 71 % ; AOR = 0,7 (0,2-2,9)

REFERENCE	« DESIGN » DE L'ETUDE	POPULATION ETUDIEE	DEFINITIONS CLINIQUES	RESULTATS
Pépin, 2006 (376)	Etude transversale	N = 1 570 femmes d'Afrique de l'Ouest Ages 11-> 30	≥ 30 PNN/champ	Association significative avec cervicite AOR = 2,0 (1,1-3,7)
Hogdahl, 2007 (171)	Etude transversale	N = 417 femmes suédoises dans un centre à vocation de dépistage des IST Ages 17-50	Cervicite (≥ 30 PNN/champ) Urétrite (≥ 4 PNN/champ)	Pas d'association significative avec cervicite 8 % vs. 6 % ; OR = 1,4 (0,8-2,8) [†] Association significative avec urétrite 10 % vs. 5 % ; OR = 2,1 (1,1-3,9) [†]
Huppert, 2008 (179)	Etude transversale	N = 331 femmes des Etats-Unis dans un centre pour adolescents Ages 14-21	Ecoulement cervical OU col « friable »	Pas d'association avec cervicite 24 % vs. 28 % ; OR = 0,8 (0,4-1,5) [†]
Gaydos, 2009 (126)	Etude transversale	N = 324 femmes des Etats-Unis dans un centre à vocation de dépistage des IST Age NR ^d	Ecoulement cervical OU col « friable »	Association significative avec cervicite 29 % vs. 13 % ; OR = 2,8 (1,6-4,9)
Moi, 2009 (330)	Etude transversale	N = 7 646 femmes norvégiennes dans un centre à vocation de dépistage des IST Age NR	Cervicite (> 30 PNN/champ sur écouvillon cervical) Urétrite (≥ 10 PNN/champ sur écouvillon cervical)	Pas d'association significative avec cervicite 4 % vs. 3 % ; OR = 1,3 (1,0-1,6) Association significative avec urétrite 4 % vs. 2 % ; OR = 2,1 (1,5-2,9)
Infection du Tractus Génital Haut				
Møller, 1984 (331)	Etude transversale	N = 31 femmes danoises avec PID aiguë dans une clinique gynécologique Age NR	PID ^e diagnostiquée cliniquement MG ^f détecté par sérologie	39 % des femmes avec PID avaient un changement d'au moins un facteur 4 de leur titre d'Ac anti-MG entre la phase aiguë et la phase de convalescence
Lind, 1987 (260)	Etude transversale	N = 95 femmes suédoises avec PID diagnostiquée cliniquement dans un service de Gynécologie Age NR	Salpingite diagnostiquée par laparoscopie (n = 10 sans laparoscopie) MG détecté par sérologie	Pas d'association avec salpingite – pas d'augmentation significative des taux d'Ac anti-MG chez les femmes avec salpingite aiguë
Cohen, 2002 (66)	Cas-témoins	N = 115 femmes kényanes (58 cas/57 contrôles) dans un centre à vocation de dépistage des IST Ages 18-40	Endométrite histologique MG diagnostiqué par PCR	Association significative avec endométrite 12 % vs. 0 % ; OR = ∞ (2,0-∞) [†]
Simms, 2003 (434)	Cas-témoins	N = 82 femmes britanniques (45 cas dans une clinique généraliste/37 contrôles) Ages 16-46	PID diagnostiquée cliniquement MG diagnostiqué par PCR	Association significative avec PID 13 % vs. 0 % ; OR = ∞ (1,4-∞) [†]

REFERENCE	« DESIGN » DE L'ETUDE	POPULATION ETUDIEE	DEFINITIONS CLINIQUES	RESULTATS
Cohen, 2005 (67)	Cas-témoins	N = 123 femmes kényanes Ages 18-40	Salpingite diagnostiquée par laparoscopie MG diagnostiqué par PCR	MG détecté dans trompe de Fallope chez une seule femme VIH+
Jurstrand, 2007 (210)	Cas-témoins	N = 673 femmes suédoises (194 cas PID/84 cas GEU ⁹ /246 contrôles) dans une clinique gynécologique Ages 15-50	PID du post-partum diagnostiquée cliniquement GEU diagnostiquée cliniquement MG détecté par sérologie	Pas d'association avec la sévérité de la salpingite Pas d'association avec PID 17 % vs. 15 % ; AOR = 1,0 (0,6-1,7) Pas d'association avec GEU 18 % vs. 15 % ; AOR = 1,0 (0,5-2,0)
Haggerty, 2008 (152)	Etude transversale	N = 586 femmes des Etats-Unis avec PID diagnostiquée cliniquement Ages 14-37	Endométrite histologique MG diagnostiqué par PCR	Association significative avec endométrite 50 % vs. 19 % ; AOR = 4,6 (1,1-20,1)
Bjartling, 2010 (35)	Cas-témoins	N = 217 femmes suédoises (49 MG+ cas/168 MG- contrôles) dans une clinique gynécologique Ages 17-40	PID diagnostiquée cliniquement MG diagnostiqué par PCR	Association significative avec PID 60 % vs. 21 % ; AOR = 6,3 (1,6-25,2)
Infertilité				
Møller, 1985 (332)	Cas-témoins	N = 106 femmes danoises (45 cas/61 contrôles) dans une clinique gynécologique pour bilan d'infertilité Ages 20-38	Infertilité diagnostiquée sur HSG ^h MG détecté par sérologie	Pas d'association avec infertilité 20 % vs. 28 % ; OR = 0,7 (0,2-1,8) [†]
Clausen, 2001 (64)	Cas-témoins	N = 308 femmes danoises (132 infertilités tubaires/176 contrôles) dans une clinique spécialisée dans l'infertilité Age NR	Infertilité tubaire définie sur des critères d'HSG ET de laparoscopie MG détecté par sérologie	Association significative avec infertilité tubaire 22 % vs. 6 % ; OR = 4,2 (1,9-9,4) [†]
Svenstrup, 2008 (461)	Cas-témoins	N = 194 couples danois (30 infertilités tubaires/164 contrôles) dans une clinique spécialisée dans l'infertilité Age NR	Infertilité tubaire définie par laparoscopie MG détecté par sérologie	Association significative avec infertilité tubaire 17 % vs. 4 % ; OR = 4,5 (1,0-17,7) [†]
Grzesko, 2009 (145)	Cas-témoins	N = 74 femmes polonaises (51 cas/23 contrôles) dans une clinique gynécologique Ages 24-44	Infertilité explorée par laparoscopie MG diagnostiqué par PCR	Pas d'association significative avec infertilité, mais tendance 20 % vs. 4 % ; OR = 5,4 (0,7-243,3) [†]

REFERENCE	« DESIGN » DE L'ETUDE	POPULATION ETUDIEE	DEFINITIONS CLINIQUES	RESULTATS
Accouchement prématuré				
Labbe, 2002 (242)	Cas-témoins	N = 1 014 femmes d'Afrique de l'Ouest (414 cas/600 contrôles) Ages 14-> 25	Cas (enfants mort-nés, avortements spontanés, prématurés, enfants hypotrophes) Contrôles (enfants à terme > 2 500 g)	Pas d'association avec : Mort-nés 6 % vs. 6 % ; OR = 1,1 (0,4-2,4) Avortements 4 % vs. 6 % ; OR = 0,6 (0,1-2,5) Prématurés 8 % vs. 6 % ; OR = 1,4 (0,7-2,6) Hypotrophes 3 % vs. 6 % ; OR = 0,4 (0,01-2,8)
Oakeshott, 2004 (361)	Etude de cohorte	N = 915 femmes britanniques Ages 16-48	Fausse couche (< 16 semaines) OU prématurité (< 37 semaines)	Pas d'association avec fausse couche ou prématurité Prématurité 0 % vs. < 1 % ; RR ⁱ = 0,0 (-) [†] Fausse couche 1 % vs. < 1 % ; RR = 1,6 (0,3-9,8) [†]
Kataoka, 2006 (215)	Etude de cohorte	N = 877 femmes japonaises Age NR	Prématurité (< 36 semaines)	Pas d'association avec prématurité 0 % vs. 0,8 % ; RR = 0,0 (-) [†]
Edwards, 2006 (98)	Etude de cohorte	N = 134 femmes des Etats-Unis Age NR	Prématurité (< 36 semaines)	Association significative avec prématurité AOR = 3,5 (1,4-8,6)
Hitti, 2010 (168)	Cas-témoins	N = 1 328 femmes péruviennes (661 cas/667 contrôles) Age NR	Cas (prématurité, 20-36 semaines de gestation) Contrôles (délivrance spontanée, ≥ 37 semaines de gestation)	Association significative avec prématurité 4 % vs. 2 % ; AOR = 2,5 (1,2-5,0)

^a PNN/champ : polynucléaires neutrophiles par champ, ^b OR : odds ratio, ^c AOR : odds ratio ajusté, ^d NR : non rapporté, ^e PID : « Pelvic Inflammatory Disease », ^f MG : *Mycoplasma genitalium*, ^g GEU : grossesse extra-utérine, ^h HSG : hystéro-salpingographie, ⁱ RR : risque relatif.

[†] Les odds ratios ou les risques relatifs ont été calculés d'après les informations fournies par les articles.

femmes symptomatiques sur 64 (7,8 %) et chez aucune des 80 patientes contrôles enceintes et asymptomatiques (493).

Des nouvelles données sont apparues ces dernières années démontrant l'implication de *M. genitalium* dans les cervicites. Dans l'étude rétrospective de Manhart *et al.*, les femmes présentant une cervicite muco-purulente étaient 3,1 fois plus susceptibles d'être infectées par *M. genitalium* que les femmes sans cervicite (291). *M. genitalium* serait d'ailleurs le seul mycoplasme humain impliqué dans la genèse des cervicites muco-purulentes et des urétrites féminines (103, 291). Gaydos *et al.* ont mené une étude sur la prévalence de divers micro-organismes chez les femmes consultant dans un centre à vocation de dépistage des IST et ont fait le lien avec la présence d'une cervicite, définie par des critères rigoureux. La prévalence d'infection à *M. genitalium* était élevée à 19,2 % et la prévalence chez les 133 femmes présentant une cervicite était de 28,6 %. Après ajustement, seul *M. genitalium* était significativement associé à la présence d'une cervicite (126).

Ces cervicites sont peu symptomatiques sur le plan clinique ce qui rend délicat leur diagnostic (479). Dans l'étude de Falk *et al.*, il n'y avait pas de différence de symptôme et de signe clinique entre les infections à *C. trachomatis* et à *M. genitalium* (103). Il semblerait que l'importance des signes cliniques de cervicite (leucorrhées, pus au niveau du col, saignements lors du prélèvement cervical et col d'aspect inflammatoire à l'examen) soit corrélée à une prévalence élevée de l'infection à *M. genitalium*, ce qui a été notamment démontré dans les cohortes de patientes africaines (374).

Une seule étude française est à signaler, elle portait sur 170 femmes consultant pour des leucorrhées dans un centre à vocation de dépistage des IST avec ou sans signes d'urétrite. Elle trouvait une importante prévalence de portage vaginal de *M. genitalium* (38 %), sans lien avec des manifestations cliniques de cervicite ou d'urétrite (55).

Au total, 13 études menées aux Etats-Unis, en Europe, au Japon et en Afrique de l'Ouest ont évalué le lien entre *M. genitalium* et cervicite (5, 55, 103, 126, 171, 179, 233, 291, 330, 368, 374, 376, 493). Les populations de ces études variaient de 57 à 7 676 femmes et dans toutes sauf une (233) étaient réalisés des tests d'amplification d'acides nucléiques pour rechercher *M. genitalium*. Les résultats de ces études sont parfois contradictoires et sept des 13 études (54 %) rapportaient une association significative entre *M. genitalium* et cervicite (5, 103, 126, 291, 374, 376, 493). Six des 13 études (46 %) ne trouvaient pas d'association significative (55, 171, 179, 233, 330, 368), (Figure 3, Tableau 5). En général, les études utilisant uniquement des critères cliniques de cervicite étaient moins susceptibles d'objectiver une association entre *M. genitalium* et cervicite (179, 233). Les OR statistiquement significatifs variaient entre 2,0 et 5,7 (Figure 3, Tableau 5).

En résumé, *M. genitalium* semble être à l'origine de cervicites, mais cette association est remise en question par certaines études et mérite d'être précisée.

M. genitalium peut être également à l'origine d'urétrites féminines qui sont parfois difficiles à distinguer cliniquement des cervicites. Dans l'étude d'Anagrus, *M. genitalium* était détecté trois fois plus souvent chez les femmes présentant une

urétrite (définie par des critères cliniques et microscopiques) que chez celles sans urétrite, 9,2 % vs. 2,6 % (5). Une étude plus récente confirme aussi le rôle de *M. genitalium* dans les urétrites (330). De plus, l'examen sur premier jet d'urine était moins sensible que l'écouvillonnage cervical pour la recherche de *M. genitalium*, mais beaucoup plus spécifique d'une infection urébrale (Tableau 5).

A la différence de *M. hominis*, *M. genitalium* ne semble pas impliqué dans les vaginoses bactériennes, caractérisées par un déséquilibre de la flore (217, 291).

4.2.2 Infections génitales hautes

La problématique des infections du tractus génital haut est très importante pour déterminer l'impact des infections génitales basses et leurs conséquences. La maladie inflammatoire pelvienne ou « pelvic inflammatory disease » (PID), est une atteinte sévère du tractus génital haut, utérus, trompes et ovaires. Les manifestations cliniques aiguës sont variées, à type notamment d'endomérites ou de salpingites. Les conséquences obstétricales à long terme seront détaillées plus loin. Les PID sont le plus souvent la conséquence d'infections polymicrobiennes. *C. trachomatis* et *N. gonorrhoeae* sont présents dans un tiers à la moitié des cas de PID (355) et plus de 70 % des PID n'ont pas d'étiologie infectieuse identifiée. Comme *M. genitalium* est associé aux cervicites, il est raisonnable de penser qu'il peut aussi causer des PID.

La responsabilité de *M. genitalium* dans les PID est supposée de longue date et les premières études sérologiques remontent à 1984. L'équipe de Taylor-Robinson trouvait alors 40 % de séroconversion ou d'augmentation du titre des anticorps anti-*M. genitalium* chez 31 femmes présentant un tableau clinique de PID (331). Plus récemment, dans une étude cas témoin portant sur 45 patientes, à partir cette fois d'écouvillons endocervicaux, *M. genitalium* a été associé aux PID, et de façon indépendante à *C. trachomatis* (434).

M. genitalium est responsable de PID non chlamydiennes, non gonococciques (209). Il était trouvé chez 15 % des patientes de l'étude PEACH (152, 153, 355), (Tableau 5) et chez 13 % des patientes de l'étude SIMMS (151).

Au total, huit études ont étudié l'association entre les PID et *M. genitalium*. Trois de ces études réalisaient un diagnostic sérologique de l'infection à *M. genitalium* (210, 260, 331) tandis que les cinq autres réalisaient des PCR sur des prélèvements cervicaux ou endométriaux (35, 66, 67, 152, 434). Deux des trois études sérologiques ne trouvaient pas d'association entre *M. genitalium* et PID (210, 260). Pour les cinq études utilisant la PCR, *M. genitalium* était détecté plus souvent chez les femmes présentant une PID que chez les femmes asymptomatiques, avec des OR de 4,6 à 6,3 (Figure 3, Tableau 5).

Concernant les atteintes d'organe du tractus génital haut, *M. genitalium* est tout d'abord mis en cause dans la survenue d'endomérites. En effet, dans une étude réalisée au Kenya sur 115 femmes se présentant à un centre à vocation de dépistage des IST pour des douleurs pelviennes aiguës, 58 diagnostics d'endomérites ont été portés et *M. genitalium* a été détecté sur des écouvillons

endocervicaux ou sur des biopsies d'endomètre dans 16 % des cas, contre 2 % des femmes sans endométrite ($p = 0,02$) (66).

D'autres études ont montré une association probable entre *M. genitalium* et salpingites (191). Une étude réalisée au Kenya a porté sur 123 femmes présentant des salpingites aiguës confirmées par coelioscopie, au cours desquelles *M. genitalium* a été isolé au niveau du col et de l'endomètre mais une seule fois au niveau tubaire (67). Les femmes infectées par *M. genitalium* étaient plus souvent séropositives pour le VIH. Les salpingites liées à la présence de *M. genitalium* sont à l'origine d'une symptomatologie souvent discrète semblable à celles liées à *C. trachomatis*, et beaucoup plus modérée que celle des salpingites liées à *N. gonorrhoeae* (432).

En résumé, le rôle potentiel de *M. genitalium* dans les PID porte encore à caution, mais il ne doit pas être sous-estimé (Figure 3, Tableau 5).

4.3 Conséquences obstétricales

La maladie inflammatoire pelvienne peut avoir des séquelles comme l'infertilité tubaire et la grossesse extra-utérine (521). Il existe peu de données dans la littérature sur la responsabilité des infections à *M. genitalium* dans la survenue d'événements indésirables obstétricaux de type grossesses extra-utérines, fausses couches, avortements ou accouchements prématurés (Figure 3, Tableau 5).

Peu de travaux ont été menés sur l'infection à *M. genitalium* chez la femme enceinte. La prévalence de *M. genitalium* chez la femme enceinte varie de 0,7 % à 8,7 % (247, 361), (Tableau 3). Cette prévalence était évaluée à 2,5 % dans une récente étude suédoise (35).

M. genitalium ne semble ni associé aux grossesses extra-utérines d'après une étude sérologique suédoise rétrospective (210), ni aux fausses couches spontanées (431).

Dans une étude prospective sur les accouchements prématurés réalisée aux Etats-Unis en 2001, l'âge gestationnel était le même chez les femmes infectées par *M. genitalium* et chez les femmes non infectées (272). Dans une étude cas-témoin sur 1 014 femmes accouchant en Guinée-Bissau, *M. genitalium* était détecté chez 6,2 % d'entre elles, mais n'apparaissait avoir aucun effet sur l'issue de la grossesse (242). Une autre étude plus récente semble suggérer le contraire. La présence de *M. genitalium* au niveau cervical au moment de l'accouchement était significativement associée à un accouchement prématuré (< 37 semaines d'aménorrhée) avec un OR à 2,5 (IC 95 % : 1,2-5,0, $p = 0,014$) (168), (Figure 3, Tableau 5).

Concernant les PID post-partum, une étude suédoise apporte des données intéressantes. En effet, des PID post-partum avaient été diagnostiqués chez 12,2 % des femmes infectées par *M. genitalium* au moment de l'accouchement comparé à 2,5 % des femmes contrôles non infectées. Cette différence était statistiquement significative même après ajustement sur l'âge et la co-infection par *C. trachomatis*

(35). La prévention de ces complications pourrait se faire si le dépistage de *M. genitalium* était réalisé en routine chez les femmes enceintes.

Sur une étude portant sur 47 femmes présentant une grossesse à haut risque, huit nouveau-nés ont été étudiés pour analyser la transmission des mycoplasmes urogénitaux dont *M. genitalium*. La transmission de *M. genitalium* de la mère à l'enfant a été documentée pour un enfant prématuré avec un syndrome de détresse respiratoire (275). Du fait du faible effectif de cette étude aucune conclusion clinique ne peut être tirée. De façon plus générale et à la différence des autres mycoplasmes urogénitaux, *M. genitalium* ne semble pas avoir de conséquences délétères sur la santé et le devenir des nouveau-nés de mères infectées (511). Mais au regard de la ressemblance du pouvoir pathogène de *M. genitalium* avec celui de *C. trachomatis*, il est probable que *M. genitalium* puisse entraîner des infections chez le nouveau-né (191).

Un rôle possible de *M. genitalium* dans les infertilités tubaires a été suggéré, initialement sur des arguments sérologiques indirects. En effet, dans une étude danoise sur 308 femmes infertiles, 22 % des 132 femmes atteintes d'infertilité tubaire avaient une sérologie positive, contre 7 % des femmes avec une autre cause d'infertilité (64), (Figure 3, Tableau 5). Dans une étude prospective plus récente de la même équipe portant sur 212 couples infertiles, aucun écouvillonnage cervical n'était positif pour *M. genitalium*. Cependant, parmi les 30 femmes présentant une infertilité de cause tubaire, cinq avaient une sérologie *M. genitalium* positive (5/30, soit 17 %), contre seulement sept chez les femmes avec des trompes indemnes (7/164, soit 4 %). L'association entre l'infertilité tubaire et la séropositivité à *M. genitalium* était forte avec un OR à 4,5 (IC 95 % : 1,3-15,2, $p = 0,016$). Ainsi, un antécédent d'infection à *M. genitalium* plus qu'une infection active serait délétère pour les trompes (461).

4.4 Autres localisations

M. genitalium a été associé à certaines formes d'arthrites (5), notamment lors d'un syndrome de Reiter chez un jeune homme de 25 ans et lors d'une poussée inflammatoire chez un homme de 58 ans suivi pour une arthrite juvénile séronégative (470) où la bactérie a été isolée dans du liquide articulaire de genou. Le rôle de *M. genitalium* dans les arthrites réactionnelles a été soulevé. Dans des expériences *in vivo* sur des modèles animaux (chimpanzés) *M. genitalium* a été isolé dans le sang (490). La présence de cette bactérie dans le sang démontre le potentiel d'invasion de *M. genitalium* mais permet aussi de spéculer sur la dissémination hématogène possible dans tout l'organisme. Ce pouvoir de dissémination pourrait expliquer certains cas d'arthrites réactionnelles et la possibilité de détecter de l'ADN de *M. genitalium* dans des liquides articulaires de patients atteints d'arthrite (470). Cependant le peu d'observations disponibles rendent à ce jour l'implication de *M. genitalium* dans les arthrites plus qu'exceptionnelle.

4.5 En résumé

Dans les études de prévalence des infections urogénitales, *M. genitalium* est plus fréquemment détecté que *N. gonorrhoeae* lorsque ces deux bactéries sont recherchées, et parfois même plus souvent détecté que *C. trachomatis*.

M. genitalium est un agent d'IST, responsable d'UNG chez les hommes et très probablement de cervicites chez la femme, ce qui semble admis par la majorité des auteurs. Sa responsabilité dans les PID commence à être reconnue mais nécessite des études complémentaires.

Cet agent pourrait être responsable d'un nombre sous-estimé de cervicites et/ou de PID, le plus souvent imputées à *C. trachomatis* et à *N. gonorrhoeae*, ceci ayant une grande importance pour le choix thérapeutique.

Vu les conséquences possibles et délétères sur le tractus génital haut, peut-être que le temps est venu de tester systématiquement les femmes symptomatiques à la recherche de *M. genitalium* ? Ainsi pourront être réalisées des études longitudinales, chaînon manquant pour pouvoir impliquer définitivement *M. genitalium* dans la physiopathologie de certaines infections gynécologiques, aux conséquences obstétricales parfois péjoratives.

5. Diagnostic bactériologique

Le diagnostic bactériologique est essentiellement direct par amplification d'acides nucléiques, la culture étant extrêmement fastidieuse et non réalisée en routine et les méthodes sérologiques étant peu sensibles et spécifiques et non recommandées dans un but diagnostique (19). La recherche de mycoplasme ne doit pas être pratiquée de façon isolée, mais faire partie d'un bilan diagnostique complet d'une IST (19). La détection de *M. genitalium* est à ce jour limitée par l'absence de test diagnostique moléculaire commercialisé à l'exception d'un.

5.1 Diagnostic direct

5.1.1 Prélèvements

Pour les urétrites, le premier jet d'urine semble être un prélèvement plus intéressant pour détecter *M. genitalium* chez les hommes et les femmes par rapport au prélèvement urétral. Chez la femme, l'auto-écouvillonnage vaginal est également réalisé dans de nombreuses études de prévalence sur les cervicites. Il présente l'intérêt d'être plus facile à réaliser que le prélèvement endocervical, avec une bonne acceptabilité et une bonne sensibilité puisqu'il ramène des cellules issues de la desquamation cervicale. Sa sensibilité supérieure à celle du premier jet d'urine et équivalente à celle du prélèvement endocervical a été démontrée chez *C. trachomatis*, autre pathogène de la sphère urogénitale. Chez la femme, dans certains cas (cervicite sans urétrite), un prélèvement endocervical peut être aussi réalisé (193).

5.1.2 Culture

Pour *M. genitalium* la culture est exceptionnelle, nécessitant une étape de culture cellulaire sur cellules Vero (197). Il faut parfois jusqu'à un an pour pouvoir isoler en culture une souche de *M. genitalium* et cela semble moins difficile sur un écouvillon urétral que sur les urines du fait de leur potentiel cytotoxique (157).

Tableau 6. Méthodes d'amplification d'acides nucléiques de *M. genitalium*.

Méthodes	Cible	Chimie	Sensibilité analytique	Référence
PCR genre <i>Mycoplasma</i> et <i>Ureaplasma</i>				
Point final	Gène de l'ARNr 16S	NA ^a	ND ^b	(502)
	Gène de l'ARNr 16S	NA	10 copies	(540)
	Gène de l'ARNr 16S	NA	10 copies	(541)
Temps réel	Gène de l'ARNr 16S	SYBR green	10 copies	(163)
	<i>tuf</i> ^c	TaqMan	1 copie	(452)
PCR spécifique <i>M. genitalium</i>				
Point final	<i>mgpB</i> ^d	NA	50 copies	(201)
	Gène de l'ARNr 16S	NA	10-50 copies	(195)
Temps réel	Gène de l'ARNr 16S	TaqMan	10 copies	(539)
	<i>mgpB</i>	TaqMan	< 5 copies	(194)
	<i>gap</i> ^e	HRM ^f	< 2 copies	(462)
	<i>mgpB</i> et gène de l'ARNr 16S	TaqMan	0,005 UFC ^g <i>mgpB</i> 5 UFC ARNr 16S	(161)
TMA ^h spécifique <i>M. genitalium</i>	ARNr	NA	40 000 RLU ⁱ	(161)
PCR multiplexe point final				
<i>Ureaplasma</i> spp., <i>M. hominis</i> , <i>M. genitalium</i>	<i>mgpB</i>	NA	10,8 UFC	(450)
<i>C. trachomatis</i> , <i>N. gonorrhoeae</i> , <i>M. genitalium</i> , <i>U. urealyticum</i> , <i>U. parvum</i> , <i>M. hominis</i> , <i>S. pneumoniae</i> , <i>H. influenzae</i> , <i>N. meningitidis</i> , <i>G. vaginalis</i> , <i>T. vaginalis</i> , HSV1 et 2, adenovirus	<i>mgpB</i>	NA	2,1.10 ⁻⁹ ng ADN/μL	(317)
<i>M. genitalium</i> , <i>U. urealyticum</i> , <i>U. parvum</i> , <i>M. hominis</i> , <i>T. vaginalis</i>	Gène de l'ARNr 16S	NA	1000 copies	(316)
<i>C. trachomatis</i> , <i>N. gonorrhoeae</i> , <i>M. genitalium</i> , <i>U. urealyticum</i> , <i>M. hominis</i> , <i>T. vaginalis</i>	Kit STD6 (Seegene)	NA	ND	

^a NA, non applicable, ^b ND, non déterminé, ^c *tuf*, gène codant le facteur d'élongation, ^d *mgpB*, gène codant MgPa, ^e *gap*, glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase, ^f HRM, « high-resolution melting », ^g UFC, unité formant colonie, ^h TMA, « transmission-mediated amplification », ⁱ RLU, « relative light units ».

5.1.3 Amplification d'acides nucléiques

Seules les méthodes d'amplification d'acides nucléiques sont donc utilisables pour *M. genitalium*, faute de technique clairement standardisée, elles ont surtout à l'heure (h) actuelle des applications épidémiologiques. Là encore, des techniques de PCR en point final (195, 201) et maintenant de PCR quantitative en temps réel (194, 429, 462, 539), avec différentes cibles, sont rapportées dans la littérature (Tableau 6).

La PCR en temps réel est de plus en plus utilisée pour la détection de génomes car elle donne des résultats rapides, spécifiques et si besoin quantitatifs. L'amplification et la détection sont réalisées simultanément grâce à la présence dans le milieu réactionnel d'un marqueur fluorescent, qui peut être un agent intercalant comme le SYBR Green ou des sondes marquées par un fluorophore. Les sondes TaqMan (sondes d'hydrolyse) et les « Molecular Beacons » (balises moléculaires) sont des oligonucléotides portant à leur extrémité 5' une molécule appelée « quencheur » qui bloque la fluorescence émise par la molécule appelée donneur en 3' lorsque ces sondes sont libres en solution. Lors de la phase d'élongation de la PCR, le « quencheur » est éloigné du fluorophore donneur et la fluorescence émise est alors détectée.

Concernant les PCR de genre, rapportons trois publications d'une équipe japonaise. La première consistait à réaliser une PCR en point final à partir d'ADN extrait de prélèvements urogénitaux pour amplifier un fragment de 750 pb du gène de l'ARNr 16S, grâce à des amorces précédemment décrites, spécifiques du genre *Mycoplasma* et permettant aussi l'amplification de *Ureaplasma* spp. (502). Puis était réalisée une semi nested-PCR amplifiant un fragment de 520 pb. Dans un troisième temps, un fragment interne de 250 pb du produit de PCR précédent était séquencé et soumis à une analyse phylogénétique pour déterminer l'espèce de mycoplasme (540). Ultérieurement la même méthode a été adaptée avec une PCR en temps réel (SYBR green) lors du premier temps, suivie de l'étape de séquençage d'un fragment de 250 pb (163). Une variante de cette méthode a également été décrite, le premier temps était sensiblement le même et consistait à réaliser une PCR en point final, suivie d'une étape d'hybridation ADN / ADN par sonde oligonucléotidique sur plaque détectant et différenciant quatre espèces génitales de mycoplasme dont *M. genitalium* (541). Il existe aussi d'autres techniques de détection simultanée de plusieurs espèces de mycoplasmes, dont *M. genitalium*, notamment mises au point pour la recherche de contaminations de cultures cellulaires. Une technique de PCR en temps réel ayant pour cible le gène *tuf*, codant le facteur d'élongation Tu, a été récemment publiée (452).

Concernant les PCR spécifiques, citons l'exemple de la PCR en temps réel réalisée pour le diagnostic dans notre laboratoire (194). Cette PCR détecte un fragment du gène *mgpB* avec une sonde TaqMan et possède un contrôle interne pour détecter les inhibiteurs de PCR. La sensibilité analytique est de moins de cinq copies de génomes, sans réaction croisée avec les autres mycoplasmes. Citons aussi la « multitarget real-time » PCR (MTRT PCR) avec deux cibles de *M. genitalium* différentes, les gènes *mgpB* et de l'ARNr 16S. Elle a été étudiée et comparée à une méthode GenProbe, appelée « transmission-mediated amplification » (TMA), ciblant l'ARNr de *M. genitalium* présent dans les prélèvements

urogénitaux. Ces deux techniques avaient une excellente spécificité (99,5 % et 98,1 %, respectivement) mais la sensibilité de l'essai GenProbe était supérieure à celle de la PCR maison (98,1 % vs. 91,8 %) (161).

Des essais de PCR multiplexes détectant simultanément différents microorganismes dont *M. genitalium*, dans les urines (317), sur un écouvillon cervical (316) ou sur différents prélèvements génito-urinaires (450), ont été publiés.

Enfin, le développement de trousses commercialisées devrait permettre d'utiliser beaucoup plus largement la PCR dans un but diagnostique. C'est le cas du Kit STD6 commercialisé par Seegene détectant notamment les trois agents responsables d'UNG et de cervicites, *M. genitalium*, *C. trachomatis* et *Ureaplasma* spp. D'autres kits sont en cours de commercialisation.

5.2 Diagnostic sérologique

Il n'y a pas de diagnostic sérologique commercialisé et validé pour cette espèce de mycoplasme urogénital comme pour les deux autres, *M. hominis* et *Ureaplasma* spp.

La sérologie pose le problème de réactions croisées avec *M. pneumoniae*, espèce phylogénétiquement proche, comme cela a été soulevé dans les années 1980 au moment de la découverte de *M. genitalium* (259, 261).

Chez les hommes, peu ou pas de corrélations sont trouvées entre une séroconversion et l'isolement de *M. genitalium* dans des prélèvements urétraux (469).

Chez les femmes, peu d'études ont étudié la place de la sérologie dans les infections, à part deux études sur les salpingites (260, 331) et un travail suédois sur l'infertilité (64).

6. Sensibilité aux antibiotiques et traitement

6.1 Méthodes d'étude

Les exigences nutritionnelles et les conditions de culture des mycoplasmes sont très différentes des conditions standards recommandées pour les bactéries classiques (21). Les méthodes de dilution en milieu liquide et gélosé ont été adaptées aux mycoplasmes. Plusieurs caractéristiques sont communes à ces méthodes. Le milieu Hayflick ou le milieu SP4 sont recommandés pour les espèces du genre *Mycoplasma* (510). Un pH du milieu de 7,0 à 7,5 est recommandé pour *Mycoplasma* spp. Les conditions d'incubation sont une température de 35° à 37°C, sous 5 % de CO₂ pour les milieux gélosés, pendant une durée de 5 à 7 j pour *M. genitalium* et *M. pneumoniae*. Un inoculum de 10⁴ à 10⁵ unités de changement de couleur (UCC) ou unités formant colonies (UFC) par ml est recommandé (510).

Le faible nombre de souches de *M. genitalium* disponibles rend difficile les études de sensibilité à grande échelle à moins d'utiliser les méthodes de Biologie moléculaire. De plus, presque toutes les études de sensibilité aux antibiotiques ont

Tableau 7. CMI ($\mu\text{g/mL}$) des antibiotiques vis-à-vis de *M. genitalium* et *M. pneumoniae*^a (adapté d'après la référence 21).

Antibiotique	<i>M. genitalium</i>	<i>M. pneumoniae</i>
Tétracyclines, Glycylcyclines		
Tétracycline	0,06 – 0,5	0,63 – 0,25
Doxycycline	$\leq 0,01$ – 0,3	0,02 – 0,5
Minocycline	$\leq 0,01$ – 0,2	0,06 – 0,25
Tigécycline	ND ^b	0,06 – 0,25
Groupe MLSK		
Erythromycine	$\leq 0,015$	$\leq 0,004$ – 0,06
Roxithromycine	$\leq 0,01$	$\leq 0,01$ – 0,03
Clarithromycine	$\leq 0,01$ – 0,06	$\leq 0,004$ – 0,125
Azithromycine	$\leq 0,015$	$\leq 0,004$ – 0,01
Josamycine	0,01 – 0,02	$\leq 0,01$ – 0,03
Spiramycine	0,12 – 1	$\leq 0,01$ – 0,25
Clindamycine	0,2 – 1	$\leq 0,008$ – 2
Lincomycine	1 – 8	4 – 8
Pristinamycine	ND	0,02 – 0,05
Quinupristine/ Dalfopristine	0,05	0,008 – 0,25
Télithromycine	$\leq 0,015$	$\leq 0,001$ – 0,06
Céthromycine	ND	$\leq 0,001$ – 0,016
Fluoroquinolones		
Péfloxacin	ND	2
Norfloxacin	ND	ND
Ciprofloxacine	2	0,5 – 2
Ofloxacine	1 – 2	0,05 – 2
Lévofloxacine	0,5 – 1	0,5 – 1
Gatifloxacine	0,12	0,06 – 1
Moxifloxacine	0,03	0,06 – 0,3
Gémifloxacine	0,05	$\leq 0,008$ – 0,12
Garénofloxacine	0,06 – 0,12	0,008 – 0,12
Autres agents		
Chloramphénicol	0,5 – 25	2 – 10
Gentamicine	ND	4
Linézolide	ND	64 – 256
LBM-415 ^c	ND	$\leq 0,000063$ – 0,008

^a Souches n'ayant pas acquis de résistance.

^b ND, non déterminé.

^c Inhibiteur de la peptide déformylase.

été réalisées sur les souches de référence ATCC. Or, ces souches sont vraisemblablement identiques. Ainsi, ces études sous-estiment peut-être la variabilité de sensibilité pouvant exister entre des isolats cliniques (169).

Des techniques de Biologie moléculaire comme la PCR quantitative en temps réel ont été adaptées pour l'étude de la sensibilité aux antibiotiques de *M. genitalium*, espèce extrêmement fastidieuse dont l'isolement par culture à partir des prélèvements est exceptionnel (155, 156). Dans ces études, la susceptibilité aux antibiotiques de souches de *M. genitalium* poussant sur des cellules Vero a été étudiée en présence de dilutions d'antibiotiques. La croissance de *M. genitalium* était monitorée par une PCR en temps réel détectant un fragment du gène *mgpB*. L'inhibition de croissance en présence d'antibiotiques était exprimée en pourcentage de la charge ADN de la souche contrôle poussant dans un milieu sans antibiotique. De plus, la sensibilité de certaines souches a été étudiée comparativement par la méthode conventionnelle de dilution en milieu liquide. Au total, les résultats étaient corrélés entre les méthodes phénotypiques et génotypiques.

6.2 Résistance naturelle

6.2.1 Résistances liées à la classe

Du fait de leur absence de paroi, tous les organismes de la classe des *Mollicutes* résistent aux inhibiteurs de la synthèse de la paroi comme les β -lactamines, les glycopeptides et la fosfomycine. Ils résistent en outre aux polymyxines, sulfamides, triméthoprine, acide nalidixique et rifampicine (25, 27).

6.2.2 Résistance liée à l'espèce

Cette résistance intrinsèque concerne essentiellement le groupe macrolides-lincosamides-streptogramines et kétolides (MLSK). *M. genitalium*, comme *M. pneumoniae*, est naturellement sensible aux antibiotiques du groupe MLSK, excepté à la lincomycine qui présente une activité modeste sur ces deux espèces (Tableau 7).

6.2.3 Antibiotiques actifs et phénotype sensible

Les antibiotiques potentiellement actifs sur les mycoplasmes et utilisés en thérapeutique sont les tétracyclines, les antibiotiques du groupe MLSK et les fluoroquinolones (25, 27). Ces antibiotiques se concentrent fortement à l'intérieur des cellules atteignant ainsi les mycoplasmes intracellulaires. Seuls les fluoroquinolones et les kétolides ont un effet bactéricide potentiel. Ces trois classes partagent l'avantage d'être actives sur des bactéries potentiellement associées aux mycoplasmes dans les infections génitales.

Les tétracyclines sont le traitement de première intention des infections urogénitales à mycoplasmes comme les urétrites et les salpingites (27), mais leur intérêt dans le traitement des infections à *M. genitalium* sera discuté plus loin.

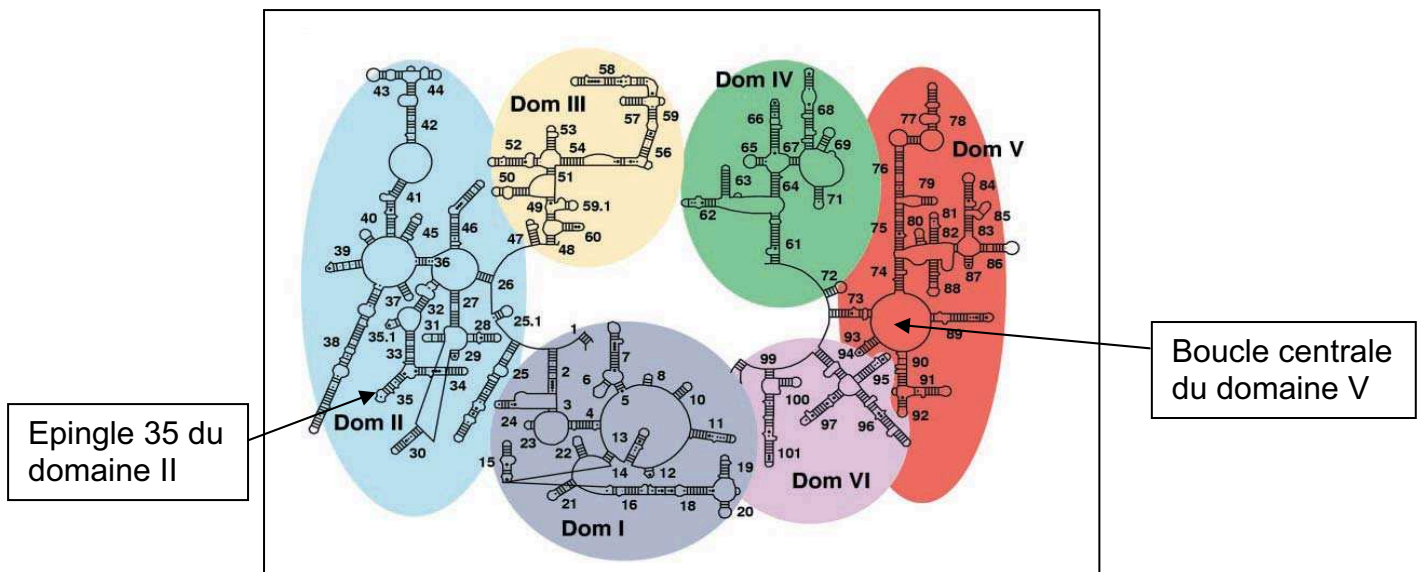


Figure 4. Structure secondaire de l'ARNr 23S (14).

La boucle centrale du domaine V et l'épingle 35 du domaine II, impliquées dans la liaison des macrolides, sont désignées par des flèches.

Pour les antibiotiques de la classe des MLSK, une étude a montré une activité bactéricide *in vitro* de l'érythromycine vis-à-vis de *M. genitalium* (26). L'azithromycine présente les CMI les plus basses (155).

Les fluoroquinolones les plus récentes sont les plus actives et particulièrement la moxifloxacin (Tableau 7), (155, 534). Elles représentent une alternative intéressante dans le traitement des infections génitales.

Le Tableau 7 rassemble les CMI de différents antibiotiques sur les deux mycoplasmes pathogènes humains, *M. genitalium* et *M. pneumoniae* (21). Les résultats obtenus avec un petit nombre de souches disponibles ont montré que *M. genitalium* a un profil de sensibilité proche de celui de *M. pneumoniae*.

6.3 Résistance acquise

Parmi les mécanismes de résistance acquise, seules les altérations de la cible ont été décrites *in vivo* chez *M. genitalium*. Le support génétique de la résistance correspond à des mutations qui concernent seulement la classe des MLSK et des fluoroquinolones.

6.3.1 MLSK

Pour les antibiotiques de la classe des MLSK, les mutations de la cible ribosomique, au niveau de la boucle centrale du domaine V de l'ARNr 23S, représentent le mécanisme de résistance aux macrolides chez *M. genitalium* (Figure 4). Les mutations en position 2058 et 2059 (système de numérotation de *Escherichia coli*), connues comme des « hot spots » de résistance aux macrolides chez les autres bactéries, ont été récemment décrites *in vivo*. Douze isolats cliniques de *M. genitalium* résistants aux macrolides ont été obtenus chez des patients australiens et scandinaves présentant une uréthrite traitée par azithromycine (44, 196). Sept souches ont été analysées et chacune présentait une mutation A2058G, A2058C ou A2059G, conférant une résistance aux macrolides (CMI érythromycine et azithromycine ≥ 8 µg/ml). Les CMI étaient les mêmes quelle que soit la mutation. Dans la majorité des cas, ces mutants résistants aux macrolides ont été sélectionnés au cours d'un traitement par azithromycine (196).

Cette fréquence semble en augmentation chez *M. genitalium* entraînant des échecs thérapeutiques sous azithromycine (44, 196) et justifie une surveillance épidémiologique utilisant des outils moléculaires détectant les mutations de l'ARNr 23S directement à partir des prélèvements, outils non décrits à ce jour pour cette espèce.

6.3.2 Fluoroquinolones

Les mutations des gènes cibles *gyrA* et *gyrB* (ADN gyrase) et *parC* et *parE* (topoisomérase IV) sont le mécanisme de résistance essentiel développé par les mycoplasmes pour résister aux fluoroquinolones (27).

Pour les fluoroquinolones, des échecs thérapeutiques ont été observés chez des patients atteints d'UNG *M. genitalium*-positifs après traitement par la lévofloxacin. Des mutations dans le gène *parC* de *M. genitalium* ont pu être

Tableau 8. Revue des études de cohorte évaluant le traitement des infections à *M. genitalium*.

Lieu de l'étude	Période de l'étude	Effectif	Type d'infection	Hommes (%)	Femmes (%)	Traitement 1 ^{ère} ligne	Echecs (%) chez les patients Mg-positifs	Référence
Etats-Unis	1996-1999	56	PID ^a	NA ^b	56 (100 %)	Doxycycline 14 j + céfoxitine	23/56 (41 %)	(152)
Italie	1998-1999	178	UNG ^c	178 (100 %)	NA	Doxycycline 7 j Azithromycine DU ^d	2/35 (6 %) 3/17 (18 %)	(125)
Angleterre	NP ^e	114	UNG	114 (100 %)	NA	Doxycycline 13 j Erythromycine 14 j	7/7 (100 %)	(175)
Japon	1999-2000	72	UNG	72 (100 %)	NA	Lévofloxacin 14 j	8/12 (67 %)	(284)
Japon	1999-2004	71	UNG	71 (100 %)	NA	Lévofloxacin 7 j	11/16 (69 %)	(534)
						Lévofloxacin 14 j	9/18 (50 %)	
						Tosufloxacin 14 j	2/7 (29 %)	
						Gatifloxacin 7 j	2/24 (8 %)	
						Gatifloxacin 14 j	0/6 (0 %)	
Suède	2000	57	Urétrites et cervicites	31 (54 %)	26 (46 %)	Doxycycline 8 j Azithromycine 5 j	20/30 (67 %) 0/36 (0 %)	(105)
France	2001	83	UNG	83 (100 %)	NA	Doxycycline 7 j	1/1 (100 %)	(96)
						Minocycline 7 j Spectinomycine DU + Minocycline 7 j	4/7 (57 %) 0/1 (0 %)	
Suède	2002-2004	32	UNG	32 (100 %)	NA	Doxycycline DV ^f Erythromycine 10 j Azithromycine DU ou 5 j	7/8 (87 %) 9/11 (82 %) 0/6 (0 %)	(523)
Norvège, Suède	2002-2004	159	Urétrites et cervicites	115 (72 %)	44 (28 %)	Doxycycline 9 j Azithromycine DU	80/103 (78 %) 8/56 (14 %)	(36)
Nouvelle-Orléans, Etats-Unis	2002-2004	398	UNG	398 (100 %)	NA	Doxycycline 7 j Azithromycine DU	17/31 (55 %) 3/23 (13 %)	(321) ^g
International	2003-2004	112	PID	NA	112 (100 %)	Ofloxacine 14 j Moxifloxacin 14 j	0/3 (0 %) 0/1 (0 %)	(411)
Etats-Unis	2003-2004	170	UNG	170 (100 %)	NA	Rifalazil DU Azithromycine DU	17/17 (100 %) 1/7 (14 %)	(449)
Japon	2004	42	UNG	42 (100 %)	NA	Azithromycine DU	0/3 (0 %)	(463)

-Suite-

Tableau 8. Suite.

Lieu de l'étude	Période de l'étude	Effectif	Type d'infection	Hommes (%)	Femmes (%)	Traitement 1 ^{ère} ligne	Echecs (%) chez les patients Mg-positifs	Référence
Melbourne, Australie	2004-2005	34	UNG	34 (100 %)	NA	Azithromycine DU	9/32 (28 %)	(44)
Oslo, Norvège	2005-2006	292	Urétrites et cervicites	ND ^h	ND	Ofloxacin 10 j Moxifloxacin 7 j Azithromycine DU Azithromycine 2 doses Azithromycine 5 j	5/9 (56 %) 0/3 (0 %) 39/144 (21 %) 10/38 (26 %) 12/98 (22 %)	(202) ⁱ
Melbourne, Australie	2005-2007	131	Urétrites, cervicites et PID	102/120 ND	18/120 ND	Azithromycine DU	19/120 (16 %)	(42)

^a PID, « pelvic inflammatory disease », ^b NA, non applicable, ^c UNG, urérite non gonococcique, ^d DU, 1 g dose unique, ^e NP, non précisé, ^f DV, durée variable,

^g Essai randomisé, ^h ND, non déterminé, ⁱ Etude rétrospective.

détectées par des méthodes moléculaires (80). Plus récemment, une étude sur la résistance de *M. genitalium* aux fluoroquinolones par méthodes moléculaires a été réalisée sur les urines de 28 japonais atteints d'UNG *M. genitalium*-positifs. Ce travail mettait en évidence des mutations *gyrA* chez un patient, *gyrA* et *parC* chez un autre patient et *parC* chez un troisième patient, au niveau d'acides aminés connus pour la résistance aux fluoroquinolones chez les mycoplasmes, soit une résistance aux fluoroquinolones évaluée à 10,7% (3/28) (428).

6.4 Traitement

Aucun traitement des infections à *M. genitalium* n'est à ce jour standardisé. Dans ce paragraphe seront passées en revue quelques études évaluant le traitement des infections à *M. genitalium* (Tableau 8).

Les tétracyclines sont le traitement de première intention des infections urogénitales à mycoplasmes comme les urétrites et les salpingites (27). La doxycycline reste avec l'azithromycine le traitement de référence des UNG masculines aiguës d'après les recommandations européennes de 2009 (427) et françaises de 2008 (4).

Des échecs thérapeutiques avec les tétracyclines sont rapportés pour un nombre non négligeable de cas d'UNG à *M. genitalium*, sans que leur cause ait été réellement élucidée (191). Une étude suédoise a comparé l'efficacité de la doxycycline et de l'azithromycine dans le traitement d'infections génitales basses à *M. genitalium* (105). Alors que tous les patients traités par azithromycine pendant 5 j étaient négatifs pour *M. genitalium* à la visite de contrôle, 67 % des patients traités par doxycycline hébergeaient encore le mycoplasme à l'issue du traitement (Tableau 8). Ces résultats suggèrent que les tétracyclines ne sont pas toujours efficaces *in vivo* dans le traitement des infections à *M. genitalium* et soulignent la nécessité d'essais thérapeutiques randomisés (468).

Des échecs ont également été décrits avec des traitements par lévofloxacine. Dans une première étude publiée en 2001 par une équipe japonaise, le traitement proposé pour les patients présentant une UNG était de la lévofloxacine pendant 14 j. Sur 72 patients inclus, 45 ont été considérés guéris. Parmi ces 45, six ont présenté une récurrence d'UNG dont cinq étaient toujours *M. genitalium*-positifs (284). Chez deux de ces patients des mutations dans le gène *parC* étaient mises en évidence (80). Dans un troisième article, cette équipe a analysé les cinq patients présentant une UNG récidivante liée à *M. genitalium*. Le travail consistait à quantifier longitudinalement la charge de *M. genitalium* sur le premier jet d'urine par PCR en temps réel (539). Pour quatre des cinq patients la charge bactérienne, en dessous du seuil de détection de la technique pendant le traitement, avait retrouvé son niveau initial quelques jours après l'arrêt du traitement, lors de la récurrence des symptômes. Les échecs de traitement d'UNG à *M. genitalium* semblent donc liés à la persistance de *M. genitalium* dans l'urètre à des taux très bas (82).

Parmi les fluoroquinolones, la moxifloxacine semble avoir un meilleur taux d'éradication de *M. genitalium*, mais elle est souvent utilisée en deuxième, voire troisième intention. Dans une étude rétrospective norvégienne, aucun cas d'échec à la moxifloxacine n'était noté (202). Il était de même dans une étude prospective

australienne où la moxifloxacine était utilisée en deuxième ligne (42). Ainsi, la moxifloxacine est le seul antibiotique qui peut à ce jour éradiquer *M. genitalium* sans échec.

Le premier essai thérapeutique comparatif des infections à *M. genitalium* est une étude scandinave comprenant deux bras, un bras doxycycline 9 j et un bras azithromycine en dose unique (36). Cent cinquante neuf patients présentant une urétrite ou une cervicite ont été inclus. Le taux d'éradication de *M. genitalium* dans le bras doxycycline était de 22 % (20 patients sur 103) contre 86 % dans le bras azithromycine (48/56) (Tableau 8).

Le premier essai thérapeutique randomisé est celui de Mena *et al.* (Tableau 8), (321). Cet essai nord-américain a inclus 398 hommes présentant une UNG. Il comportait deux bras de traitement, un bras doxycycline 7 j et un bras azithromycine en dose unique. Cinquante quatre patients avec une urétrite liée à *M. genitalium* ont pu être analysés. Le taux d'éradication était bien supérieur dans le bras azithromycine comparé au bras doxycycline, 87 % et 45 %, respectivement. Ainsi, pour la première fois la supériorité d'un traitement en une seule prise par rapport à un traitement multiprise était démontrée pour le traitement des urétrites masculines à *M. genitalium*.

Néanmoins, des échecs sont aussi observés avec des traitements par l'azithromycine en dose unique, dans 13 à 28 % des cas selon les études (Tableau 8), (36, 44, 202, 321, 449) (42, 196).

Si l'azithromycine a démontré sa supériorité par rapport à la doxycycline dans le traitement des UNG, reste en suspens la durée du traitement. L'azithromycine en dose unique pour le traitement des infections génitales basses à *M. genitalium* dans deux études récentes, une australienne et une norvégienne, montre un taux d'éradication de 84 % et 79 %, respectivement (42, 202). L'étude de Mena trouve un taux équivalent de 87 % (321), alors qu'il est admis que pour un patient avec une infection à *C. trachomatis* ou à *N. gonorrhoeae*, le traitement doit éradiquer au moins 95 % des portages (116). Le traitement par azithromycine dose unique des UNG n'est donc pas optimal pour 15 à 25 % des UNG liées à *M. genitalium*. L'azithromycine sur 5 j (500 mg à J1 et 250 mg de J2 à J4) se révèle dans certaines études plus efficace pour éradiquer *M. genitalium*, avec par exemple un taux d'éradication de 100 % dans l'étude de Wikstrom (523). Seulement, lorsque ce protocole est utilisé en deuxième intention, après un traitement dose unique, le taux d'éradication chute à 34 % (202), soulevant le problème des résistances acquises aux macrolides chez les patients pré-traités (192, 196). Chez les patients présentant des échecs aux tétracyclines ou aux macrolides, la moxifloxacine, sur 7 à 10 j, reste toujours efficace (202). Les prochains essais thérapeutiques devraient donc comprendre un bras avec de l'azithromycine sur 5 j pour analyser sa supériorité par rapport à l'azithromycine en dose unique. Malheureusement, des essais thérapeutiques randomisés américains de grande ampleur sur les UNG sont en cours sans avoir prévu un bras azithromycine 5 j (MEGA study, « Mycoplasma Genitalium Antibiotics Susceptibility and Treatment », NIAID, USA, ClinicalTrials.gov, NCT00358462, et NGU study, « Non Gonococcal Urethritis », NIAID, USA, ClinicalTrials.gov, NCT00322465).

Pour ce qui est des traitements des infections féminines, il y a peu de données dans la littérature. La doxycycline est aussi à l'origine d'un grand nombre d'échecs. Il n'y a probablement pas encore assez d'arguments pour changer les traitements probabilistes antibiotiques recommandés pour traiter les cervicites et les PID (290). Cependant la présence de *M. genitalium* doit être recherchée ou prise en considération dans la prise en charge thérapeutique de PID récurrentes ou persistantes. Des essais thérapeutiques sont donc à développer dans la prise en charge thérapeutique (molécule, durée) des PID à *M. genitalium*.

En résumé, en cas d'infection génitale basse (masculine ou féminine) le traitement de première intention reste à ce jour l'azithromycine 1 g en dose unique, avec un contrôle de la guérison clinique et de l'éradication bactériologique par PCR au moins trois semaines après. En cas d'échec et si la persistance de *M. genitalium* est confirmée, un traitement par moxifloxacin, à 400 mg par j pour 7 j, doit être proposé. Pour les infections génitales hautes à *M. genitalium*, il faut préférer en première intention l'azithromycine sur 5 j ou la moxifloxacin et l'éradication bactérienne post-traitement doit toujours être vérifiée pour éviter les complications à long terme.

C. *Mycoplasma pneumoniae*

1. Introduction

M. pneumoniae a été isolé sous le nom d'agent d'Eaton pour la première fois en 1944 par culture d'une expectoration d'un patient présentant une pneumopathie atypique (97). Ce n'est qu'en 1963 qu'est proposée la désignation taxonomique de *M. pneumoniae* (57) après avoir réussi à le cultiver en milieu acellulaire (58).

Depuis ces premières découvertes d'énormes progrès ont été réalisés en Microbiologie et grâce à l'avènement de la Biologie moléculaire le génome de la souche de référence M129 de *M. pneumoniae* a été intégralement séquencé (167). Cette bactérie possède un petit génome circulaire et double brin de 816 kbp, soit 689 gènes. Elle mesure 1 à 2 µm de long et 0,1 à 0,2 µm de large.

2. Epidémiologie

M. pneumoniae colonise les voies respiratoires hautes et basses et possède un pouvoir pathogène certain. Il n'appartient pas à la flore commensale (358). Sa transmission aérienne nécessite un contact étroit. Il serait responsable de 15 % à 20 % des pneumopathies communautaires, chiffre pouvant s'élever à 40 % chez l'enfant (23, 267, 512). Il viendrait en deuxième position derrière *Streptococcus pneumoniae*. En effet, les infections à *M. pneumoniae* sont des infections fréquentes chez l'enfant et l'adulte jeune. Elles sont exceptionnelles avant l'âge de 1 an et elles sont fréquentes entre 5 et 15 ans. Les infections à *M. pneumoniae* surviennent sur un mode endémique, avec des poussées épidémiques décrites tous les 4 à 7 ans (23). *M. pneumoniae* est responsable de plus de 100 000 hospitalisations d'adultes chaque année aux Etats-Unis (512).

Des épidémies sont régulièrement décrites dans les lieux fermés comme les écoles, les casernes et même à l'hôpital (225, 513). Une des dernières épidémies

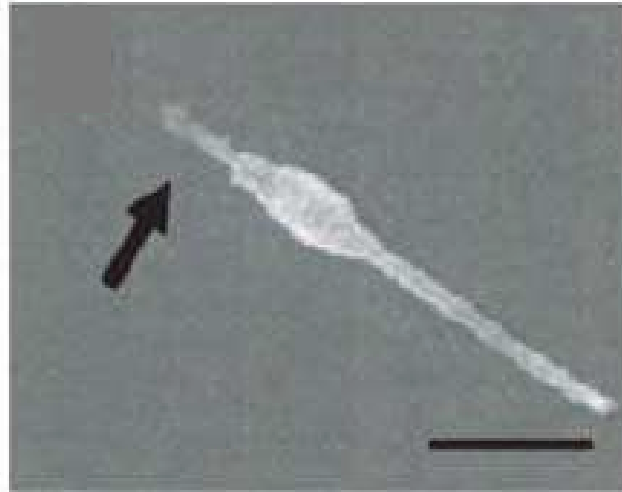


Figure 5. Microscopie électronique à balayage d'une cellule de *M. pneumoniae* cultivée sur verre (236).

La flèche indique l'organelle d'attachement ou le « tip ». Echelle, 0,5 μm.

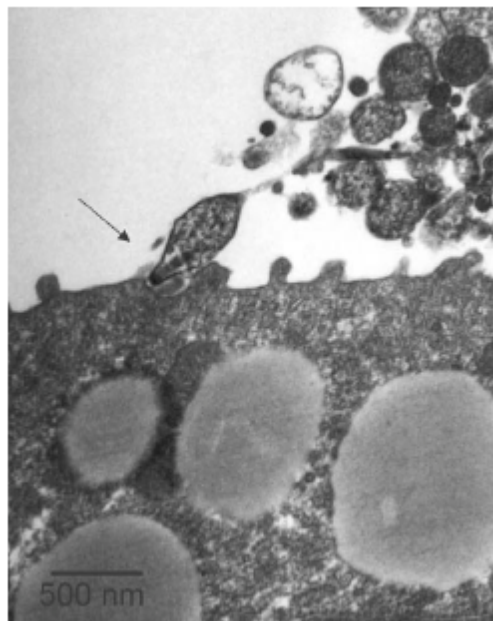


Figure 6. Microscopie électronique à transmission d'un anneau de trachée de hamster infecté par *M. pneumoniae* (512).

La flèche objective l'étroite association de l'organelle d'attachement à l'épithélium.

rapportée dans une collectivité a eu lieu sur une embarcation de l'« US Navy ». Cent soixante dix neuf cas d'infections respiratoires aiguës ont été diagnostiquées, dont 50 cas de pneumopathies confirmées radiologiquement, sur une période de quatre mois (439). Si des épidémies d'infections respiratoires sont décrites dans les écoles, il ne faut pas négliger les cas de transmission aux contacts familiaux des élèves qui peuvent pérenniser et amplifier l'épidémie (358, 513).

Compte tenu du petit nombre de diagnostics établis en raison de la culture fastidieuse de *M. pneumoniae* et du caractère généralement bénin de l'infection, peu d'études épidémiologiques récentes sont disponibles. En France, entre 1997 et 2000, *M. pneumoniae* était en cause dans 7,3 % des pneumopathies chez les adultes hospitalisés (124). Une étude menée en Italie entre mai 1998 et avril 1999 a montré qu'une infection aiguë par *M. pneumoniae* a été diagnostiquée, par sérologie ou PCR, chez 27 % des enfants hospitalisés pour une pneumopathie (393). Une étude plus récente menée chez des adultes en Suède plaçait *M. pneumoniae* comme deuxième agent bactérien de pneumopathie communautaire, après *S. pneumoniae*. Il était isolé chez 8 % des patients (206).

3. Physiopathologie

3.1 Adhésion et organelle d'attachement

L'adhésion est une étape déterminante de la colonisation de l'appareil respiratoire par *M. pneumoniae* permettant la fixation aux cellules de l'hôte.

M. pneumoniae, comme *M. genitalium* et *M. penetrans*, a un aspect particulier visible en microscopie électronique. Il présente une extrémité effilée spécialisée, le « tip » par laquelle il adhère aux cellules épithéliales (Figure 5). *M. pneumoniae* arbore une structure architecturale complexe avec un cytosquelette dynamique et spécialisé, auquel est relié le « tip ». Le cytosquelette chez *M. pneumoniae* est une structure fondamentale puisqu'il jouerait un rôle dans la modulation de la morphologie cellulaire, dans la division cellulaire, dans la motilité et dans la localisation correcte des adhésines, protéines membranaires qui permettent la cytoadhérence (Figure 6), (13). La principale adhésine est l'adhésine P1, au poids moléculaire de 165 kDa, concentrée à l'extrémité du « tip » (Figure 7), (235, 236). L'adhésine P1 est l'équivalent de la protéine MgpB de *M. genitalium* avec qui elle partage une homologie antigénique (73, 340).

Hormis l'adhésion, l'organelle d'attachement est aussi impliqué dans la motilité de la bactérie en jouant un rôle de moteur (237). *M. pneumoniae* est capable de se mouvoir par glissement ou « gliding ». Cette mobilité apparaît importante dans le cadre de l'infection initiale et de son expansion (208). De plus, la mobilité serait indispensable à la division cellulaire qui s'effectue par fission binaire (237).

3.2 Cytotoxicité et toxine CARDS

Après qu'il ait adhéré, *M. pneumoniae* produit du peroxyde d'hydrogène et des radicaux superoxydes qui sont à l'origine d'un stress oxydatif au niveau de l'épithélium respiratoire (512).

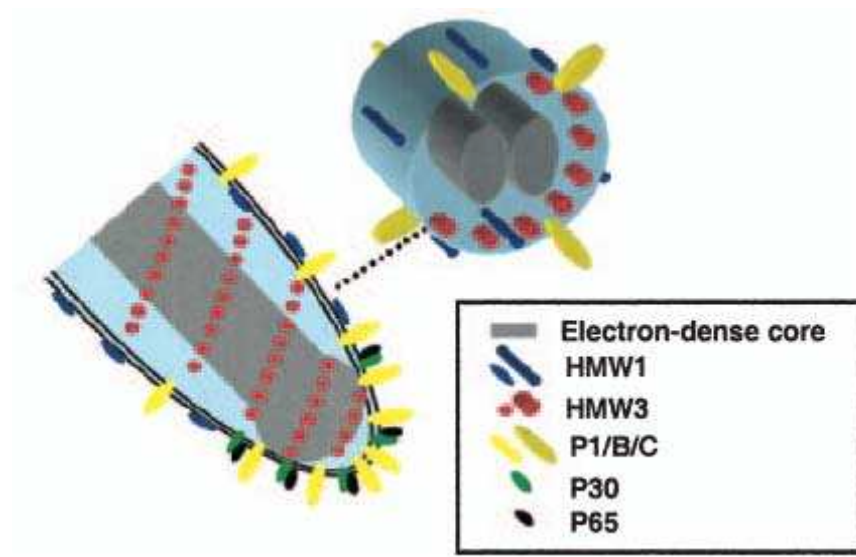


Figure 7. Illustration schématique de la localisation des protéines dans l'organelle d'attachement de *M. pneumoniae* en coupe longitudinale et transversale (236).

M. pneumoniae n'était pas connu pour synthétiser des exotoxines à la différence d'autres pathogènes humains, et le mécanisme par lequel *M. pneumoniae* produisait les atteintes respiratoires est demeuré méconnu pendant de nombreuses années jusqu'à de récents travaux. Kannan *et al.* (214) ont décrit en 2005 chez *M. pneumoniae* la production d'une exotoxine à l'activité ADP-ribosyltransférase. Elle a été nommée toxine CARDS (« Community Acquired Respiratory Distress Syndrome ») en rapport avec le syndrome clinique parfois associé à *M. pneumoniae*. Le mucus respiratoire est riche en composants de la matrice extracellulaire, dont surfactant et fibronectine, offrant d'autres cibles pour l'adhésion de *M. pneumoniae*. Les interactions entre *M. pneumoniae* et une protéine du surfactant humain ont été mises en évidence *in vitro* et liées à une protéine de 68 kDa de *M. pneumoniae*, la toxine CARDS (214). Cette protéine contient à son extrémité N-terminale des acides aminés associés à l'activité ADP-ribosyltransférase, similaire à celle de la sous-unité S1 de la toxine pertussique de *Bordetella pertussis*. Celle-ci induit *in vitro* la vacuolisation cellulaire, l'arrêt de l'activité ciliaire et la mort des cellules hôtes de mammifères. De plus, la toxine CARDS est synthétisée *in vivo* et possède des épitopes hautement immunogènes, ce qui a été démontré par des études sérologiques (212).

Son activité cytotoxique a été confirmée *in vivo* chez la souris et le babouin grâce à une toxine recombinante (rCARDS). Chez la souris, rCARDS a causé une hyperréactivité de l'appareil respiratoire 2 j après le début de l'exposition. Les changements cliniques et de l'expression des cytokines proinflammatoires, secondaires à l'exposition à cette toxine, étaient superposables dans le temps à ceux décrits lors des infections à *M. pneumoniae*. Ceci confirmait l'implication de la toxine CARDS dans la genèse de la réponse inflammatoire de l'hôte et dans les dysfonctionnements respiratoires (162).

Plus récemment, la même équipe a montré que l'expression de la toxine CARDS était effective lors de cultures cellulaires de *M. pneumoniae* sur cellules épithéliales bronchiques par rapport aux cultures acellulaires dans le SP4. L'expression de la toxine dépend donc de l'environnement qui influence la transcription et la traduction de ce facteur de virulence (213). Enfin, le gène de la toxine CARDS a été détecté chez 100 % des souches cliniques de *M. pneumoniae* (451).

3.3 Réponse immunitaire de l'hôte

3.3.1 Immunité cellulaire

L'infection entraîne une détérioration structurale et fonctionnelle des cils de l'épithélium respiratoire. Les cellules se vacuolisent par la suite, jusqu'à leur exfoliation. Une fois dans le tractus respiratoire bas, *M. pneumoniae* est opsonisé par le complément ou des anticorps. Les macrophages activés migrent au site d'infection par chimiotactisme et phagocytent les mycoplasmes.

3.3.2 Immunité humorale et échappement

A la suite d'une infection à *M. pneumoniae*, le système immunitaire d'un individu non immunodéprimé répond rapidement par la production d'anticorps

atteignant un pic au bout de 3 à 6 semaines pour ensuite décliner graduellement sur une période allant de quelques mois à quelques années (512). La production d'immunoglobulines M (IgM), spécifiques de *M. pneumoniae*, apparaît 7 à 10 j après l'apparition des symptômes. Les titres les plus élevés en IgM vont être trouvés 10 à 30 j après le début des symptômes, surtout chez des jeunes enfants qui n'ont pas eu d'expositions répétées à la bactérie. La formation des anticorps de classe IgG est plus tardive que celle des IgM et atteint un pic dans la cinquième semaine suivant le début des symptômes (510, 512).

La variabilité antigénique de sa surface permet à *M. pneumoniae* d'échapper à l'immunosurveillance du système immunitaire, ainsi qu'à l'attaque des anticorps. En l'absence de paroi et d'espace périplasmique, la majorité des protéines impliquées dans la variation antigénique sont des lipoprotéines. L'adhésine P1, antigène majeur des infections à *M. pneumoniae*, est une protéine qui induit une forte réponse immunitaire. Les souches de *M. pneumoniae* peuvent être classées en 2 types, type 1 et type 2, après PCR-RFLP (« PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism ») du gène *p1* (71) (cf. paragraphe III B-1.4.1). La variation de séquence de l'adhésine P1 serait un des mécanismes par lequel la bactérie pourrait échapper à la réponse immune. En effet, des études ont montré que l'un ou l'autre des types P1 prédominait au sein des isolats cliniques suivant les pays et que le type prédominant pouvait varier dans le temps (71, 91, 416, 512). Ces changements de type d'adhésine P1 pourraient jouer un rôle dans le développement des épidémies.

3.4 Physiopathologie des atteintes extra-respiratoires

L'avènement de la PCR a permis de mieux comprendre la dissémination de cette bactérie dans tout l'organisme. La présence de *M. pneumoniae* dans les sites extra-respiratoires comme le sang, le liquide articulaire, céphalorachidien et péricardique, ainsi que dans les lésions cutanées a été documentée par PCR et par culture. Une toxicité bactérienne directe peut donc être envisagée dans certains cas. Cependant, la fréquence d'invasion des sites extra-respiratoires est méconnue car les cliniciens ne recherchent pas de façon systématique *M. pneumoniae* dans ces sites et les ponctions de certains liquides biologiques, comme la ponction lombaire, sont des gestes invasifs, uniquement réalisés en cas de points d'appel clinique.

Outre les anticorps spécifiques, une réponse aspécifique à l'infection à *M. pneumoniae* peut se mettre en place. L'homologie de séquence de protéines d'adhésine et de glycolipides de *M. pneumoniae* avec celles des cellules eucaryotes peut être à l'origine de désordres auto-immuns, pouvant toucher de multiples organes.

La physiopathologie des atteintes extra-respiratoires, notamment neurologiques, des infections à *M. pneumoniae* n'est pas encore totalement comprise. Récemment Narita a proposé de classer ces manifestations en trois catégories (351). Premièrement, il décrit des complications directes de l'infection, au cours desquelles il existe une production locale de cytokines proinflammatoires, induites par les lipoprotéines de la membrane cellulaire de *M. pneumoniae* (encéphalites précoces, par exemple). Deuxièmement, il décrit des complications indirectes de l'infection, au cours desquelles des désordres immunologiques sont impliqués, comme les phénomènes d'auto-immunité lors des atteintes neurologiques

centrales tardives. Troisièmement, il existe des complications liées à des occlusions vasculaires, secondaires aux phénomènes de vascularite et/ou de thromboses, liées à l'état d'hypercoagulabilité systémique parfois décrits dans les infections à *M. pneumoniae* (350).

3.5 Facteurs de risque d'infection

Les facteurs de risque d'infection à *M. pneumoniae* chez l'adulte ont été analysés lors d'une épidémie dans une unité militaire. En analyse multivariée, le tabagisme actif et les taux les plus bas d'IgG anti-*M. pneumoniae* au début des symptômes étaient associés aux infections symptomatiques (225).

4. Pouvoir pathogène

4.1 Infections respiratoires

L'entité « pneumopathie atypique primaire » a été longtemps utilisée pour décrire les pneumopathies liées à *M. pneumoniae*, avant même la détermination précise de la nature de l'agent étiologique dans les années 60. La première différence entre les pneumopathies « classiques » liées à *S. pneumoniae* et celles liées à *M. pneumoniae* était la description d'échecs thérapeutiques lors de traitements à base de pénicillines, premiers antibiotiques disponibles. L'appellation « atypique » était liée à l'absence de réponse aux antibiotiques (512).

Après une période d'incubation de 2 à 3 semaines (11), *M. pneumoniae* provoque des infections respiratoires aiguës touchant le tractus respiratoire supérieur, le tractus respiratoire inférieur ou les deux. Dans la majorité des cas, elles se manifestent par de simples trachéo-bronchites pour lesquelles le diagnostic étiologique n'est pas porté. Dans sa forme la plus caractéristique, l'infection réalise un tableau de pneumopathie d'installation progressive, avec de la fièvre et une toux. L'état général est conservé. Il existe souvent un syndrome pseudo-grippal. Une pharyngite peut être présente, surtout chez les enfants (11, 102).

Les enfants de moins de 5 ans présentent davantage un coryza associé à un « wheezing » et la progression jusqu'à la pneumopathie est rare. Chez eux, *M. pneumoniae* peut être à l'origine de bronchiolites (512). Les enfants âgés de 5 à 15 ans sont plus susceptibles de développer une broncho-pneumopathie, touchant un ou plusieurs lobes pulmonaires, nécessitant parfois une hospitalisation (110). Chez l'adulte le tableau clinique est modéré et une broncho-pneumopathie touchant un ou plusieurs lobes se développe chez 3 à 10 % des patients infectés dont l'évolution est en général lente et favorable (512). Cependant, *M. pneumoniae* peut être un agent de pneumopathie suffisamment sévère pour nécessiter une hospitalisation, surtout chez les personnes les plus âgées (512).

La symptomatologie respiratoire ne permet pas de différencier les infections à *M. pneumoniae* de celles provoquées par d'autres agents de pneumopathies atypiques dont *Chlamydia pneumoniae* et de nombreux virus respiratoires (509). Des cas de co-infections avec des bactéries (*S. pneumoniae*, *C. pneumoniae*) ou encore des virus respiratoires dont le virus de la grippe sont décrits. De plus, *M. pneumoniae* peut être présent dans le tractus respiratoire concomitamment avec d'autres agents

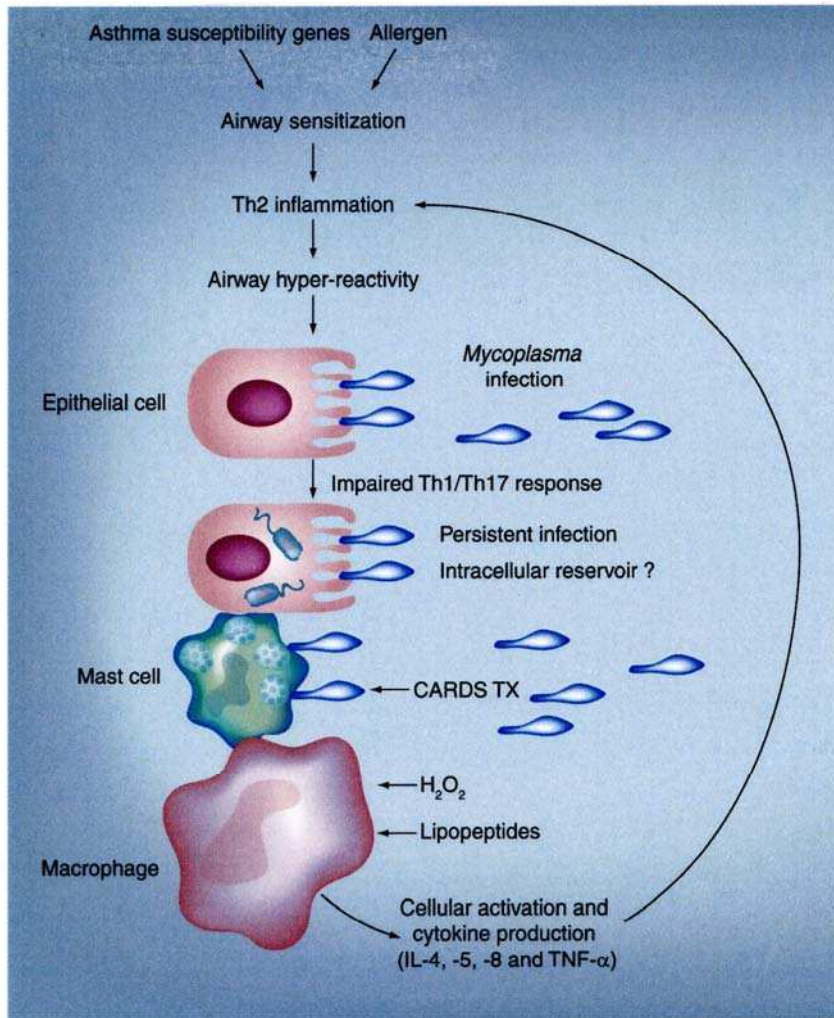


Figure 8. Rôle de *M. pneumoniae* dans l'asthme chronique (509).

L'infection initiale chez un sujet souffrant d'asthme allergique et d'une inflammation des voies respiratoires médiée par la voie Th2 est suivie d'une phase chronique liée à de multiples facteurs de virulence (toxine CARDS, H₂O₂, lipopeptides et adhésion directe à la surface des immunorécepteurs) contribuant à l'entretien de l'inflammation chronique des voies respiratoires et à l'hyperréactivité bronchique.

infectieux (88) et il existe quelques données indiquant que l'infection par *M. pneumoniae* peut précéder, voire intensifier, une infection par un autre pathogène viral respiratoire ou bactérien, dont *S. pneumoniae* (62).

Les enfants immunodéprimés, atteints d'asplénie fonctionnelle ou d'hypogammaglobulinémie, sont plus à risque de développer une pneumopathie « fulminante », ce qui illustre l'importance de l'immunité humorale dans la protection contre cet agent infectieux (110). En revanche il ne semble pas y avoir d'association entre l'infection par le VIH, altérant l'immunité cellulaire, et les infections graves à *M. pneumoniae*.

Enfin, des cas d'infections fulminantes avec un syndrome de détresse respiratoire aiguë (SDRA) et une défaillance multiviscérale ont été exceptionnellement rapportés chez des patients en bonne santé (512). Des cas de pneumopathies nosocomiales acquises sous ventilation mécanique à *M. pneumoniae* ont également été décrits (8).

4.2 Rôle dans l'asthme

Le rôle possible de *M. pneumoniae* dans l'asthme, tant dans la pathogenèse que l'exacerbation aiguë de l'asthme (457, 512), est connu de longue date. L'association de *M. pneumoniae* aux exacerbations aiguës de l'asthme a été montrée essentiellement chez l'enfant (34), mais aussi chez l'adulte (257, 356). Plusieurs études ont montré une exacerbation de l'asthme plus sévère en cas d'infection à *M. pneumoniae* (34, 70). Il y aurait aussi un lien entre la sévérité de l'asthme chronique stable et *M. pneumoniae* (302).

Du fait de la nature prolongée de l'infection à *M. pneumoniae*, certains asthmatiques pourraient présenter une infection chronique qui induit une réponse inflammatoire de type Th2 délétère et favorisant l'allergie (11). Hoeck *et al.* ont aussi démontré que *M. pneumoniae* stimulaient *in vitro* la production d'IL4, interleukine de la voie Th2, par les mastocytes dans des expériences de co-culture (170).

L'implication de *M. pneumoniae* dans l'asthme est étayé par des arguments récents. Chez la souris, des travaux expérimentaux montrent que *M. pneumoniae* provoque une inflammation des voies respiratoires avec une hyperréactivité bronchique. De plus, une inflammation des voies aériennes de type Th2 semble potentialiser la survie du microorganisme dans le poumon. Ces effets inflammatoires sont encore plus marqués après sensibilisation allergénique, plaçant ainsi la souris en situation à risque d'asthme (529). Par opposition à la voie Th2, une réponse inflammatoire de type Th17 semble importante pour l'éradication de la bactérie. La déplétion en macrophages pulmonaires et la neutralisation de la production d'IL 17 prolongent le cours de l'infection (530). Les patients avec une allergie respiratoire préalable seraient alors plus à risque de développer une colonisation chronique des voies respiratoires par *M. pneumoniae*, entraînant une augmentation de l'hyperréactivité des voies respiratoires. Le rôle de *M. pneumoniae* dans l'asthme chronique est résumé sur la Figure 8, (509).

Des études cliniques montrent que *M. pneumoniae* est présent chez près de 30 % des enfants hospitalisés pour exacerbation d'asthme (34). Au cours de la

Tableau 9. Principales manifestations extra-respiratoires au cours des infections à *M. pneumoniae* (adapté d'après la référence 123).

Localisation de l'atteinte (fréquence)	Manifestations
Cutanée (25 %)	Exanthème maculo-papuleux +++ Erythème polymorphe Erythème noueux Urticaire Syndrome de Stevens-Johnson
Neurologique (0,1 %)	Encéphalite et méningo-encéphalite +++ Paralysie de nerf crânien Myélite transverse Syndrome de Guillain-Barré Ataxie cérébelleuse Ischémie cérébrale Encéphalomyélite aiguë disséminée
Rhumatologique (14 %)	Myalgie +++ Arthrite aiguë Arthralgie
Cardiaque (1-8,5 %)	Péricardite +++ Myocardite
Hématologique	Anémie hémolytique auto-immune Coagulopathie de consommation
Diverses	Otite +++ Insuffisance rénale Pancréatite

première crise d'asthme chez des enfants prédisposés, 58 % d'entre eux sont infectés par *M. pneumoniae*. Par ailleurs, l'asthme est plus sévère chez les enfants infectés par *M. pneumoniae* et le risque de séquelles sur la fonction respiratoire existe (129).

L'importance de l'infection aiguë à *M. pneumoniae* au cours des exacerbations de l'asthme, mais surtout lors de l'entrée dans l'asthme, pourrait modifier les conduites thérapeutiques avec l'administration de macrolides plus fréquente chez les asthmatiques. A ce sujet, Martin *et al.* (302) ont mené une étude sur 55 patients présentant un asthme chronique stable, et ont mis en évidence *M. pneumoniae* chez 23 d'entre eux par PCR sur des lavages broncho-alvéolaires. Seulement un des 11 patients contrôles avaient une PCR positive. Six semaines de traitement par clarithromycine ont conduit à une amélioration clinique statistiquement significative chez les patients présentant une PCR positive par rapport aux patients avec une PCR négative (234). Dans une étude plus récente l'intérêt d'un autre macrolide, la télithromycine, a été évalué lors d'exacerbations aiguës d'asthme de l'adulte. Une infection à *M. pneumoniae* et/ou *C. pneumoniae* était diagnostiquée chez 61 % des 278 patients. L'essai concluait à un bénéfice de la télithromycine dans cette indication, sans en préciser le mécanisme et indépendamment du statut bactériologique (207).

Un Programme Hospitalier de Recherche Clinique (PHRC) dont notre laboratoire est coordonnateur est en cours au Centre Hospitalier Universitaire de Bordeaux pour entre autre évaluer l'implication de *M. pneumoniae* et *C. pneumoniae* dans l'asthme chez l'enfant et chez l'adulte.

4.3 Manifestations extra-respiratoires

Un quart des personnes infectées par *M. pneumoniae* développe des complications extra-respiratoires (Tableau 9), (123) avec ou sans atteinte respiratoire associée (512). Des réactions auto-immunes sont vraisemblablement à l'origine de la plupart des complications extra-respiratoires liées à l'infection à *M. pneumoniae*. Il est important de préciser que les signes cliniques extra-respiratoires peuvent apparaître avant ou pendant les signes respiratoires, voire même en l'absence de manifestations pulmonaires (56, 351).

4.3.1 Manifestations neurologiques

Les atteintes neurologiques sont les manifestations extra-pulmonaires les plus graves de l'infection à *M. pneumoniae*, particulièrement les atteintes du système nerveux central (351, 442, 513). Environ 6 à 7 % des patients hospitalisés pour pneumopathie à *M. pneumoniae*, confirmée par sérologie, présentent des signes neurologiques d'expression et d'intensité variables. Les atteintes neurologiques représentent en France seulement 0,1 % de l'ensemble des infections à *M. pneumoniae* (129).

Les encéphalites et les méningo-encéphalites sont les complications les plus fréquemment rencontrées (74). L'encéphalite à *M. pneumoniae* est plus fréquente chez l'enfant que chez l'adulte. Dans une étude de 2003 portant sur 334 patients californiens présentant une encéphalite, deux patients présentaient une encéphalite

à *M. pneumoniae* (sérologie positive en IgM et PCR positive dans le LCR) (134). Dans une étude récente portant sur 1988 patients présentant une encéphalite (« California Encephalitis Project »), 111 patients dont 76 % d'enfants présentaient une encéphalite à *M. pneumoniae* diagnostiquée le plus souvent par sérologie, beaucoup plus rarement sur une PCR positive dans le LCR (2 %) (61). Dans l'étude prospective nationale portant sur l'épidémiologie et le diagnostic des encéphalopathies infectieuses en France en 2007 (287), deux patients sur 253 présentaient une encéphalopathie à *M. pneumoniae* ; l'étude concernait majoritairement des adultes et n'avait inclus que 10 % d'enfants de moins de 16 ans. Une étude rétrospective française menée à Lyon entre 2001 et 2005 portant sur 29 cas d'encéphalites chez l'enfant a retrouvé cinq cas liés à *M. pneumoniae* et cinq cas liés aux entérovirus (17 %) (86). Les auteurs concluaient que *M. pneumoniae* pouvait être une cause importante d'encéphalite chez l'enfant au même niveau que les entérovirus.

Ont aussi été décrits un certain nombre d'autres atteintes neurologiques comme des ischémies cérébrales, des myélites transverses, des ataxies cérébelleuses, des polyradiculonévrites et des encéphalomyélites aiguës disséminées (218, 512). Certains déficits moteurs ont aussi été rapportés, comme des paralysies des nerfs crâniens, des neuropathies du plexus brachial, des choréathétoses et des paralysies ascendantes de type syndrome de Guillain-Barré (512).

Comme il a été évoqué précédemment, les complications du système nerveux central sont davantage liées à des mécanismes auto-immuns qu'à une toxicité directe de la bactérie. En effet, des anticorps anti-galactocérébrosides, un composant de la myéline du système nerveux central, ont été détectés chez 100 % des patients infectés à *M. pneumoniae* avec des signes neurologiques centraux contre 25 % des patients sans signes neurologiques (359). Ces anticorps pourraient être générés par mimétisme moléculaire entre un épitope de *M. pneumoniae* et les galactocérébrosides. Les leuco-encéphalopathies post-infectieuses dues à *M. pneumoniae* plaident également pour l'origine auto-immune des atteintes du système nerveux (351, 384).

La plupart des patients avec des signes neurologiques les développe 1 à 2 semaines après le début des signes respiratoires, mais 20 % d'entre eux n'ont pas de signes respiratoires lors de l'apparition des signes neurologiques, surtout chez les enfants (351). Les manifestations neurologiques régressent en général complètement, sans laisser de séquelles (442).

4.3.2 Manifestations dermatologiques

Alors que les manifestations neurologiques sont les atteintes extra-respiratoires les plus sévères de l'infection à *M. pneumoniae*, les manifestations dermatologiques sont vraisemblablement les atteintes extra-respiratoires les plus fréquemment rencontrées, décrites chez plus de 25 % des patients. Elles sont polymorphes et sont surtout décrites des exanthèmes maculo-papuleux, des érythèmes polymorphes, des urticaires et des érythèmes noueux (420, 512).

Les atteintes dermatologiques sont le plus souvent bénignes, mais des formes sévères de dermatoses bulleuses, comme des syndromes de Stevens-Johnson ou des stomatites bulleuses, ont été décrits où *M. pneumoniae* était détecté dans les lésions cutané-muqueuses (456, 512). Dans une étude rétrospective récente de la clinique Mayo aux Etats-Unis, 27 cas de syndrome de Stevens-Johnson ont été analysés, six d'entre eux étaient en rapport avec une infection à *M. pneumoniae*, les autres étaient secondaires à un traitement antibiotique. Les cas liés à *M. pneumoniae* avait un meilleur pronostic et une évolution favorable sans séquelles (522).

4.3.3 Autres manifestations

Des manifestations **rhumatologiques** ont aussi été rapportées, à type de myalgies, d'arthralgies et plus rarement de polyarthrites. Ces manifestations peuvent se rencontrer dans environ 14 % des infections à *M. pneumoniae*.

De réelles arthrites septiques avec détection de la bactérie dans le liquide articulaire ont été décrites, le plus souvent chez des patients hypogammaglobulinémiques (512). Dans de rares cas, mais peut-être sous-estimés, *M. pneumoniae* peut causer une infection osseuse invasive et un cas d'ostéomyélite chez un patient splénectomisé hypogammaglobulinémique a été attribué à ce mycoplasme (241).

Les complications **cardiaques** associées à *M. pneumoniae* sont rares, décrites chez 1 à 8,5 % des personnes avec un diagnostic sérologique d'infection et plus souvent chez les adultes que chez les enfants (323). Des cas de péricardites, myocardites et de tamponnades ont été décrits, avec détection de la bactérie dans le liquide péricardique (323).

La principale complication **hématologique** est l'anémie hémolytique auto-immune, rare mais sévère, touchant davantage les enfants (60). Cette anémie est liée à des agglutinines froides (435). Des coagulopathies de consommation ont également été décrites.

Des complications **néphrologiques** (glomérulonéphrites aiguës, insuffisance rénale, néphrites interstitielles) ont aussi été rarement rapportées (512). Des symptômes **gastro-intestinaux** (nausées, vomissements, diarrhées) peuvent être associés aux infections à *M. pneumoniae*. Des **pancréatites** ont rarement été décrites (512). Enfin, plus d'un tiers des patients peuvent présenter des manifestations **ORL** et plus particulièrement des otites (512).

5. Diagnostic bactériologique

Les symptômes n'étant pas spécifiques, un diagnostic rapide et fiable est nécessaire ; la sérologie est la méthode la plus utilisée mais ne permet qu'un diagnostic rétrospectif (511). La croissance fastidieuse et lente de ce microorganisme fait que la culture de *M. pneumoniae* est très rarement utilisée. Le développement des méthodes d'amplification d'acides nucléiques a montré son utilité dans le diagnostic des infections à *M. pneumoniae*. Cependant, la persistance du microorganisme pendant une période de temps variable après l'infection peut rendre

difficile l'interprétation d'une culture ou PCR positive sans la confirmation par une réponse sérologique positive. Ainsi, l'approche diagnostique optimale consiste à associer l'amplification d'acides nucléiques à des sérologies (22, 480).

5.1 Diagnostic sérologique

Pour les sérologies, un premier sérum sera prélevé sur tube sec dès l'apparition des signes cliniques ou au moment du diagnostic. Un deuxième prélèvement sera réalisé 2 à 3 semaines plus tard pour mettre en évidence une séroconversion ou une augmentation des titres sérologiques.

La réaction de fixation du complément (RFC) utilise un extrait glycolipidique de *M. pneumoniae* ou l'organisme entier. Cette technique détecte sans distinction les IgM et les IgG. Les critères déterminant une infection récente ou en cours sont une séroconversion ou une élévation significative du taux d'anticorps, d'un facteur 4, entre un sérum précoce et tardif. En l'absence de séroconversion, un titre isolé ≥ 64 donne une forte suspicion d'infection. En utilisant ce titre de 64, la sensibilité du test est de 90 % et sa spécificité de 88 % (221). Des réactions croisées sont rarement observées avec d'autres microorganismes et des réactions non spécifiques peuvent être observées au cours d'atteintes neurologiques ou pancréatiques, à des titres habituellement plus faibles.

Pour l'**immunofluorescence indirecte**, l'antigène sur lame est constitué de la bactérie entière. Ce test permet de titrer séparément les IgG et les IgM. La méthode est simple, rapide, mais d'interprétation subjective. Les résultats peuvent être affectés par la présence de facteurs rhumatoïdes.

Pour les **tests d'agglutination sur lame**, les particules utilisées peuvent être du latex, de la gélatine ou des hématies, sensibilisées avec un antigène spécifique de *M. pneumoniae*. Ces tests offrent l'avantage de la simplicité et de la rapidité mais sont moins performants que les autres tests.

Les techniques immuno-enzymatiques (ELISA) sont les techniques commercialisées les plus utilisées à l'heure actuelle. Elles sont généralement plus sensibles et spécifiques que les autres techniques. Les cibles antigéniques sont variées : microorganismes entiers, protéines ou glycolipides purifiés, protéines recombinantes, peptides de synthèse. Ces tests détectent les IgG, les IgM et les IgA séparément. Le titre-seuil des différentes trousse commercialisées est variable selon les trousse qui ne sont pas toutes équivalentes en terme de sensibilité et de spécificité (465). Certains fabricants proposent des tests ELISA rapides détectant sur membrane les IgM seules, d'autres simultanément les IgG et IgM. Ces trousse ont une sensibilité et une spécificité similaires aux autres trousse ELISA et offrent une grande rapidité d'exécution. Ils peuvent présenter un intérêt pour la détection des IgM chez l'enfant lorsque seul un sérum précoce est disponible.

A la suite d'une infection, le système immunitaire répond rapidement par la production d'anticorps, 7 à 10 j après le début de l'infection, avec un pic à 3 à 6 semaines suivi par une diminution en quelques mois voire un an. La présence d'IgM spécifiques seules, est souvent interprétée comme la preuve d'une infection aiguë car ce type d'anticorps apparaît typiquement deux semaines avant l'apparition des

IgG. Ceci présente l'avantage théorique d'autoriser l'analyse d'un seul sérum. L'analyse de deux sérums consécutifs a cependant démontré une bien meilleure sensibilité que celle d'un seul sérum (366). La présence d'IgM, témoignant d'une primo-infection, est souvent observée chez les enfants, mais plus rarement chez l'adulte. Chez l'adulte, il s'agit le plus souvent de réinfection avec une augmentation de titre des IgG sans réponse IgM. Les IgA sont, comme les IgM, présentes dans les infections aiguës, mais peuvent être également présentes lors des réinfections. Chez l'adulte, la présence d'IgA pourrait donc permettre de poser le diagnostic d'infection en cours, en l'absence de réponse IgM. Il est donc recommandé de rechercher les IgM, les IgG et éventuellement les IgA sur les deux sérums. L'infection aiguë est confirmée par la présence d'IgM ou d'IgA ou en l'absence de ces deux classes d'anticorps par une augmentation significative du titre des IgG entre les deux prélèvements. Il est à noter que la présence d'IgG à un taux résiduel témoignant d'une infection passée est fréquente chez l'adulte, jusqu'à 58 % des patients dans l'étude de Tuuminen *et al.* (492). Les IgM peuvent persister pendant plusieurs mois après l'infection, particulièrement chez l'enfant.

A noter également qu'une puce antigénique multiplexe dédiée au sérodiagnostic des pneumopathies atypiques bactériennes est en cours de développement (InoDiag) (140).

5.2 Diagnostic direct

Il a l'avantage de confirmer le caractère récent ou en cours de l'infection (23).

5.2.1 Prélèvements

Concernant le prélèvement, il doit toujours ramener des cellules auxquelles les mycoplasmes adhèrent. Pour les infections respiratoires, la recherche de *M. pneumoniae* dans les expectorations ou les sécrétions trachéales est à déconseiller en raison de leur contamination par de nombreuses bactéries et de la présence potentielle d'inhibiteurs pour la PCR. Des écouvillonnages de gorge ou, chez le jeune enfant, des aspirations naso-pharyngées peuvent être utilisées en raison du caractère diffus de l'infection (270). Lavages broncho-alvéolaires ou brossages endo-bronchiques peuvent être également pratiqués (23). Pour les atteintes extra-respiratoires, d'autres liquides biologiques peuvent être analysés, comme le LCR, tout autre liquide de ponction ou des biopsies cutanées. Si un isolement par culture de *M. pneumoniae* est envisagé, il faut utiliser des milieux de transport adaptés, comme le milieu saccharose-phosphate (2SP) enrichi de 5 % de sérum de veau fœtal (426), car les mycoplasmes sont très sensibles à la dessiccation.

5.2.2 Milieux de culture

La culture, moins sensible, fastidieuse et nécessitant des milieux complexes, reste du domaine de laboratoires spécialisés. *M. pneumoniae* pousse sur le milieu Hayflick modifié renfermant 20 % de sérum de poulain ou le milieu SP4 plus complexe. Il a été démontré *in vitro* que le milieu de culture minimal était composé de 19 nutriments essentiels, parmi lesquels glucose, vitamines, cholestérol et acides aminés, apportés par le sérum de poulain (543). Les milieux liquides, à pH 7,4-7,6, renferment du glucose et du rouge de phénol. La croissance est détectée sur le

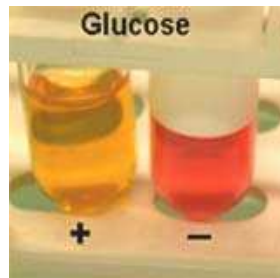


Figure 9. Croissance de *M. pneumoniae* en milieu liquide (milieu de Hayflick glucosé).



Figure 10. Colonies de *M. pneumoniae* sur milieu Hayflick gélosé (grossissement x 100).

virage de l'indicateur coloré, *M. pneumoniae* acidifie le milieu par fermentation du glucose en 6 à 21 j. Le milieu passe du rouge au jaune (Figure 9). Sur milieu gélosé, l'apparition de colonies doit être recherchée à la loupe binoculaire. Leur aspect est granulaire (Figure 10), (510).

Des méthodes de détection antigénique par différentes techniques ont été proposées pour *M. pneumoniae*. Elles manquent de sensibilité et ne sont pas recommandées (426).

Les contraintes de temps liées à la culture sont à l'origine du développement d'autres techniques de diagnostic direct, qui sont désormais des points clés dans le diagnostic de l'infection respiratoire à *M. pneumoniae*.

5.2.3 Diagnostic par amplification d'acides nucléiques

Le développement de techniques de diagnostic moléculaire a permis de proposer un diagnostic de l'infection à *M. pneumoniae* par amplification d'acides nucléiques. Ces techniques d'amplification s'avèrent plus sensibles que la sérologie à la phase précoce de l'infection (358). Différentes cibles ont été proposées pour l'amplification génique par PCR de *M. pneumoniae*, principalement le gène de l'adhésine P1 et le gène codant l'ARNr 16S. La PCR peut être réalisée sur les différents prélèvements déjà cités, en particulier les prélèvements de gorge ou les aspirations naso-pharyngées (23).

Pour les PCR en point final, des amorces spécifiques des gènes codant pour l'adhésine P1, l'ATPase, l'ARNr 16S ou le facteur d'élongation Tu ont été développées (Tableau 10), (267, 268).

Récemment, la technique de NASBA (« Nucleic Acid Sequence Based Amplification ») a été développée. Le produit d'amplification est un simple brin d'ARN, détecté par électrochimiluminescence ou « enzyme-linked gel assay » (ELGA). Un des avantages de cette technique serait d'identifier une infection productive à *M. pneumoniae*, contrairement aux autres techniques d'amplification qui détectent à la fois l'ADN des organismes vivants ou morts (268).

Il existe des trousse commercialisées basées sur une PCR en point final pour la détection de *M. pneumoniae* (Tableau 11).

Le diagnostic étiologique d'une infection respiratoire est facilité par le développement de PCR multiplexes, qui permettent la détection simultanée de plusieurs bactéries atypiques (*M. pneumoniae*, *C. pneumoniae*, *Legionella* spp.) ou de virus respiratoires (adénovirus, virus respiratoire syncytial (VRS)...), et ce grâce à l'utilisation d'amorces spécifiques de chaque microorganisme (Tableau 12 et 13), (180, 267, 268).

La PCR en temps réel est de plus en plus utilisée pour la détection de *M. pneumoniae*. L'utilisation de sondes TaqMan est rapportée pour amplifier le gène de l'adhésine P1 et de l'ARNr 16S de *M. pneumoniae* (148, 180, 338, 487), (Tableau 14). Plus récemment, la technologie TaqMan a été utilisée pour la détection de nouvelles cibles comme l'élément répété RepMP1 de l'adhésine P1 (95), le gène de l'ornithine transcarbamylase (*argI*) (532), le gène codant pour la toxine CARDS, ou

Tableau 10. PCR en point final décrites pour la détection de *M. pneumoniae* (adapté d'après les références 267 et 268).

Gène cible	Taille de l'amplifiat	Contrôle interne	Technique d'amplification	Mode de détection	Référence
ATPase	144 pb	–	PCR	hybridation	(31)
	144 pb	β-globine 262 pb	PCR	hybridation	(438)
	144 – 104 pb	β-globine	PCR nichée	électrophorèse	(2)
	250 pb	β-actine 661 pb	PCR capillaires	électrophorèse	(173)
Tuf	950 pb	–	PCR	hybridation	(276)
Adhésine P1	153 pb	–	PCR	électrophorèse	(200)
	375 pb	–	PCR	hybridation	(48)
	543 pb	–	PCR	hybridation	(525)
	209 pb	CEHM ^a	PCR	électrophorèse	(496)
	466 pb	–	PCR	hybridation + RFLP	(76)
	631 pb	–	PCR	électrophorèse	(249)
	466 – 183 pb	–	PCR nichée	électrophorèse	(115)
	375 pb	–	PCR	électrophorèse	(396)
	277 – 133 pb	CEHM	PCR nichée	électrophorèse	(89)
	466 pb	–	PCR	électrophorèse	(248)
	111pb – 154 pb	–	PCR nichée	électrophorèse	(231)
	309-339pb	β-globine	PCR	hybridation	(514)
ARNr 16S	584 pb	–	PCR	électrophorèse	(200)
	277 pb	–	RT-PCR	hybridation	(502)
	809 pb	–	PCR	hybridation	(418)
	290 pb	–	PCR	hybridation	(525)
	88 pb	–	PCR	électrophorèse	(211)
	277 pb	β-globine 329 pb	PCR	électrophorèse	(482)
	427 pb	–	PCR	hybridation	(224)
	190 pb	CEHM	NASBA ^b	ELGA ^c	(269)

^a CEHM, contrôle extrinsèque homologue, ^b NASBA, « nucleic acid sequence based amplification », ^c ELGA, « enzyme-linked gel assay ».

Tableau 11. Exemples de trousse commercialisées utilisant la PCR en point final pour la détection de *M. pneumoniae*.

Nom de la trousse	Organisme détecté, cible, taille de l'amplicon	Principe	Fabricant
ProDect® <i>Mycoplasma pneumoniae</i>	<i>M. pneumoniae</i> (adhésine P1)	PCR-ELISA (sonde biotinylée)	BCS Biotech SPA, Italie
<i>Mycoplasma pneumoniae</i> Genekam	<i>M. pneumoniae</i> Contrôle interne	PCR + électrophorèse	Genekam Biotechnology AG, Allemagne
Venor® Mp kit	<i>M. pneumoniae</i> (adhésine P1 – 207 pb) Contrôle interne (263 pb)	PCR + électrophorèse	Minerva Biolabs, Allemagne

Tableau 12. PCR multiplexes en point final décrites pour la détection simultanée de plusieurs agents responsables de pneumopathies atypiques dont *M. pneumoniae* (adapté d'après les références 267 et 268).

Cible et taille de l'amplifiat pour <i>M. pneumoniae</i>	Contrôle interne	Technique d'amplification	Mode de détection	Microorganisme recherché	Référence
ATP ase 144 pb	INF γ 150 pb	PCR	électrophorèse	<i>C. pneumoniae</i> <i>M. pneumoniae</i>	(69)
Adhésine P1 345 pb	ADN mitochondrial humain	PCR	hybridation	<i>M. pneumoniae</i> <i>M. genitalium</i>	(51)
Adhésine P1 345 pb	ADN mitochondrial humain	PCR	hybridation	<i>C. pneumoniae</i> <i>C. psittaci</i> <i>M. pneumoniae</i>	(484)
Adhésine P1 483 pb	–	PCR	électrophorèse	<i>C. pneumoniae</i> <i>H. influenzae</i> <i>M. pneumoniae</i> <i>S. pneumoniae</i>	(453)
Adhésine P1 360pb	–	PCR	électrophorèse	<i>B. pertussis</i> <i>C. pneumoniae</i> <i>L. pneumophila</i> <i>M. pneumoniae</i>	(313)
Adhésine P1 225 pb	ARNr 16S 291 pb	PCR	électrophorèse	<i>B. paraptussis</i> <i>B. pertussis</i> <i>C. pneumoniae</i> <i>M. pneumoniae</i>	(128)
Adhésine P1 343 pb – 160 pb	–	PCR nichée	électrophorèse	Adénovirus <i>C. pneumoniae</i> <i>L. pneumophila</i> <i>M. pneumoniae</i>	(244)
ARNr 16S 277 pb	–	RT-PCR	ELISA	Adénovirus Entérovirus Virus influenza A et B Virus parainfluenza 1 et 3 Virus respiratoire syncytial <i>C. pneumoniae</i> <i>M. pneumoniae</i>	(143)
ARNr 16S 88 pb	–	PCR	électrophorèse	<i>C. pneumoniae</i> <i>L. pneumophila</i> <i>M. pneumoniae</i>	(329)

Tableau 13. Exemples de trousse commercialisées multiplexes utilisant la PCR en point final pour la détection simultanée de plusieurs agents responsables de pneumopathies atypiques dont *M. pneumoniae*.

Nom de la trousse	Organisme détecté, cible, taille de l'amplicon	Principe	Fabricant
Chlamylège	<i>C. pneumoniae</i> <i>L. pneumophila</i> <i>Legionella</i> spp. <i>M. pneumoniae</i> (adhésine P1 - 298 pb) Contrôle interne (CEHM - 298 pb)	PCR multiplexe + hybridation	Argène Biosoft, France
Pneumoplex®	<i>B. pertussis</i> <i>C. pneumoniae</i> <i>L. micdadei</i> <i>L. pneumophila</i> <i>M. pneumoniae</i> (ADNr 16S - 241 pb)	PCR multiplexe + hybridation	Prodesse, Etats-Unis
RespiFinder® Plus	<i>B. pertussis</i> <i>C. pneumoniae</i> <i>L. pneumophila</i> <i>M. pneumoniae</i> (adhésine P1 - 385 pb) 15 virus respiratoires Contrôle interne (498 pb)	PCR multiplexe Technique MLPA ^a + électrophorèse capillaire	PathoFinder, Pays-Bas
Seeplex® PneumoBacter ACE detection	<i>B. pertussis</i> <i>C. pneumoniae</i> <i>L. pneumophila</i> <i>M. pneumoniae</i> (583 pb) <i>S. pneumoniae</i> <i>H. influenzae</i> Contrôle interne (1000 pb)	PCR multiplexe Technique DPO ^b + électrophorèse capillaire	Seegene, Corée
ResPlex I Panel RUO	<i>C. pneumoniae</i> <i>L. pneumophila</i> <i>M. pneumoniae</i> (MPN 592) <i>S. pneumoniae</i> <i>H. influenzae</i> <i>N. meningitidis</i> Adénovirus	PCR multiplexe + hybridation	Qiagen, Allemagne

^a MLPA, « multiplex ligation-dependent probe amplification », ^b DPO, « dual priming oligonucleotide ».

Tableau 14. Techniques de PCR en temps réel décrites pour la détection de *M. pneumoniae* (adapté d'après la référence 267).

Gène cible	Taille de l'amplifiat	Contrôle interne	Technique d'amplification	Détection	Bactérie	Référence
Adhésine P1	76 pb	—	monoplexe	TaqMan	<i>M. pneumoniae</i>	(160)
	203 pb	CEHM ^a	duplexe	Sondes d'hybridation	<i>M. pneumoniae</i>	(494)
	151 pb	CEHT ^b 140 pb	duplexe	Molecular Beacons	<i>M. pneumoniae</i>	(473)
	76 pb	—	multiplexe	TaqMan	<i>C. pneumoniae</i> <i>M. pneumoniae</i>	(519)
	NP ^c	—	monoplexe	SYBR Green	<i>M. pneumoniae</i>	(288)
	NP	—	monoplexe	TaqMan	<i>M. pneumoniae</i>	(75)
	91 pb	—	monoplexe	TaqMan	<i>M. pneumoniae</i>	(95)
	158 pb	—	duplexe	Molecular Beacons	<i>C. pneumoniae</i> <i>M. pneumoniae</i>	(148)
	125 pb	CI ^c	duplexe	TaqMan	<i>M. pneumoniae</i>	(487)
ADNr 16S	NP	—	NASBA	Molecular Beacons	<i>M. pneumoniae</i>	(268)
	427 pb	CI ^d 228 pb	duplexe	Sondes d'hybridation	<i>M. pneumoniae</i>	(395)
	225 pb	—	monoplexe	Molecular Beacons	<i>M. pneumoniae</i>	(338)
	NP	—	NASBA multiplexe	Molecular Beacons	<i>C. pneumoniae</i> <i>L. pneumophila</i> <i>M. pneumoniae</i>	(266)
RepMP2	141 pb	CEHM	duplex	Sondes d'hybridation	<i>M. pneumoniae</i>	(387)
RepMP1	89 pb	—	monoplexe	TaqMan	<i>M. pneumoniae</i>	(95)
ATPase	68 pb	—	monoplexe	TaqMan	<i>M. pneumoniae</i>	(526)
	106 pb	—	monoplexe	TaqMan	<i>M. pneumoniae</i>	(526)
Toxine CARDS	73 pb	—	monoplexe	TaqMan	<i>M. pneumoniae</i>	(526)
ArgI^e	154 pb	—	monoplexe	NP ^f	<i>M. pneumoniae</i>	(531)

^a CEHM, contrôle extrinsèque homologue, ^b CEHT, contrôle extrinsèque hétérologue, ^c CI, contrôle interne d'extraction et d'amplification, Universal Inhibition Control real-time PCR (Diagenode, Belgique), ^d CI, contrôle interne dont la nature n'est pas précisée, ^e *argI*, gène de l'ornithine transcarbamylyase, ^f NP, non précisé.

Tableau 15. Exemples de trousse commercialisées monoplexes ou multiplexes utilisant la PCR en temps réel pour la détection de *M. pneumoniae*.

Nom de la trousse	Organisme détecté, cible	Principe	Fabricant
<i>Mycoplasma pneumoniae</i> ASR	<i>M. pneumoniae</i> (adhésine P1) + CI ^a	PCR TaqMan	Cepheid, France
MGB Alert <i>Mycoplasma pneumoniae</i> ASR	<i>M. pneumoniae</i> (séquence répétée SDC1) + CI	PCR FRET + courbes de dissociation	Nanogen Advanced diagnostics, France
MYCOPLASMA <i>pn</i> Q-PCR Alert Kit	<i>M. pneumoniae</i> (adhésine P1) CI (βglobine humaine)	PCR TaqMan	Nanogen Advanced diagnostics, France
Venor® Mp-Qp Kit	<i>M. pneumoniae</i> (adhésine P1) CI (ADN plasmidique non infectieux)	PCR TaqMan	Minerva Biolabs, Allemagne
Artus® <i>M. pneumoniae</i> LC PCR Kit	<i>M. pneumoniae</i> (adhésine P1 – 108 pb) CEHT	PCR TaqMan	Qiagen, France
Simplexa™ <i>Mycoplasma pneumoniae</i>	<i>M. pneumoniae</i> (adhésine P1) + CI (250 pb)	PCR TaqMan	Focus Diagnostics, France
CycleavePCR™ <i>Mycoplasma pneumoniae</i> Detection Kit	<i>M. pneumoniae</i> (ATPase) CI	PCR TaqMan	Takara Bio Inc., France
NucliSENS EasyQ® <i>Mycoplasma pneumoniae</i> <i>Chlamydia pneumoniae</i>	<i>M. pneumoniae</i> (adhésine P1) <i>C. pneumoniae</i> + CI	NASBA ^b	bioMérieux, France
Affigene Cp/Mp tracer	<i>C. pneumoniae</i> <i>M. pneumoniae</i> CI	PCR multiplexe avec sondes Scorpion	Affigene, France
Propneumo®	<i>C. pneumoniae</i> <i>M. pneumoniae</i> (ARNr 16S-23S) CEHM ^c	PCR multiplexe TaqMan	Prodesse, USA
Mpn/Cpn multiplex kit (DIA-MCpn-050)	<i>C. pneumoniae</i> <i>M. pneumoniae</i> CI (Virus complet)	PCR multiplexe TaqMan	Diagenode, Belgique
Respiratory RNA viruses multiplex	<i>B. pertussis</i> <i>C. pneumoniae</i> <i>L. pneumophila</i> <i>M. pneumoniae</i> 11 virus respiratoires	PCR multiplexe	Diagenode, Belgique

^a CI, contrôle interne, ^b NASBA, « nucleic acid sequence based amplification », ^c CEHM, Contrôle extrinsèque homologue.

encore le gène de l'ATPase (526). La technologie utilisant deux sondes d'hybridation, basée sur le principe du FRET, est décrite pour l'amplification du gène de l'adhésine P1, de l'ARNr 16S et de l'élément répété RepMP2 (180, 387). Les « Molecular Beacons » sont également employées dans la technique de NASBA en temps réel (180), technologie ensuite développée en PCR multiplexe pour la détection simultanée de *C. pneumoniae*, *L. pneumophila* et *M. pneumoniae* (266), (Tableau 14).

Des trousse de PCR en temps réel commercialisées mono ou multiplexes permettent aussi la détection de *M. pneumoniae* (Tableau 15). Toutes ces trousse utilisent des amorces spécifiques du gène de l'adhésine P1 ou du gène de l'ATPase. La détection est réalisée grâce à une technologie de sonde d'hydrolyse (chimie TaqMan) ou de sondes d'hybridation et la présence d'un contrôle interne permet la validation du résultat. Certaines trousse permettent l'amplification simultanée de *C. pneumoniae* et *M. pneumoniae*. La trousse Respiratory RNA viruses multiplex (Diagenode, Liège, Belgique) permet l'amplification simultanée de *B. pertussis*, *C. pneumoniae*, *L. pneumophila*, *M. pneumoniae* et de 11 virus respiratoires (Tableau 15).

Notre laboratoire a récemment évalué un certain nombre de kits de PCR en temps réel commercialisés pour *M. pneumoniae*. Ils se sont avérés fiables et peuvent être utilisés aisément dans les laboratoires (487).

6. Sensibilité aux antibiotiques et traitement

6.1 Méthodes d'étude

Bien qu'il n'existe pas de standardisation véritable des méthodes d'étude de l'activité des antibiotiques, des recommandations ont été faites (510) et un sous-comité du CLSI (« Clinical and Laboratory Standards Institute ») dont fait partie notre laboratoire devrait publier en 2011 des protocoles standardisés pour l'étude de l'activité *in vitro* des antibiotiques vis-à-vis de *M. pneumoniae*, *M. hominis* et *Ureaplasma* spp.

Les méthodes utilisées ont été abordées dans le paragraphe I B-6.1.

Des tests moléculaires ont également été décrits. Récemment, une PCR en temps réel avec analyse des courbes de température de fusion a été mise au point pour détecter deux mutations de l'ARNr 23S (A2058G et A2059G), responsables de la résistance aux macrolides chez *M. pneumoniae* (528). Dans notre laboratoire, une technique de PCR en temps réel avec analyse de courbe de fusion a également été mise au point. Elle permet de détecter grâce à une PCR duplexe les six mutations de l'ARNr 23S décrites *in vivo* et *in vitro* et responsables de la résistance aux macrolides (383). Deux autres techniques ont été publiées (92, 256). Ces techniques présentent l'avantage d'être directement applicables à partir des prélèvements respiratoires, permettant un dépistage rapide de la résistance et l'adaptation du traitement antibiotique.

6.2 Résistance naturelle

6.2.1 Résistances liées à la classe et à l'espèce

Elles sont décrites dans le paragraphe B-6.2.1 et B-6.2.2 (Tableau 7).

6.2.3 Antibiotiques actifs et phénotype sensible

Comme il a été rappelé précédemment, les antibiotiques potentiellement actifs sur les mycoplasmes et utilisés en thérapeutique sont les tétracyclines, les antibiotiques du groupe MLSK et les fluoroquinolones (25, 27). Ces trois classes partagent l'avantage d'être actives sur des bactéries potentiellement associées à *M. pneumoniae* dans les infections respiratoires. D'autres antibiotiques, aminosides et chloramphénicol, peuvent être actifs sur *M. pneumoniae* mais ne sont qu'exceptionnellement utilisés (atteintes du système nerveux central).

Les **tétracyclines** peuvent être indiquées dans le traitement des infections à *M. pneumoniae* chez l'adulte (512). Les tétracyclines ne peuvent pas être utilisées chez l'enfant avant huit ans, ni chez la femme enceinte.

Les **MLSK** sont les antibiotiques de choix pour le traitement des infections respiratoires à *M. pneumoniae* touchant principalement l'enfant (512) ou quand les tétracyclines ou les fluoroquinolones sont contre-indiquées. L'azithromycine et les kétolides (télithromycine) ont la meilleure activité *in vitro* sur *M. pneumoniae* tandis que les lincosamides, en particulier la lincomycine, ont une activité modeste (Tableau 7).

Les **fluoroquinolones** les plus récentes sont les plus actives (Tableau 7), (21). Elles représentent une alternative intéressante dans le traitement des infections respiratoires.

Le Tableau 7 rassemble les CMI de différents antibiotiques sur les deux mycoplasmes pathogènes humains étudiés dans cette thèse, *M. genitalium* et *M. pneumoniae* (25, 27). De très nombreux résultats sont disponibles pour *M. pneumoniae*. Les études récentes de sa sensibilité *in vitro* aux antibiotiques réalisées en Europe et en Amérique du Nord montrent des résultats comparables sans grand changement par rapport à des études plus anciennes (512).

6.3 Résistance acquise

Parmi les mécanismes de résistance acquise, seules les altérations de la cible ont été décrites *in vivo* chez *M. pneumoniae* (21). Le support génétique de la résistance correspond à des mutations, qui concernent *in vivo* seulement la classe des MLSK pour *M. pneumoniae*.

Le nombre d'études sur la résistance *in vitro* et *in vivo* de *M. pneumoniae* augmente, avec l'émergence pour cette espèce réputée sensible aux antibiotiques d'une résistance aux macrolides (21).

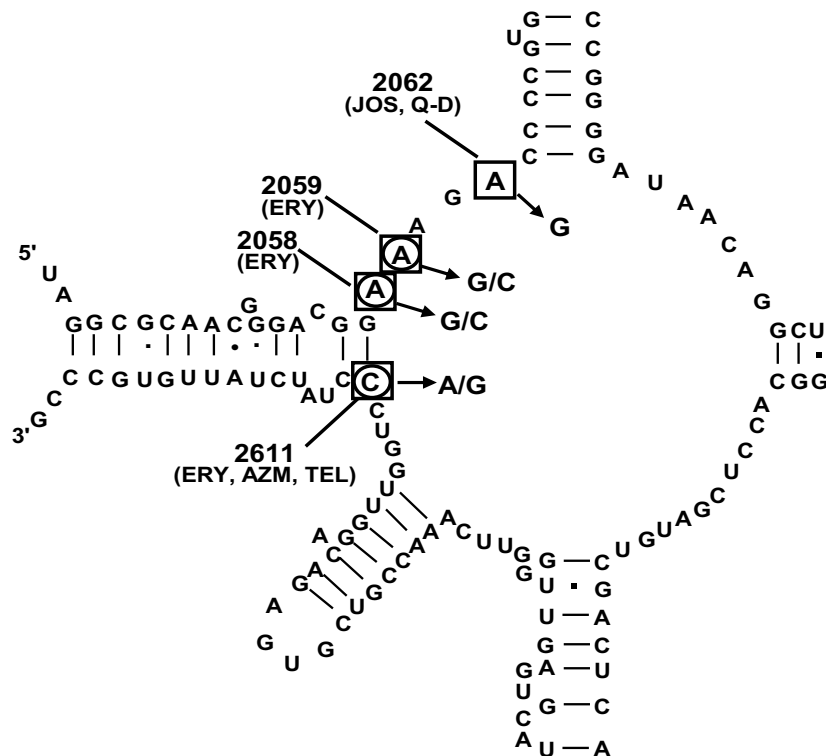


Figure 11. Structure secondaire de la boucle peptidyltransférase du domaine V de l'ARNr 23S de *M. pneumoniae* (adapté d'après la référence 28).

Numérotation de *E. coli*. Les nucléotides encadrés indiquent les positions mutées *in vitro*. Les antibiotiques entre parenthèses (AZM, azithromycine, ERY, érythromycine, JOS, josamycine, Q-D, quinupristine-dalfopristine et TEL, télithromycine) indiquent l'agent sélecteur. Les nucléotides encerclés indiquent les positions mutées *in vivo*.

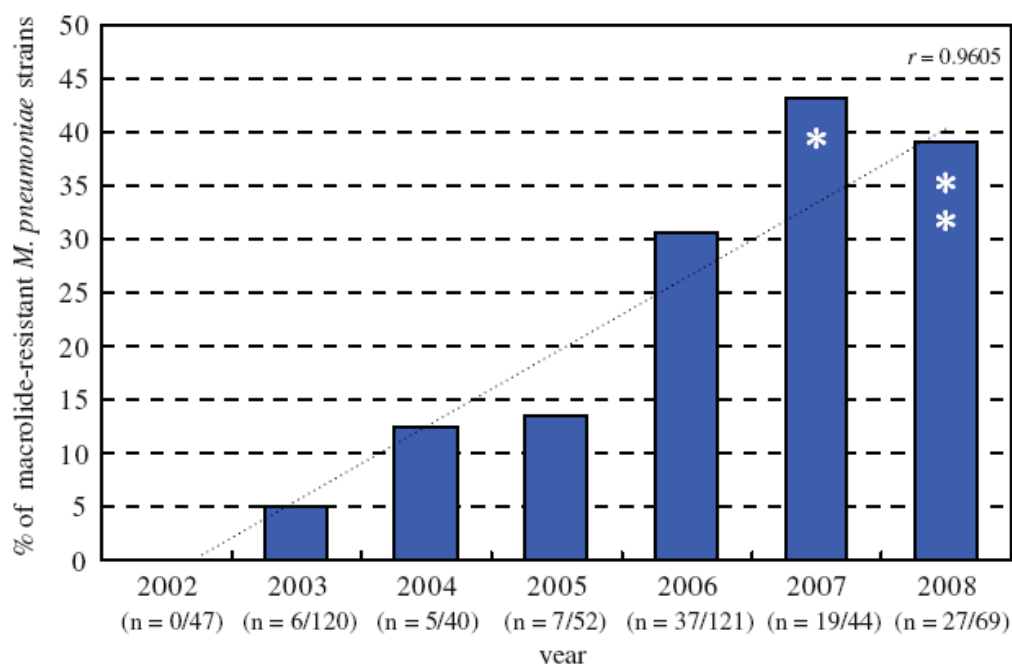


Figure 12. Fréquence de la résistance aux macrolides chez *M. pneumoniae* entre 2002 et 2008 (339).

Les astérisques indiquent les souches résistantes aux macrolides isolées chez des adultes.

6.3.1 Tétracyclines

Des souches de *M. pneumoniae* ayant une sensibilité diminuée aux tétracyclines (CMI ≤ 2 µg/mL) ont été obtenues *in vitro* en présence de concentrations de tétracyclines (78). Cette diminution de sensibilité aux tétracyclines était associée à des mutations de l'ARNr 16S dans la poche de fixation de la tétracycline.

6.3.2 MLSK

M. pneumoniae ne possède qu'un seul opéron ribosomique. Les mutations de la cible ribosomique (région V de l'ARNr 23S ou protéines L4 et L22) représentent à ce jour le seul mécanisme de résistance aux macrolides.

Des souches résistantes de *M. pneumoniae* ont été obtenues par sélection *in vitro* en présence d'érythromycine (273, 362). Chez les mutants la résistance était associée à des mutations aux positions 2058 et 2059 au niveau de la boucle centrale du domaine V de l'ARNr 23S (Figure 4), connues comme des « hot spots » de résistance aux macrolides chez les autres bactéries (Figure 11). Une étude récente, très complète, menée *in vitro*, a porté sur la sélection de mutants résistants à différents macrolides, streptogramines et un kétolide, soit un total de huit antibiotiques (379). Des mutations ont été sélectionnées dans le domaine V de l'ARNr 23S aux positions 2611 et 2062 (Figure 11) et dans les gènes des protéines ribosomiques L4 et L22.

In vivo, la majorité des souches de *M. pneumoniae* résistantes décrites présentent une mutation A₂₀₅₈→G dans la boucle peptidyl-transférase de l'ARNr 23S. Les autres mutations correspondent aux positions 2059 et 2611 (Figure 11), (304, 336, 337, 362). Aucune mutation dans le domaine II de l'ARNr 23S ou au niveau des gènes codant pour les protéines ribosomiques L4 et L22 n'a été décrite *in vivo*. Les souches résistantes ne présentaient pas de résistance croisée à d'autres familles d'antibiotiques.

Les souches cliniques résistantes de *M. pneumoniae* étudiées présentent un phénotype MLS_B avec résistance aux macrolides, lincosamides et streptogramines B et également aux kétolides, avec des augmentations différentes de CMI des molécules selon les mutations (28), (Tableau 16). Un dépistage moléculaire de la résistance par PCR-RFLP (304) ou par PCR en temps réel (92, 256, 383, 528) à partir des prélèvements respiratoires positifs en PCR a été développé pour *M. pneumoniae* pour les mutations en position 2058 et 2059.

Très peu de souches cliniques de *M. pneumoniae* résistantes aux macrolides ont été décrites avant 2000 (28). En revanche, à partir de 2000, plusieurs études japonaises rapportent une augmentation significative de la résistance aux macrolides chez *M. pneumoniae* (304, 336, 337) concernant jusqu'à 39,1 % des souches de 2008 selon Moruzomi *et al.* (339), (Figure 12). La résistance concerne de 69 à 92 % des souches en Chine et touche enfants et adultes (53, 263, 533). Dans une récente épidémie à *M. pneumoniae* aux Etats-Unis (528), trois souches sur onze étaient résistantes aux macrolides. En France, seulement deux isolats cliniques résistants aux macrolides ont été décrits au sein d'une collection de 155 souches isolées entre

Tableau 16. CMI des antibiotiques du groupe MLSK pour des souches cliniques de *M. pneumoniae* résistantes aux macrolides et génétiquement caractérisées (adapté d'après les références 21 et 339).

<i>M. genitalium</i>	CMI (µg/ml)								
	ERY ^a	CLA	AZM	JOS	MDM	LIN	CLI	Q-D	TEL
Souche de référence M129	0,015	0,08 - 0,015	0,002	0,03-0,12	0,0008 – 0,006	8	4	0,25	0,002
Souches cliniques avec une mutation dans le domaine V de l'ARNr 23S									
A2058G ^b	32 - > 256	32 - > 256	16 - > 64	0,06 - 64	2 - > 64	> 256	256	0,5 - 1	16 - > 64
A2058C	> 256	> 256	16	64	64	64	32	1	ND ^c
A2059G	64 - 256	16 - > 64	16 - 64	64 - 256	> 64 - 256	64	32	0,25	1 - 16
C2611G	8	1	0,03	0,25	0,25	16	4	0,25	ND
C2611A	1	0,5	0,03	0,06	ND	ND	ND	ND	0,06

^a Macrolides à 14 chaînons : ERY, érythromycine, CLA, clarithromycine ; macrolide à 15 chaînons : AZM, azithromycine ; macrolide à 16 chaînons : JOS, josamycine, MDM, midécamycine ; lincosamides : LIN, lincomycine, CLI, clindamycine ; streptogramine : Q-D, quinupristine-dalfopristine ; kétolide : TEL, télichromycine, ^b Système de numérotation de *E. coli*, ^c ND, non déterminé.

1994 et 2006 (377). En revanche, une augmentation de la résistance aux macrolides chez *M. pneumoniae* a été récemment observée en France avec 9,8 % (5/51) de génotypes résistants rapportés entre 2005 et 2007 (383).

6.3.3 Fluoroquinolones

Des mutants résistants de *M. pneumoniae* ont été obtenus par sélection *in vitro* en présence de différentes fluoroquinolones dont les plus récentes, lévofloxacin, trovofloxacin, gatifloxacin, moxifloxacin et gémifloxacin (144). Quelle que soit la molécule utilisée pour la sélection, les « hot spots » de la résistance aux fluoroquinolones décrits au niveau des QRDR (« Quinolone Resistance Determining Regions ») d'autres bactéries ont été retrouvés mutés chez les souches résistantes.

6.4 Traitement

Les macrolides et apparentés représentent le traitement de première intention des infections à *M. pneumoniae* (512). Les recommandations françaises prônent un traitement de 15 à 21 j par les macrolides et les cyclines aux doses usuelles pour les pneumopathies à *M. pneumoniae* (65).

Comme il a été rappelé précédemment la réponse inflammatoire lors d'une infection à *M. pneumoniae* joue un rôle important dans la physiopathologie de la maladie. L'activité anti-inflammatoire des macrolides est bien connue. Par exemple, la clarithromycine est capable de supprimer *in vitro* l'expression de l'IL8 (1). L'efficacité clinique des macrolides dans le traitement des infections respiratoires à *M. pneumoniae* reflète non seulement leur activité bactériostatique, mais aussi leur effet anti-inflammatoire, en inhibant la production de certaines cytokines pro-inflammatoires.

D'après les études de la littérature, les nouveaux macrolides sont aussi efficaces que l'érythromycine avec plus de 90 % d'efficacité sur l'éradication bactérienne. Ils présentent également l'avantage d'être mieux tolérés. L'azithromycine s'avère être le macrolide le plus efficace et grâce à sa longue demi-vie cet antibiotique peut être administré en cure courte, ce qui améliore l'observance thérapeutique (421). La télichromycine, en cure de 7 à 10 j, est également efficace et présente l'avantage d'une prise par jour améliorant l'observance (54, 394). La durée des symptômes est raccourcie par la précocité de prescription du traitement antibiotique.

L'isolement de souches de *M. pneumoniae* résistantes aux macrolides peut conduire à des échecs thérapeutiques, avec pour les patients concernés une augmentation du nombre de jours de fièvre et un changement plus fréquent du traitement initial par macrolides (53, 339, 459). La majorité des patients infectés avec une souche résistante aux macrolides avait déjà été exposée à cette classe d'antibiotique auparavant (339).

En cas d'infection à *M. pneumoniae* résistant aux macrolides, les cyclines et les fluoroquinolones représentent une alternative. L'efficacité des cyclines dans les infections respiratoires n'a pas été souvent étudiée et comparée à celle d'autres

antibiotiques. En revanche, les études sur les fluoroquinolones sont plus nombreuses et les nouvelles fluoroquinolones, lévofloxacin et moxifloxacin, pendant 7 à 14 j ont montré également un taux d'éradication bactérienne supérieur à 90 % (112, 114, 371). Les tétracyclines et fluoroquinolones étant contre-indiquées chez les enfants et les femmes enceintes, le traitement d'une infection à *M. pneumoniae* résistant aux macrolides chez ces patients pose problème et doit être envisagé au cas par cas.

Pour les infections sévères à *M. pneumoniae*, comme les atteintes du système nerveux central, peu d'études thérapeutiques sont disponibles. Certains auteurs recommandent de coupler de fortes doses de corticoïdes (146) à des antibiotiques pénétrant dans le système nerveux central, comme la doxycycline ou le chloramphénicol (84, 512). Pour les encéphalomyélites aiguës disséminées, ayant une importante composante auto-immune, les plasmaphèreses ou les immunoglobuline polyvalentes intraveineuses sont recommandées (415, 442). Les immunoglobulines intraveineuses sont également recommandées et efficaces dans les syndromes de Guillain-Barré liées aux infections à *M. pneumoniae* (384).

6.5 Vaccin

L'intérêt d'un vaccin est renforcé par l'inconstance d'une immunité protectrice naturelle et prolongée dans le temps après une primo-infection à *M. pneumoniae*, par l'existence de portages prolongés et par la notion d'épidémies dans les camps militaires et les écoles. De plus, la relative homogénéité antigénique de cette bactérie rendait en théorie possible le développement d'un vaccin.

Différents candidats vaccins ont été proposés, vaccins inactivés, vaccins atténués par voie nasale et vaccins antigéniques comprenant l'adhésine P1, sans succès (100).

Une récente méta-analyse sur les essais vaccinaux a été réalisée. Les résultats de six essais vaccinaux ont été analysés. L'efficacité de ces différents vaccins contre les pneumopathies à *M. pneumoniae* était d'environ 50 %. Les résultats étaient homogènes entre les études. Aucun effet indésirable sérieux n'était décrit (258). Les tentatives d'essais vaccinaux entre les années 60 et 90 se sont soldées par des échecs et il n'y pas eu de nouveaux essais depuis. De nouvelles stratégies vaccinales pourraient être envisagées et la toxine CARDS pourrait représenter une nouvelle cible vaccinale (509).

II Méthodes de typage moléculaire

A. Génotypage des bactéries pathogènes

1. Définition et classification des marqueurs épidémiologiques

L'Epidémiologie moléculaire est une approche intégrée qui combine l'épidémiologie et le génotypage, en utilisant des outils de Biologie moléculaire.

Les marqueurs épidémiologiques sont les caractères discriminants permettant de distinguer au sein d'une espèce bactérienne les souches d'origine distincte ou clones bactériens. La technique expérimentale mettant ces caractères en évidence et les critères de classification des bactéries en type clonaux, sur la base de ces marqueurs, constituent ensemble un système de typage épidémiologique (454).

Le typage épidémiologique microbien permet sur le plan diagnostique individuel de confirmer la présence d'une infection, d'établir le foyer initial et l'extension d'une infection et de distinguer une rechute d'une réinfection. Sur le plan à proprement parler épidémiologique, ces outils permettent de confirmer la transmission endémique ou épidémique d'un pathogène au sein d'une population humaine, de déceler l'origine de la contamination et le mode de transmission, de suivre l'évolution du réservoir du pathogène au sein d'une population et de mesurer l'efficacité des stratégies de maîtrise des infections épidémiques et de prévention des infections endémiques (454).

On distingue les marqueurs phénotypiques qui prennent en compte les caractères exprimés par les microorganismes, phénomènes post-traductionnels, et les marqueurs génotypiques qui analysent le génome. Au cours des deux dernières décennies, les marqueurs génotypiques ont progressivement remplacé les marqueurs phénotypiques.

2. Mécanismes d'évolution bactérienne

Les bactéries existent depuis des milliards d'années et il est surprenant de constater qu'en définitive elles évoluent peu par rapport aux phénomènes tendant à modifier leur génome.

Deux types de mécanismes d'évolution existent, les mécanismes verticaux, concept darwinien de l'évolution, et les mécanismes horizontaux (9). Le chromosome et les plasmides sont transférés verticalement après duplication et répartition entre les cellules filles. Leur diversification est due aux mutations ponctuelles et aux réarrangements d'ADN tels que duplications, délétions ou transpositions. Les transferts horizontaux entre les bactéries sont des transferts par conjugaison, transposition, transduction et transformation. Excepté pour les éléments mobiles, ces transferts sont restreints à trois catégories de gènes, les gènes de surface, les gènes du transport d'ADN et les gènes de pathogénicité (478).

Les taux de recombinaison et de mutation sont néanmoins très faibles en général chez les bactéries. Il semble que les variations génétiques soient minimisées par les mécanismes de réparation des mutations. Cependant l'étude de la séquence

de plusieurs génomes de mycoplasmes a montré la faible quantité d'information génétique dédiée à ces systèmes de réparation de l'ADN (407). Lorsque des changements dans l'ADN s'effectuent au hasard à une fréquence constante dans le temps, la distance génétique entre deux lignées cellulaires est proportionnelle au temps écoulé. Une séquence d'ADN peut alors être considérée comme une « horloge moléculaire ». Généralement, un gène indispensable est bien conservé car tout événement tendant à le modifier aboutit à la formation d'un individu non viable. C'est ainsi que les ARNr sont bien conservés dans le monde vivant en général et le monde bactérien en particulier. Toute mutation altérant profondément la structure des gènes correspondant aboutit à la formation d'un individu incapable de synthétiser des protéines. En revanche, les mutations qui n'altèrent pas la fonction sont conservées et le polymorphisme ainsi obtenu permet de dresser des arbres phylogénétiques (274).

Les mécanismes et la vitesse d'évolution de différentes régions du génome bactérien dans l'environnement naturel demeurent des questions ouvertes. Des loci d'adaptabilité rapide ont été récemment localisés au niveau d'éléments d'ADN répétés en tandem en nombre variables ou « Variable Number of Tandem Repeats » (VNTR). Les VNTR seront détaillés plus bas.

3. Intérêt du génotypage des bactéries pathogènes et notion d'espèce

Face à une infection, l'identification de l'agent pathogène en cause est le premier objectif du microbiologiste et du clinicien. Cette étape est de loin la plus urgente et la plus importante à court terme puisqu'elle intervient directement dans la prise en charge appropriée du patient. Dans un deuxième temps, il est également essentiel de rechercher l'origine de l'agent pathogène afin si possible de contrôler la source de l'infection. Les sources peuvent être l'environnement médical, matériel et personnel soignant, ou l'environnement urbain. Cette enquête *a posteriori* requiert le typage des souches.

Avant d'entrer dans ces notions de typage de souches, il peut être utile de revenir brièvement sur la notion d'espèce bactérienne, qui n'est pas une problématique simple. Une espèce bactérienne peut être définie comme un groupe de souches qui ont entre elles un degré élevé de similarité les différenciant considérablement des autres groupes de souches, tout en respectant plusieurs caractères indépendants. Les souches d'une même espèce ont en général une homologie de génome de 70 %. La notion d'espèce bactérienne a une utilité pratique, probablement liée au fait qu'une infime fraction de bactéries existant sur notre planète est pathogène pour l'homme. Ces rares bactéries ont trouvé une niche écologique. A partir d'ancêtres précurseurs, des populations essentiellement clonales se sont développées. Dans un contexte médical, les représentants de ces populations donnent une image d'homogénéité phénotypique et par conséquent une valeur pratique à la notion d'espèce. Les agents pathogènes sont souvent réduits à la notion d'espèce, mais derrière cette apparente homogénéité se cache une grande hétérogénéité et les considérations sur les notions d'espèce ne seront pas abordées plus avant.

Il existe un apport certain de l'étude de la diversité génétique à la connaissance de l'épidémiologie des maladies bactériennes. Typifier des souches bactériennes, ou identifier des bactéries à l'échelon d'une souche, est particulièrement important pour le diagnostic, le traitement et la surveillance épidémiologique des infections bactériennes. Ceci est particulièrement vrai pour les espèces bactériennes résistantes aux antibiotiques, virulentes, impliquées dans des infections nosocomiales, ou pour des espèces pandémiques ou émergentes. Le génotypage a également une implication dans l'étude de la dynamique des populations bactériennes (254).

4. Concept de clonalité

Les épidémies observées dans les cas de maladies infectieuses ont souvent pour origine un même agent étiologique. Généralement l'agent étiologique responsable d'une épidémie dérive d'une cellule unique, toutes les cellules issues de cette cellule seront génétiquement identiques ou très proches. Les organismes impliqués dans une épidémie ont donc une relation de clonalité. Ils appartiennent à la même espèce et présentent des caractéristiques communes comme par exemple des facteurs de virulence, des propriétés biochimiques et des caractéristiques génomiques. Cependant il existe une diversité suffisante pour distinguer des isolats de même espèce provenant de différents lieux et prélevés à différents moments, ce qui permet de les classer en souches. Un typage plus approfondi qu'une simple détermination de l'espèce impliquée dans une épidémie peut être obtenu (441).

Par ailleurs, pour le typage dans un contexte d'étude épidémiologique, les génotypes doivent être déterminés à partir de plusieurs loci suffisamment stables. L'étude de marqueurs génétiques permet diverses applications en Microbiologie, comme le typage de souches, l'enrichissement des données de taxonomie et l'analyse des liens entre variabilité génétique et diversité biologique, afin de mieux comprendre la pathogénicité, les interactions hôtes/pathogènes et la résistance aux antibiotiques.

4.1 Définition du déséquilibre de liaison

Le déséquilibre de liaison correspond au réassortiment non aléatoire des allèles à différents loci, en fonction de leur position physique sur le chromosome. En l'absence de recombinaison, un déséquilibre de liaison entre les marqueurs est observé. Ce déséquilibre est très important dans les populations clonales. La structure de nombreuses populations bactériennes est clonale, le taux de recombinaison du chromosome bactérien étant trop faible pour permettre une distribution aléatoire des allèles.

4.2 Structure des populations bactériennes, de la clonalité à la panmixie

Il existe trois grands types de populations bactériennes selon le déséquilibre de liaison :

- Les populations panmictiques où il n'y a pas de déséquilibre de liaison, les allèles sont distribués aléatoirement. C'est le cas de *N. gonorrhoeae* et de

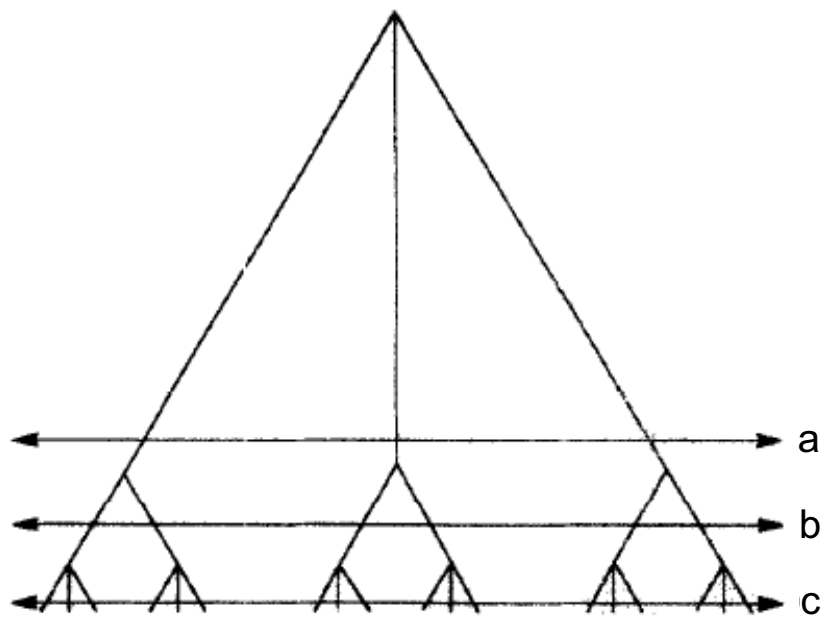


Figure 13. Arbre phylogénétique hypothétique décrivant la divergence évolutive de génotypes de pathogènes (adapté d'après la référence 481).

a, Marqueur de faible résolution (horloge moléculaire lente) distinguant trois génotypes, b, Marqueur plus discriminant que a, distinguant six génotypes, c, Marqueur à évolution rapide, distinguant 18 génotypes.

Helicobacter pylori, chez ce dernier les échanges génétiques sont tellement fréquents que tous les loci sont à l'équilibre de liaison.

- Les populations épidémiques sont panmictiques, mais apparaissent clonales en situation d'épidémie puisque le génotype responsable de l'épidémie est très fortement surreprésenté dans la population étudiée au moment précis de l'étude (épidémies liées à *N. meningitidis* par exemple).

- Les populations clonales où il existe un fort déséquilibre de liaison (par exemple dans le genre *Salmonella*).

Les populations ne sont pas invariablement clonales, elles peuvent occuper un large spectre de structures possibles allant d'une population strictement clonale à une population panmictique. C'est pourquoi la notion de clone s'applique uniquement à un jeu donné de marqueurs génétiques (441).

4.3 Vitesse de mutation des marqueurs

La vitesse de mutation des marqueurs est à considérer pour utiliser les marqueurs adaptés au type de questions posées. Comme le montre la Figure 13, (481), plus le marqueur évolue vite, plus de génotypes différents sont observés au sein d'une population donnée. Les marqueurs ayant une vitesse d'évolution rapide sont utiles pour des études épidémiologiques à court terme et au niveau local, notamment lors de situations épidémiques. Les marqueurs évoluant lentement sont utiles pour des études épidémiologiques sur des mois ou des années et au niveau mondial, notamment pour des études de phylogénie.

Lorsque de nouveaux marqueurs sont décrits, le plus souvent, une étude de leur stabilité au cours du temps est réalisée. Une méthode simple est le SPE (« Serial Passage Experiments ») qui consiste à faire des dilutions en série d'une culture bactérienne pendant plusieurs semaines pour suivre les changements génotypiques et phénotypiques au cours du temps.

B. Méthodes de génotypage chez les *Mollicutes*

Dans ce paragraphe les différentes méthodes de génotypage utilisées chez les *Mollicutes* seront passées en revue (478). Différentes classifications de ces méthodes peuvent être utilisées. Il existe des méthodes de typage sur un gène et d'autres sur l'ensemble du chromosome. Il existe aussi des méthodes sans PCR, nécessitant l'isolement en culture de la bactérie étudiée, et d'autres méthodes avec PCR, utiles pour les bactéries à culture fastidieuse. Dans ce travail seront d'abord décrites les méthodes basées sur l'analyse de fragments, avec ou sans amplification de l'ADN, puis les méthodes utilisant le séquençage et enfin les méthodes basées sur l'hybridation (254). Les méthodes de génotypage de *M. genitalium* et *M. pneumoniae* seront détaillées dans un chapitre spécifique.

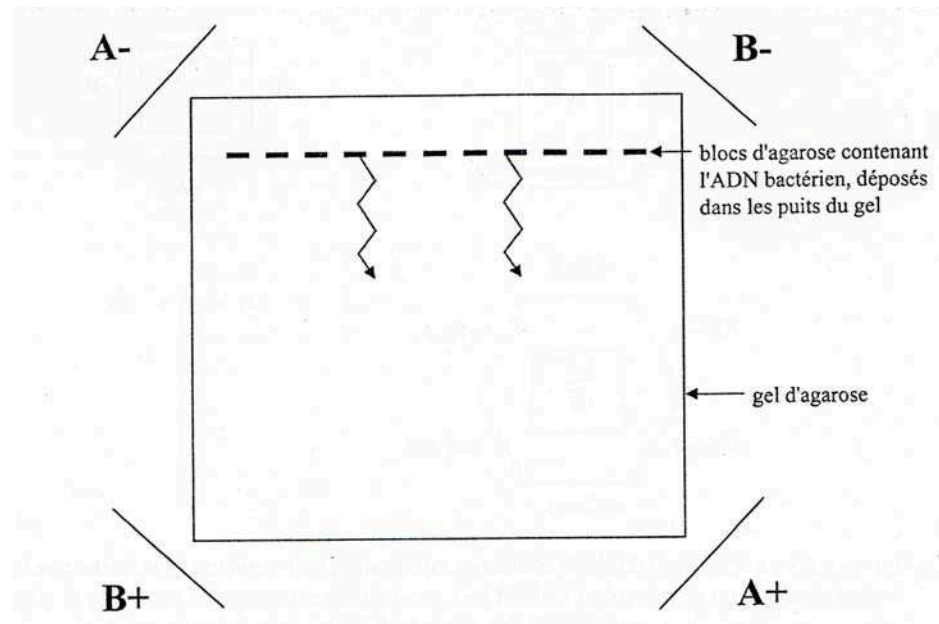


Figure 14. Principe général de la PFGE (141).

Pendant l'électrophorèse, lorsque les électrodes A sont activées, l'ADN migre de la cathode A- vers l'anode A+ ; après changement d'orientation du champ électrique (électrodes B activées), l'ADN change de direction et migre vers l'anode B+. La séparation des macromolécules d'ADN s'effectue en fonction de la taille des fragments, en suivant un trajet en « zig-zag » symbolisé par les flèches.

1. Méthodes basées sur l'analyse de fragments

1.1 Méthodes avec restriction enzymatique

1.1.1 Electrophorèse en champ pulsé ou PFGE

Principe

Le principe de l'électrophorèse en champ pulsé ou « Pulsed-Field Gel Electrophoresis » (PFGE), est représenté sur la Figure 14. Cette méthode s'avère très performante pour analyser une grande variété de microorganismes. La PFGE permet des applications épidémiologiques. Elle permet en effet de comparer des souches bactériennes au sein d'une même espèce en fonction du polymorphisme des fragments de restriction du génome. L'ADN bactérien est extrait puis clivé par des endonucléases qui reconnaissent des sites de restriction rares sur le chromosome (de l'ordre de 10 sites par mpb), ce qui permet d'obtenir un nombre réduit de fragments d'ADN. La PFGE permet de séparer ces fragments de grande taille et de comparer des souches bactériennes en fonction de leur profil de macrorestriction. La méthode peut être appliquée à toute espèce à condition que celle-ci soit cultivable.

La PFGE diffère de l'électrophorèse classique par le fait qu'elle n'utilise pas un seul champ électrique constant mais expose l'ADN à des champs qui changent régulièrement d'orientation pendant la durée de l'électrophorèse. C'est une alternance d'orientation de la direction du champ électrique qui permet la séparation de gros fragments d'ADN, par un phénomène de « reptation » des molécules à travers les mailles de l'agarose.

Les autres champs d'application de la PFGE en Bactériologie sont l'établissement de cartes physiques et génétiques, ce qui a été le cas pour *M. hominis* (243), la détermination de taille de génomes, utile pour les espèces présentant des variations importantes de taille de génome comme *Ureaplasma* spp. (402) et les études phylogénétiques.

En Epidémiologie, la PFGE a été appliquée à la caractérisation d'espèces bactériennes variées et a démontré une capacité de typage et un pouvoir discriminant élevés. Des critères d'interprétation des variations de profils de macrorestriction ont été édictés. La comparaison des profils de macrorestriction repose sur le nombre et la taille des fragments d'ADN. Le résultat peut être exprimé par le nombre absolu de bandes qui diffèrent entre les souches comparées. Des critères d'interprétation consensuels ont été proposés par Tenover, tenant compte des mutations aléatoires (475). Ils permettent d'analyser le profil de macrorestriction d'une souche donnée par comparaison au profil de référence des souches majoritaires de l'épidémie (Tableau 17), (474).

Applications chez les mycoplasmes

La PFGE a été l'une des premières méthodes de génotypage utilisée chez les mycoplasmes (Tableau 18). Comme l'ADN des mycoplasmes contient un faible GC %, les enzymes reconnaissant des sites à fort taux de GC sont préférables.

Tableau 17. Critères d'interprétation du lien épidémiologique de souches bactériennes d'après l'analyse des profils de macrorestriction (adapté d'après la référence 474).

Nombre de modifications génétiques par rapport à la souche épidémique	Nombre de fragments différenciant la souche testée de la souche épidémique	Interprétation microbiologique des profils	Interprétation épidémiologique
0	0	Semblables	Souche faisant partie de l'épidémie
1	2-3	Très proches	Souche faisant probablement partie de l'épidémie
2	4-6	Proches	Souche faisant possiblement partie de l'épidémie
3	≥ 7	Différentes	Souche non reliée à l'épidémie

Tableau 18. Application de la PFGE aux *Mollicutes*.

<i>Mollicutes</i>	Enzymes utilisées	Technique discriminante	Références
<i>M. bovis</i>	<i>Sma</i> I	Oui	(311)
<i>M. mycoides</i> subsp. <i>mycoides</i> Small Colony	<i>Bam</i> HI	Non	(240)
<i>M. ovipneumoniae</i>	<i>Sma</i> I	Oui	(370)
<i>M. agalactiae</i>	<i>Sma</i> I	Non	(307, 483)
<i>M. capricolum</i> subsp. <i>capripneumoniae</i>	<i>Bam</i> HI	Non	(240)
<i>M. mycoides</i> subsp. <i>mycoides</i> Large Colony	<i>Nco</i> I, <i>Bln</i> I	Oui	(467)
<i>M. hyopneumoniae</i>	<i>Apa</i> I, <i>Sal</i> I	Oui	(121, 447)
<i>M. gallisepticum</i>		Oui	(301, 324)
<i>M. synoviae</i>	<i>Sma</i> I	Oui	(159, 300)
<i>M. cynos</i>	<i>Sma</i> I	Non	(294)
<i>M. fermentans</i>	<i>Bgl</i> I	Oui	(419)
<i>M. hominis</i>	<i>Bam</i> HI, <i>Sal</i> I, <i>Xho</i> I	Oui	(378)
<i>Ureaplasma</i> spp.	<i>Bss</i> HI	Oui	(341, 531)

Cependant le choix des enzymes doit être spécifique de chaque espèce. Dans certains cas, une seule enzyme peut suffire. Inversement, un nombre important d'enzymes peut être nécessaire pour augmenter le pouvoir discriminant pour certaines espèces très homogènes.

Prenons l'exemple des mycoplasmes animaux :

M. hyopneumoniae est l'une des premières étiologies de pneumonie chez les porcs. Des endonucléases avec des sites de restriction contenant seulement G ou C ont produit 12 à 25 larges fragments d'ADN lors d'une étude chez *M. hyopneumoniae* (121), ce qui est en accord avec la probabilité d'avoir de telles séquences dans un génome de 1000 kpb avec un GC % de 33. Dix isolats de quatre pays différents ont fourni des profils très différents après digestion avec *Apal*. Plus récemment, *M. hyopneumoniae* a été analysé par PFGE avec les enzymes *SalI* et *Apal*, confirmant l'important pouvoir discriminant de cette technique pour cette espèce, quelle que soit l'enzyme utilisée (447).

M. synoviae est un des pathogènes majeurs des oiseaux, à l'origine d'ostéoarthrites, de synovites et d'infections respiratoires des gallinacés. Chez cette espèce, la digestion de l'ADN par *SmaI* a produit deux à 12 larges fragments et a permis de différencier 14 profils au sein de 18 souches isolées dans deux pays, France et Etats-Unis (300).

M. bovis est un important pathogène animal à l'origine de pneumonies, d'arthrites et de mastites chez les bovins. Cette espèce a aussi été étudiée par PGFE après digestion par *SmaI*. Quarante trois souches ont été analysées, avec 23 profils différents, permettant de séparer les souches en seulement deux groupes principaux. *M. bovis* est donc considéré comme une espèce homogène, à l'origine d'une dissémination clonale (311).

MMLC (*M. mycoides* subsp. *mycoides* Large Colony) est un pathogène majeur des chèvres, responsable de manifestations cliniques variées. Il appartient au cluster « *M. mycoides* », comprenant six taxons correspondant aux principaux pathogènes des ruminants (120, 297). MMLC a été récemment analysé par PFGE dans une étude française avec les enzymes *NcoI* et *BlnI*, comparant des souches asymptomatiques et des souches isolées lors d'une épidémie en 2004. Chaque isolat à l'origine d'un portage asymptomatique arborait un profil particulier, alors que les isolats épidémiques présentaient deux profils majeurs et persistaient durant toute l'épidémie. De nombreuses souches distinctes sont donc portées par les animaux sains, seulement quelques-unes sont responsables des signes cliniques observés lors d'une épidémie d'un troupeau, ceci reflétant une différence de virulence entre les souches (467).

En revanche, la PFGE n'a pas été trouvée discriminante pour quatre espèces de mycoplasmes animaux, ***M. agalactiae*** (483), ***M. mycoides* subsp. *mycoides* Small Colony** (MMSC) (240), ***M. capricolum* subsp. *capripneumoniae*** (Mccp) (240) et ***M. cynos*** (294). Ceci pouvait être dû au nombre limité de souches étudiées, ou à l'étude de souches provenant d'un seul pays ou de pays limitrophes. Dans ce cas, la similarité entre les souches pouvait être expliquée par une expansion clonale d'une seule souche ou par un défaut de pouvoir discriminant de la technique pour

ces espèces chez lesquelles les réarrangements génomiques ne sont vraisemblablement pas fréquents.

Les autres espèces analysées par PFGE (autres espèces animales, *M. gallisepticum* et *M. ovipneumoniae* et espèces humaines, *M. fermentans*, *M. hominis* et *Ureaplasma spp.*) sont citées dans le Tableau 18.

En résumé, la PFGE est une technique permettant de différencier des souches au sein de certaines espèces de mycoplasme. Cependant, cette technique est lourde et nécessite une culture bactérienne, or, certaines espèces, comme *M. genitalium*, sont très difficilement cultivables. Elle est donc difficilement utilisable en routine. Cette technique a beaucoup été utilisée au début des années 2000 pour le typage des mycoplasmes et l'est de moins en moins actuellement au profit de méthodes moins lourdes.

1.1.2 Analyse du profil de restriction obtenu par une endonucléase

Principe

L'analyse du profil de restriction obtenu par une endonucléase ou « Restriction Endonuclease Analysis » (REA), est basée sur le même principe que la PFGE, mais fait appel à une endonucléase qui clive l'ADN plus fréquemment, ce qui produit plusieurs fragments d'ADN, séparés par électrophorèse sur gel d'agarose à 0,8 % (477) ou bien sur gels de polyacrylamide à 3,5 % (85), dans un champ électrique constant.

Applications chez les mycoplasmes

MMSC est à l'origine de la pleuropneumonie contagieuse bovine, importante épizootie internationale. Des profils différents étaient obtenus lors de l'analyse de 25 souches d'origine géographique différente de MMSC en utilisant *HindIII* et *PstI*. La résolution sur gels d'agarose à 0,8 % était suffisante pour séparer correctement les fragments de haut poids moléculaire et pour permettre la séparation des deux souches vaccinales, T1 et KH3J (477).

La résolution obtenue par électrophorèse sur gel de polyacrylamide permet la séparation des petits fragments d'ADN. La digestion d'extraits d'ADN issus de différents isolats du « **groupe bovin 7** », groupe issu du cluster « *M. mycoides* », avec l'enzyme *CfoI*, suivie de la séparation sur gel de polyacrylamide, donnait des profils homogènes pour des souches épidémiques australiennes. Ces profils étaient différents des profils de souches européennes ou des profils de souches australiennes non reliées épidémiologiquement (85).

En définitive, avec un équipement standard, la REA est plus facile à mettre en œuvre que la PFGE.

1.2 Méthodes avec amplification d'ADN

Ces méthodes de typage ne nécessitent pas de grandes quantités de matériel. Elles sont plus faciles à mettre en œuvre sur le terrain et moins coûteuses.

1.2.1 Amplification d'ADN par PCR suivie d'une migration sur gel

Cette méthode très simple permet d'identifier et de différencier des souches de **MMSC** d'origine géographique différente. En effet, les souches africaines et australiennes ont un fragment supplémentaire d'environ 8,8 kpb, correspondant entre autre à l'IS1634, par rapport aux souches européennes. Par simple PCR à l'aide de diverses paires d'amorces il est possible d'identifier spécifiquement MMSC et aussi de différencier les souches européennes des autres (326).

1.2.2 Amplification aléatoire

Principe

L'amplification aléatoire d'ADN polymorphique, « Random Amplification of Polymorphic DNA » (RAPD), est une technique développée au début des années 1990 (518, 524). Elle consiste à amplifier par PCR des fragments d'ADN en utilisant une seule amorce courte (généralement 10 bases), qui servira de point de départ pour la polymérase en se fixant dans un sens ou dans l'autre sur des séquences complémentaires. A la différence de la PCR classique, l'utilisation d'amorces de séquences arbitraires présente l'avantage de ne nécessiter aucune information préalable sur la séquence de l'ADN étudié. Le côté aléatoire de l'amplification est dû aux températures d'hybridation suffisamment basses pour permettre l'accrochage non stringent de ces amorces (52). Les variations de taille des amplifiats obtenus s'expliquent par des mutations, des délétions, ou par des insertions, rendant les sites d'appariement trop distants pour donner lieu à une amplification, ou modifiant la longueur de la séquences amplifiée (524).

Les facteurs pouvant influencer le résultat final, particulièrement l'intensité des bandes générées, sont nombreux. La concentration en ADN de l'extrait, le type de thermocycleur et le type et l'origine de la *Taq* polymérase ont été incriminés (325). Si la RAPD semble simple d'application, elle nécessite beaucoup de rigueur pour obtenir une bonne reproductibilité.

Applications chez les mycoplasmes

Les premières études épidémiologiques chez *M. gallisepticum* étaient basées sur cette technique, utilisant une ou trois amorces (253). Cette espèce de mycoplasme est responsable de pathologies des volailles à travers le monde, causant des infections respiratoires chroniques dans les élevages de poulets et de dindes. Les deux approches donnaient des profils différents pour trois souches vaccinales et trois souches de référence, alors que les profils obtenus avec des souches isolées durant deux années chez 17 oiseaux sauvages étaient très similaires, indiquant qu'une seule souche était responsable des épidémies dans la vie sauvage. La RAPD a été évaluée chez *M. gallisepticum* dans des publications

plus récentes et comparée à différentes techniques de génotypage et les résultats étaient variables suivant les amorces utilisées (106, 109, 226, 324).

Des profils différents étaient également obtenus pour 18 souches, non reliées sur le plan épidémiologique, de *M. synoviae* isolées en France et aux Etats-Unis (300). Cette étude ainsi qu'une autre (106) montrait que la technique RAPD était moins reproductible que la PFGE.

La RAPD a aussi été utilisée pour évaluer une possible corrélation entre les profils obtenus avec une seule amorce et la virulence de *M. hyopneumoniae* (505). L'étude comprenait un système de score de l'infection respiratoire et des lésions pulmonaires. Les trois souches étudiées étaient plus ou moins virulentes. Une bande de 5000 bp obtenue par RAPD semblait corrélée à la virulence des souches. La bande supplémentaire pouvait être la conséquence d'une insertion d'un large fragment conférant la pathogénicité. Plus récemment, la RAPD a été testée sur *M. hyopneumoniae*, montrant un pouvoir discriminant intéressant (index de diversité de 0,95), mais confirmant le manque de reproductibilité de cette méthode (448).

La RAPD a été testée sur 53 souches anglaises de *M. bovis* permettant de les séparer en deux groupes principaux et donnant des résultats comparables à ceux de la méthode AFLP (311).

M. ovipneumoniae est associé aux maladies des petits ruminants en Grande-Bretagne où il est responsable d'épidémies depuis 2002. Un travail anglais a analysé par RAPD 43 souches, isolées entre 2002 et 2004. Quarante profils différents ont été obtenus, soulignant la grande hétérogénéité de cette espèce y compris lors de périodes épidémiques (370).

Plus récemment la RAPD a été appliquée à *M. cynos*. C'est un agent d'infections respiratoires canines. L'analyse a été réalisée avec une seule amorce sur 14 souches anglaises et la souche de référence, isolée au Danemark en 1971. Douze profils différents ont été obtenus, permettant de regrouper les souches en deux principaux groupes (294).

En résumé, la RAPD, initialement considérée comme une technique de génotypage de référence, est de moins en moins utilisée au profit de techniques plus reproductibles.

1.2.3 PCR suivi d'une électrophorèse sur gel en gradient dénaturant (PCR-DDGE)

Principe

L'électrophorèse sur gel en gradient dénaturant ou « Denaturing Gradient Gel Electrophoresis » (DGGE), est une technique d'électrophorèse permettant la séparation de molécules d'acides nucléiques de même taille. Son principe consiste à déposer un échantillon d'acides nucléiques sur un gel d'électrophorèse contenant un agent dénaturant (101, 345). Le gène de l'ARNr 16S est la cible la plus fréquente de l'amplification car il est présent chez toutes les bactéries. Cette technique présente aussi l'avantage de pouvoir être réalisée directement sur des prélèvements.

Applications chez les mycoplasmes

Les applications de cette technique chez les mycoplasmes sont peu nombreuses. La PCR-DGGE est davantage utilisée pour le diagnostic d'espèce que pour le génotypage.

Une équipe anglaise a développé pour la première fois cette technique chez les mycoplasmes. Une amplification par PCR de la région V3 du gène de l'ARNr 16S était réalisée avec des amorces universelles (345), puis une séparation des produits de PCR était réalisée sur gel dénaturant. La PCR-DGGE pouvait différencier 27 espèces de **mycoplasmes animaux** sur les 32 étudiées (309). La même équipe a ensuite amélioré la technique. Une amplification par PCR de la région du gène de l'ARNr 16S était réalisée avec des amorces spécifiques du genre *Mycoplasma*, puis une séparation des produits de PCR était réalisée sur gel dénaturant. La PCR-DGGE pouvait différencier les 67 espèces de mycoplasmes humains et animaux étudiés, directement à partir des prélèvements (310).

Une équipe française a également appliqué la PCR-DGGE au typage du cluster « ***M. mycoides*** ». Une cinquantaine de souches du cluster « *M. mycoides* » ont été amplifiées et analysées par DGGE. Cette technique ne permettait pas de différencier en une seule PCR et sans ambiguïté tous les membres du cluster, les profils obtenus étant trop variables au sein d'un taxon (466).

La PCR-DDGE a été appliquée à ***M. hyopneumoniae***, à partir de souches cubaines, dont les résultats ont été récemment présentés. Cette méthode permettait l'identification de cette espèce et la différenciation en trois génotypes différents (265).

Enfin, la PCR-DDGE a permis la détection de ***M. wenyonii***, pathogène supposé des bovins, directement à partir de prélèvements sanguins d'animaux infectés (312).

1.2.4 PCR en temps réel HRM (« High-Resolution Melting »)

Principe

L'analyse HRM, comme la DGGE, sépare des allèles d'ADN par PCR en temps réel et analyse des courbes de fusion. Le profil de fusion d'un produit de PCR dépend de son GC %, de sa longueur et de sa séquence. Ce profil est monitoré par des colorants saturés qui fluorescent en présence d'ADN double brin. L'analyse HRM n'est pas à proprement parlé une méthode basée sur l'analyse de fragments mais elle a été classée dans cette catégorie car elle est basée sur une amplification d'ADN par PCR et permet la détection de variants de séquence sans séquençage ou hybridation (149). Grâce à cette méthode, les polymorphismes sur un seul nucléotide ou « Single Nucleotide Polymorphism » (SNP), peuvent par exemple être détectés sans sonde d'hybridation.

Les avantages de la PCR en temps réel HRM sont sa rapidité, son utilisation possible directement à partir de prélèvements et l'utilisation de système clos limitant les risques de contamination. Cette méthode est aussi sensible et spécifique que les méthodes nécessitant une séparation physique. Cependant, elle nécessite un

équipement de PCR en temps réel et n'est pas aussi discriminante pour toutes les espèces bactériennes. Enfin, la comparaison des résultats entre les laboratoires peut être limitée.

Applications chez les mycoplasmes

Pour *M. synoviae*, la PCR en temps réel HRM a été utilisée pour détecter 10 variants de séquence dans le gène *v/hA* (188).

Plus récemment, cette méthode a été réalisée sur le gène *v/hA* de *M. gallisepticum*. Elle a permis de différencier, de façon efficace et rapide, différents isolats et souches de *M. gallisepticum* à partir de cultures mais aussi d'écouvillons de volaille (130).

Enfin, cette technique a été appliquée à *M. pneumoniae* et les résultats seront détaillés dans le chapitre III.

1.2.5 Analyse Multilocus du nombre d'éléments répétés en tandem ou MLVA

a) Séquences répétées à un seul locus, les répétitions en tandem

Une répétition en tandem ou « Tandem Repeat » (TR), est une succession de motifs d'ADN répétés les uns derrière les autres, par opposition aux répétitions dispersées dont les unités répétées sont dispersées dans le génome. Les différentes unités formant la répétition en tandem ne sont pas nécessairement identiques entre elles, le degré d'homologie au sein d'une répétition en tandem étant très variable. Les répétitions en tandem ont été en premier lieu étudiées chez les mammifères, où trois catégories ont été distinguées, les satellites, les minisatellites et les microsatellites. Cette distinction correspond à des différences de taille, les satellites ont une très grande taille de l'ordre de quelques milliers de pb, ils sont surtout décrits chez les eucaryotes, les minisatellites ont une taille variant de 6 à quelques centaines de pb et les microsatellites ont une taille inférieure à 6 pb. Les répétitions en tandem sont présentes, dans des proportions variables, chez tous les organismes, eucaryotes, procaryotes et même virus.

D'autres termes sont aussi employés chez les bactéries pour désigner les répétitions en tandem. Les STR (« Short Tandem Repeat ») désignent des répétitions en tandem simples, elles correspondent aux minisatellites et aux microsatellites. Les VNTR sont des séquences répétées en tandem polymorphes au sein d'un locus dont le nombre de répétitions peut varier d'une souche à l'autre. Les VNTR peuvent appartenir à la classe des minisatellites et des microsatellites.

En raison de leur polymorphisme de longueur résultant de la variation du nombre de motifs, les répétitions en tandem ont conduit au développement des empreintes génétiques permettant l'identification humaine (189). L'intérêt des répétitions en tandem dans le domaine du typage est lié au fait que de nombreux allèles peuvent être observés en un seul locus et que ces différents allèles peuvent être identifiés par la mesure de la taille d'un fragment d'ADN, opération simple à réaliser. Les répétitions en tandem ont initialement rendu possible les études de

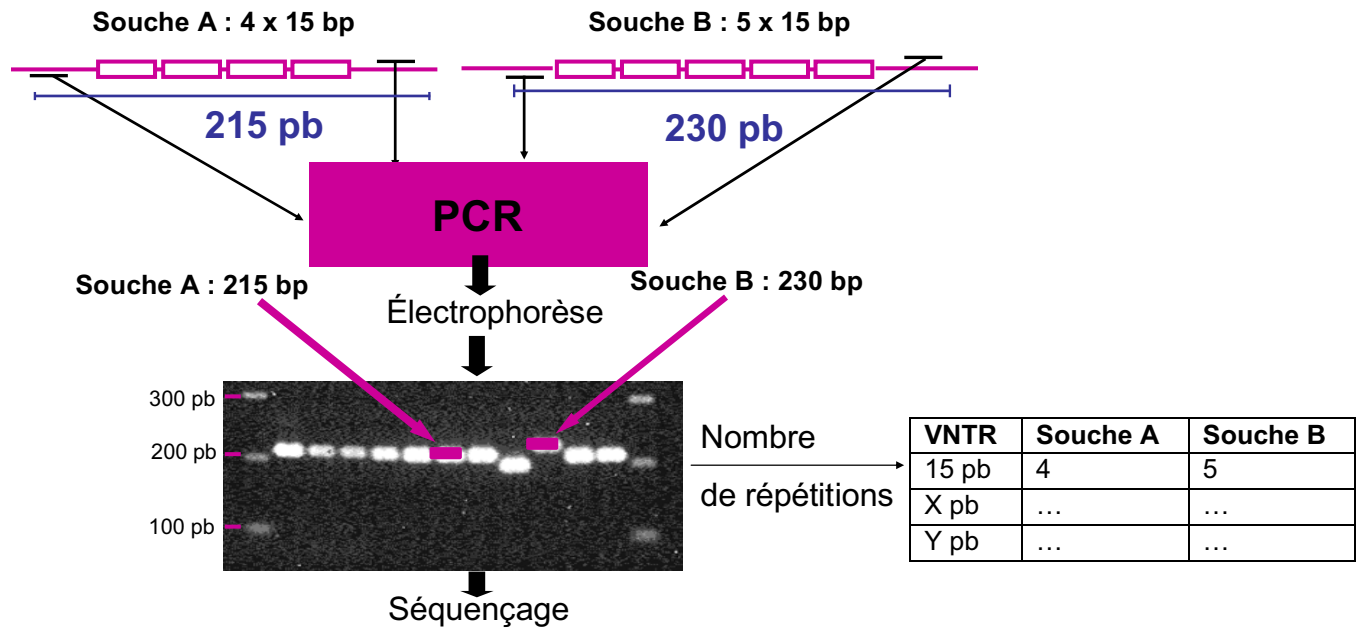


Figure 15. Représentation schématique de la méthode MLVA.

Les amorces (–) sont choisies au niveau des séquences flanquantes du locus VNTR. La taille des produits de PCR est évaluée après électrophorèse (ici sur gel d'agarose) avec un marqueur de poids moléculaire. La taille des amplifiats est convertie en nombre de répétitions. D'autres VNTR sont analysés selon le même principe pour obtenir un profil MLVA pour chaque souche étudiée.

liaison génétique (tests de paternité, criminologie) et de cartographie du génome humain (190). Les répétitions en tandem peuvent être présentes dans des séquences intergéniques et intragéniques. Les conséquences de la variation du nombre de motifs ne sont pas les mêmes selon la position de la répétition.

b) Principe de la MLVA

L'analyse multilocus du nombre d'éléments répétés en tandem ou « Multi Locus VNTR Analysis » (MLVA), étudie plusieurs loci. C'est une technique de typage moléculaire basée sur l'étude du polymorphisme du génome dans sa globalité (504).

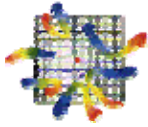
La méthode consiste à amplifier dans une ou plusieurs PCR ces régions répétées à partir d'amorces spécifiques flanquantes. L'analyse de la taille des différents VNTR permet l'assignation d'un profil allélique MLVA (Figure 15).

Le choix des VNTR doit être guidé par leur stabilité, leur grande taille et une homologie des motifs de l'ordre de 80 %.

L'analyse de la taille des fragments peut se faire par migration sur gel, d'agarose ou de polyacrylamide, méthode préférentiellement utilisée pour des marqueurs de grande taille. Lorsqu'il s'agit de microsatellites ou que les produits de PCR sont de petites taille l'analyse des fragments est plus délicate sur gel et elle peut être réalisée sur un système à haute résolution, tel un séquenceur capillaire à multiples colorants fluorescents.

Les critères de définition d'un set idéal de VNTR pour une méthode MLVA ne sont pas formels et vont dépendre de la bactérie étudiée et de son polymorphisme. Un set de VNTR est en général composé d'au moins cinq marqueurs. Parmi eux il faut idéalement des marqueurs très variables (index de diversité élevé) et des marqueurs moins variables ou moins discriminants (index de diversité bas). La résolution de l'analyse MLVA peut être augmentée en ajoutant des VNTR, mais tout dépend de la question épidémiologique posée. L'investigation d'une épidémie locale nécessite des VNTR à fort taux de mutation. Ces VNTR possèdent une horloge évolutive rapide, l'analyse est très discriminante même pour des bactéries dans le génome est très conservée comme *Mycobacterium tuberculosis* ou *Bacillus anthracis* (220).

La MLVA présente de nombreux avantages, comme un pouvoir discriminant élevé, une utilisation facile dans un laboratoire pratiquant la Biologie moléculaire, un coût modéré, une reproductibilité élevée, une facilité d'analyse et de partage des données et la possibilité dans certains cas, notamment grâce à l'utilisation de PCR nichées, d'être réalisée directement sur des prélèvements (133). Concernant les limites de la méthode, la stabilité de certains marqueurs et le nombre de VNTR disponibles sont variables selon l'espèce bactérienne.



The Microorganisms Tandem Repeats Database

Please quote :

1-On-line resources for bacterial micro-evolution studies using MLVA or CRISPR typing. Grissa I, Bouchon P, Pourcel C, Vergnaud G.

[Biochimie. 2008](#) Apr;90(4):660-8.

2-Identification of polymorphic tandem repeats by direct comparison of genome sequence from different bacterial strains: a web-based resource.

Denoeud F, Vergnaud G. [BMC Bioinformatics. 2004](#). Jan 12;5:4.

3-A tandem repeats database for bacterial genomes: application to the genotyping of *Yersinia pestis* and *Bacillus anthracis*. Le Flèche P, Hauck Y,

Onteniente L, Prieur A, Denoeud F, Ramisse V, Sylvestre P, Benson G, Ramisse F, Vergnaud G. [BMC Microbiology. 2001](#). 1:2.

- Access the microbial tandem repeats database main page:
 - [Archaea](#)
 - [Bacteria](#)
 - [Viruses](#)

- Access [The Strain Comparison Page](#)
- Access [the multiple comparison page](#)
- Access [The Published VNTR primers page](#)
- Access the Blast in the tandem repeats database:
 - [The standard Blast page](#)
 - [The PCR primers Blast page](#)
 - [The multiple primers Blast page](#)

- Access [The Bacterial Genotyping Page](#)
- Access Human minisatellites, no update since [Denoeud et al., 2003](#) : [Chromosome 21](#) [Chromosome 22](#)

Figure 16. Page d'accueil de la base de données de répétitions en tandem (site Genomes, Polymorphism and Minisatellites (GPMS), <http://minisatellites.u-psud.fr>).

2. Select a criterion :

L = total length

U = unit length

N = copy number

V = percent matches

Pos = physical position: kb

%GC = percent G+C

B = bias between strands

L	U	N	V	Pos	%GC	B
min :	min :	min :	min :	min :	min :	min :
50	0	0	80	0	0	0
max :	max :	max :	max :	max :	max :	max :
100000	2000	6000	100	62900	100	1

Figure 17. Critères de recherche de répétitions en tandem dans la base de données « Tandem repeats database ».

Mycoplasma genitalium G-37

Characteristics of tandem repeats according to following criteria :

1. Total length between 50 and 100000
2. Unit length between 0 and 2000
3. Percent matches between 80 and 100

Physical position (kb)	Contig name	Unit length	Copy number	Total length	Percent matches	%C	%G	%T	%A	GC bias	Sequence	TR of the family	Name
67	M_genitalium_G37	26	2.0	51	80%	19%	7%	47%	25%	0.46	<u>alignment</u> / <u>linear seq</u>	<u>Group</u>	
92	M_genitalium_G37	24	2.3	55	80%	9%	27%	41%	21%	0.49	<u>alignment</u> / <u>linear seq</u>	<u>Group</u>	
195	M_genitalium_G37	66	2.0	128	88%	12%	16%	22%	48%	0.14	<u>alignment</u> / <u>linear seq</u>	<u>Group</u>	
258	M_genitalium_G37	60	5.9	351	82%	23%	9%	26%	41%	0.43	<u>alignment</u> / <u>linear seq</u>	<u>Group</u>	
390	M_genitalium_G37	105	2.0	206	96%	14%	22%	36%	26%	0.22	<u>alignment</u> / <u>linear seq</u>	<u>Group</u>	
397	M_genitalium_G37	30	1.9	57	92%	12%	28%	35%	24%	0.39	<u>alignment</u> / <u>linear seq</u>	<u>Group</u>	
397	M_genitalium_G37	108	2.1	230	95%	11%	32%	37%	18%	0.48	<u>alignment</u> / <u>linear seq</u>	<u>Group</u>	
429	M_genitalium_G37	3	28.3	84	93%	35%	0%	54%	10%	0.99	<u>alignment</u> / <u>linear seq</u>	<u>Group</u>	

8 sequences correspond to criteria

Figure 18. Exemple des résultats d'une recherche de répétitions en tandem dans la base de données « Tandem repeats database » pour *M. genitalium* G37.

c) Méthode de recherche des répétitions en tandem

→ Logiciel « Tandem Repeats Finder »

Avant la généralisation du séquençage des génomes complets, les premières répétitions en tandem ont été identifiées essentiellement dans les génomes eucaryotes par Southern blot, soit au hasard de recherches de séquences polymorphes du génome humain, soit, par exemple, en utilisant comme sonde une séquence répétée en tandem synthétique (503).

Le séquençage d'un nombre croissant de génomes bactériens a facilité l'identification de ce type de séquences et des outils de recherche de séquences répétées ont été développés. Une base de données d'identification des séquences en tandem a été développée à l'Université Orsay Paris Sud en utilisant le logiciel « Tandem Repeats Finder » (TRF) (30). Ce logiciel permet de détecter des séquences répétées en tandem même lorsque les motifs ne sont pas parfaitement conservés par rapport à la séquence consensus et permet de trouver, toutes les répétitions dans la séquence soumise, ce qui représente un progrès considérable pour la recherche de minisatellites.

La base de données utilise le logiciel TRF pour rechercher des séquences répétées en tandem dans les génomes entièrement séquencés et accessibles à la communauté scientifique. Des requêtes peuvent être réalisées dans des séquences de génomes bactériens, de virus, d'archae et d'eucaryotes. Cette base de données, « The Microorganisms Tandem Repeats Database », est accessible par internet à l'adresse suivante, <http://minisatellites.u-psud.fr> (Figure 16). La base de données développée permet à l'utilisateur de choisir un certain nombre de critères de recherche des séquences répétées (Figure 17). Elle fournit les résultats d'une requête sous forme de tableau avec les caractéristiques détaillées de chaque répétition en tandem (Figure 18).

→ Logiciel Sputnik

Ce logiciel peut être complémentaire permettant surtout d'identifier des microsatellites dans des génomes séquencés. Il est disponible à l'adresse internet suivante : <http://www.cbib.u-bordeaux2.fr/pise/sputnik.html>.

d) Utilisation en Epidémiologie

Les VNTR, dont l'analyse est simple et en général rapide, ont une utilité en tant que marqueurs épidémiologiques. Quelques précautions doivent cependant être observées quant à l'utilisation des répétitions en tandem pour l'Epidémiologie bactérienne (497, 498). D'une part, certaines répétitions ne sont pas neutres du point de vue évolutif, certains allèles peuvent conférer un avantage sélectif à certaines souches. Cela pourrait conduire à des conclusions erronées sur la proximité des souches ayant le même allèle parce qu'elles ont été confrontées au même hôte et non pas parce qu'elles sont génétiquement proches. Cependant, de nombreuses répétitions en tandem « non neutres » sont utilisées de façon efficace en

épidémiologie, comme les répétitions de la coagulase de *Staphylococcus aureus* (430). Par ailleurs, il faut être vigilant quant à la stabilité des marqueurs étudiés et il faut toujours s'assurer de la stabilité des VNTR sélectionnés après plusieurs passages sur quelques souches de la bactérie d'intérêt.

e) Evolution des séquences répétées en tandem

Les séquences répétées ont été observées dans tous les génomes procaryotes. Peu d'études sur les mécanismes d'évolution de ces séquences ont été menées. Les grandes répétitions de ces séquences sont les plus étudiées dans les génomes bactériens, en particulier chez *E. coli* (406). Les VNTR sont des sites hyper-mutables du fait du caractère répété de leurs séquences. Des délétions ou duplications d'éléments répétés surviennent par « dérapage de brin d'ADN » ou « slipped strand mispairing », dû au décalage de lecture de l'ADN polymérase lors de la réplication ou de la réparation de l'ADN (252, 409). Il concerne les répétitions en tandem à courts motifs (jusqu'à 10 pb) et qui sont parfaitement conservées. Ce phénomène sera abordé dans la première publication de ce travail. Ces sites répétés sont fréquemment localisés en amont de gènes de pathogénicité et leurs réarrangements entraînent des modulations d'expression de ces gènes par altération des sites promoteurs ou du cadre de lecture des protéines.

Dans les génomes bactériens sont surtout représentées des répétitions à motifs courts, de type microsatellites, aussi appelés STR. Le phénomène des STR est décrit lors de la réplication et ne fait pas intervenir de cassure double brin comme c'est le cas pour des mécanismes plus complexes concernant surtout la catégorie des minisatellites (motifs de 6 pb et plus). Ces courtes séquences évoluent relativement vite, à une fréquence d'une insertion ou délétion pour 1000 réplications (252). A part ce mécanisme de glissement lors de la réplication, les mécanismes impliqués dans l'expansion et la réduction des répétitions ne peuvent pas être clairement expliqués. Le phénomène STR conduit à l'augmentation ou à la réduction du nombre de copies selon le brin subissant le mésappariement.

Certaines des erreurs de réplication sont corrigées par l'activité de relecture de l'exonucléase et par le système de réparation des mésappariements, mais d'autres échappent à ces réparations et deviennent des mutations.

f) Rôles des répétitions en tandem

Pour un certain nombre de pathogènes, des STR présents en amont ou dans les séquences codantes de protéines de surface, sont polymorphes et permettent l'adaptation de la bactérie aux changements de conditions survenant au cours de l'infection de l'hôte. Ce phénomène est appelé variation de phase (166). Les mécanismes de variation de phase sont multiples. Ils peuvent se produire pour des séquences répétées situées en amont du gène donc dans la partie régulatrice de la transcription, ou bien dans la séquence codante elle-même et, dans ce cas, c'est le produit du gène qui peut être affecté lors de la traduction par un changement du cadre de lecture. La variation de phase peut conduire à une variation antigénique lorsque différents phénotypes de surface peuvent être exprimés. La variation de phase a été observée en particulier chez les bactéries à Gram négatif et concerne

les structures de surface, comme le lipopolysaccharide. Pour *H. influenzae*, colonisant les voies respiratoires et pouvant causer des pneumonies et des méningites, le rôle des répétitions en tandem dans la modulation de la virulence a beaucoup été étudié (517). La variation de phase est un phénomène également largement décrit chez les mycoplasmes, notamment les mycoplasmes animaux. Il existe des variations de taille des protéines de surface générant, entre autre, une diversité antigénique sur leur surface leur permettant d'échapper au système immunitaire (536). Par exemple, l'analyse d'un antigène majeur de surface (MBA) de souches de *U. parvum* sérovar 3 a été réalisée. L'extrémité 3' de ce gène contient un TR de 18 pb, avec 42 répétitions dans la souche de référence. Le séquençage de cette zone chez deux variants montrait des altérations au niveau de ces répétitions, responsables d'une variation de taille de l'antigène (544). Ces phénomènes de variation de phase chez *U. parvum*, médiés par les séquences répétées, ont été récemment décrit sur un autre locus adjacent à MBA (546).

g) Bilan des bactéries pathogènes étudiées par MLVA

→ Bactéries pathogènes humaines

Les répétitions en tandem sont étudiées chez les bactéries depuis plus de 10 ans. Elles ont été validées en tant que marqueurs épidémiologiques pour plusieurs espèces bactériennes.

Les premières illustrations de la méthode MLVA ont été réalisées en 1997 chez *H. influenzae* (499) et en 2000 chez *B. anthracis* (219). Ce dernier exemple est particulièrement intéressant du fait de la faible diversité au sein des souches de *B. anthracis*, espèce récemment impliquée dans le bioterrorisme. Les séquences répétées constituent une source de polymorphisme dans ce génome. De même, l'étude des répétitions en tandem dans le génome de *Yersinia pestis*, une autre espèce ré-émergente a été initiée à cette période (3).

Une des bactéries pathogènes majeures en santé humaine est *M. tuberculosis*. Le typage de répétitions en tandem est apparu comme une alternative potentielle aux techniques courantes. La description des premiers VNTR chez *M. tuberculosis* a été publiée en 1998 (122). Depuis, l'étude des VNTR chez cette espèce a fait l'objet de nombreuses publications et c'est l'espèce bactérienne pour laquelle la MLVA a été le plus utilisée (504). Plusieurs nomenclatures ont été employées pour désigner les répétitions en tandem chez *M. tuberculosis* dont les ETR, « Exact tandem Repeats », et les MIRU, « Mycobacterial Interspersed Repeats Units ».

Pour beaucoup d'autres bactéries pathogènes humaines la technique MLVA a été appliquée, citons *S. aureus* (414), *Pseudomonas aeruginosa* (364), *Y. pestis* (390), *N. meningitidis* (422), *S. pneumoniae* (227) et *L. pneumophila* (133, 391).

→ Mollicutes

Chez les *Mollicutes*, la MLVA n'a été appliquée à ce jour qu'à très peu d'espèces.

MMSC a été le premier mycoplasme pour lequel la technique MLVA a été publiée. Il s'agit d'une espèce de mycoplasme très homogène et peu de méthodes de typage précédemment décrites pouvaient séparer différentes souches. L'analyse du génome de la souche de référence PG1 a identifiée 60 VNTR, cependant, seulement trois étaient polymorphes après analyse sur un panel de souches cliniques. L'analyse de 39 souches d'origine géographique différente a donné 12 génotypes MLVA différents. Cette méthode permettait de séparer les souches africaines des souches européennes (306). Plus récemment, l'analyse d'un seul VNTR (TR 34 localisé sur une lipoprotéine) à partir de 13 souches de MMSC révélait une diversité avec cinq génotypes différents. Il existait certaines corrélations entre le type VNTR et l'origine géographique de la souche (360).

M. mycoides subsp. capri (Mmc) appartient aussi au cluster « *M. Mycoides* » et est responsable de manifestations cliniques variées chez les petits ruminants, principalement les chèvres, sur tous les continents. La MLVA a été également appliquée à cette espèce de mycoplasme à partir de 19 VNTR. Cette méthode objectivait une certaine diversité et toutes les souches isolées chez les bovins étaient regroupées, indépendamment de leur origine géographique (138).

M. agalactiae est une espèce d'une grande importance en médecine vétérinaire. Elle est l'agent de l'agalactie contagieuse, la principale mycoplasmoses européenne chez les ovins et les caprins, avec un impact clinique et économique majeur sur l'industrie du lait. Il s'agit également d'une espèce de mycoplasme homogène. L'analyse du génome de la souche de référence PG2 a permis d'identifier quatre VNTR discriminants. L'analyse de 88 souches d'origine géographique différentes a révélé neuf génotypes MLVA différents. Le pouvoir discriminant était supérieur à celui de la PFGE et de la RAPD. Il existait quelques corrélations entre l'origine géographique et le type MLVA des souches (307). Plus récemment, la MLVA a été appliquée à 12 souches mongoles. Ce travail montrait un set de profils MLVA original, jamais décrit à partir des autres souches de cette espèce, suggérant une diversité des souches mongoles par rapport aux autres souches de *M. agalactiae* typées (139).

Enfin, la MLVA a été appliquée à ***M. pneumoniae*** (77) et ***M. genitalium*** ce qui représente la grande partie des travaux de cette thèse et sera abordée ultérieurement.

1.3 Digestion enzymatique suivant une amplification de l'ADN

1.3.1 PCR avec analyse de polymorphisme de restriction intragénique

Principe

Une première approche de typage moléculaire par la PCR repose sur l'amplification par PCR classique d'un fragment intragénique à l'aide d'une paire d'amorces spécifiques de séquences conservées flanquant une région variable. Le polymorphisme de séquence est dû à la présence ou à l'absence d'un site de restriction au sein de la séquence amplifiée. Ce polymorphisme est révélé par une

digestion enzymatique de l'amplifiat et par migration du produit de la digestion sur gel d'agarose. Il s'agit d'une analyse du profil de restriction du fragment d'ADN amplifié ou PCR-RFLP. Cette méthode requiert une bonne documentation de polymorphisme des séquences d'intérêt et la sélection d'enzyme de restriction adéquates pour sa mise en évidence (111).

Un des avantages de cette méthode est de ne nécessiter que peu d'ADN et de pouvoir être réalisée directement sur un échantillon clinique sans passer par l'isolement en culture des bactéries étudiées. Parmi les limites de la méthode, il faut reconnaître un pouvoir discriminant en général insuffisant lorsqu'un seul locus est analysé.

Applications chez les mycoplasmes

Le gène *pvpA*, codant pour une adhésine putative de *M. gallisepticum*, a été utilisé avec succès pour différencier des isolats en utilisant la PCR-RFLP (41). Les variations de séquence dans ce gène sont dues à des mutations ponctuelles ou à de courtes délétions, toutes deux à l'origine d'une variation de taille des produits de PCR. Huit groupes RFLP ont été déterminés et chacune des trois souches vaccinales était incluses dans un groupe différent. La technique pouvait être réalisée directement sur des prélèvements ce qui est particulièrement intéressant pour cette espèce. Cette technique pourrait être utilisée pour suivre la dissémination de souches vaccinales atténuées. La PCR-RFLP a aussi été utilisée pour analyser des souches de *M. gallisepticum* d'oiseaux sauvages américains. Parmi les 55 souches étudiées, 16 profils ont été déterminés, regroupés en trois groupes RFLP différents. Le pouvoir discriminant était supérieur à celui de la RAPD (385). La PCR-RFLP du gène *mgc2*, spécifique de *M. gallisepticum*, permet de différencier les souches vaccinales, ts11, des autres souches cliniques testées dans une étude israélienne (278).

Chez les souches de **MMSC**, un polymorphisme a été mis en évidence sur le gène *bgl*. Cet outil de typage a révélé deux profils différents. Les souches australiennes et deux souches vaccinales (T1/44 et T1sr) étaient réunies dans un groupe différent de celui des souches africaines. Cependant, cet outil n'était pas suffisamment résolutif pour différencier les 11 souches européennes testées (506).

Chez *M. hyopneumoniae*, un polymorphisme a été mis en évidence dans le gène très variable codant la lipoprotéine P146. L'index de diversité dans une étude récente sur une collection de souches internationales était de 0,98, supérieur à celui de la RAPD (448).

La PCR-RFLP a été utilisée pour différencier des souches de 12 espèces de **mycoplasmes canins** non hémotropes. Elle portait sur l'analyse de l'espace intergénique 16S-23S et générait un profil unique par espèce (445).

Pour les mycoplasmes végétaux, dont les **phytoplasmes**, la PCR-RFLP est une méthode de typage intéressante car ces micro-organismes ne sont pas cultivables. La différenciation des phytoplasmes dépend en grande partie de la PCR-RFLP réalisée sur le gène de l'ARNr 16S. La classification des phytoplasmes du sous-groupe 16Sr a été proposée grâce à cette technique, permettant de déterminer

le sous-groupe 16SrVI (515). Le typage de souches du phytoplasme « Bois noir », à l'origine d'une maladie de la vigne en Europe, a été réalisé avec succès par PCR-RFLP du gène d'une protéine membranaire, 1H10, spécifique du groupe « Stolbur » (367).

Pour les mycoplasmes humains, la PCR-RFLP a largement été utilisée chez *M. pneumoniae*, ce qui sera décrit dans le chapitre consacré aux méthodes de typage de cette espèce. Elle a aussi été appliquée à *M. hominis* pour l'analyse du gène *p75* codant une protéine membranaire de surface. L'analyse de 28 souches avec les enzymes *AluI* et *MboI* révélait, respectivement, cinq et six groupes différents. Ces groupes ne correspondaient pas aux autres méthodes de typage utilisées dans ce travail, à savoir le séquençage des gènes *vaa* et *p120*, indiquant que ces trois gènes variaient par des mécanismes différents (346).

1.3.2 PCR avec analyse de polymorphisme de conformation de l'ADN simple brin (PCR-SSCP)

Principe

La PCR avec analyse de polymorphisme de conformation de l'ADN simple brin ou « PCR-Single Strand Conformation Polymorphism » (PCR-SSCP), est une alternative à la PCR-RFLP. Une alternative à la restriction est l'étude de la mobilité de l'ADN simple brin (357). La PCR-SSCP sépare les différents allèles d'un même gène grâce à la différence de migration de leurs conformations dans un gel non dénaturant. Cette technique permet la détection de mutations mais n'identifie pas la mutation en question.

Applications chez les mycoplasmes

La PCR-SSCP d'une partie du gène *vlhA* d'une lipoprotéine a été réalisée pour 35 souches de *M. synoviae* d'origine géographique différente et a été comparée à l'analyse HRM. L'analyse des amplifiats par PCR-SSCP a révélé 10 profils distincts et l'analyse HRM des mêmes amplifiats était concordante. L'analyse permettait de plus de séparer les souches australiennes des souches nord-américaines (188).

La technique a également été appliquée aux **phytoplasmes**, révélant un intéressant polymorphisme, non détecté par la PCR-RFLP (425).

1.3.3 Amplification sélective de fragments de restriction génomique ou AFLP

Principe

L'amplification sélective de fragments de restriction génomique ou « Amplified-Fragment Length Polymorphism » (AFLP), est une méthode en trois étapes. Premièrement, une hydrolyse de restriction de l'ADN génomique est réalisée, suivie d'une ligation d'adaptateurs (oligonucléotides doubles brins) aux extrémités des fragments de restriction. Enfin, est réalisée une PCR avec différentes amorces complémentaires des adaptateurs et d'un ou plusieurs nucléotides adjacents, suivie

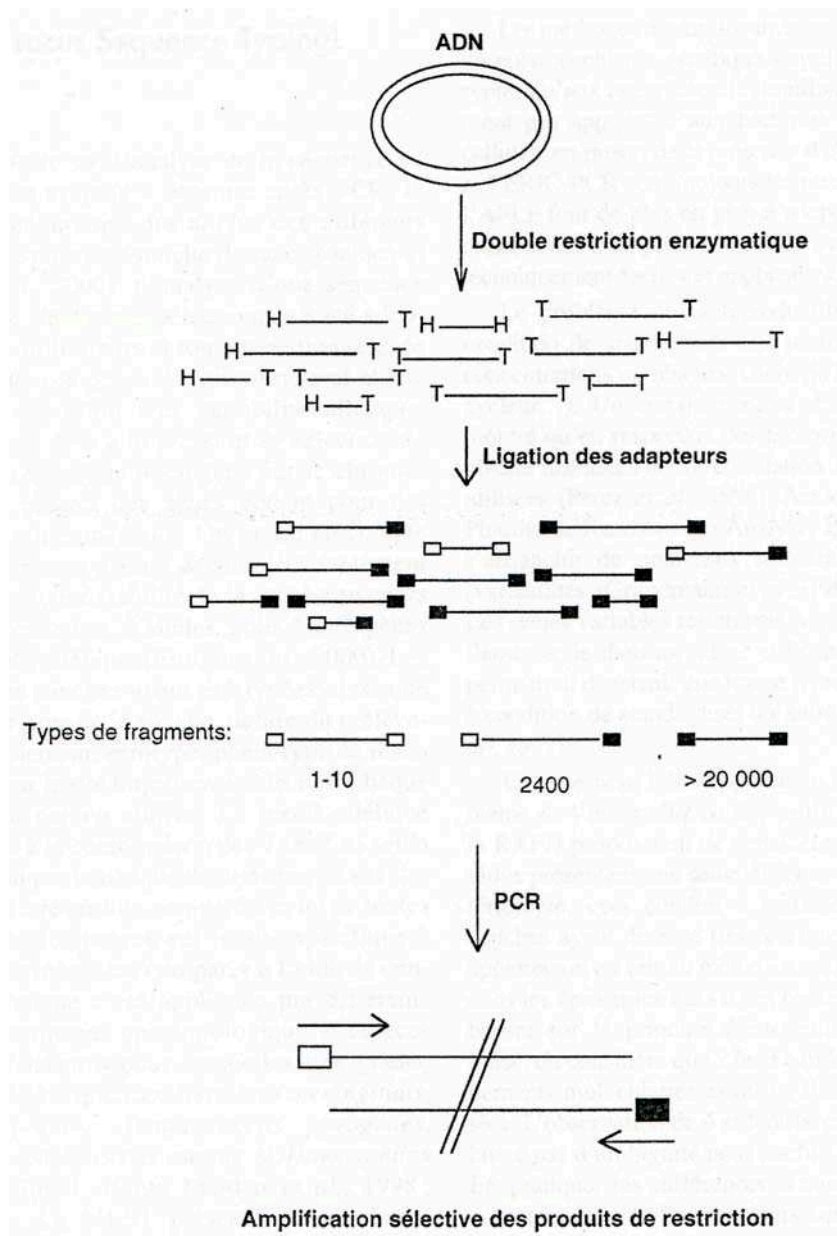


Figure 19. Différentes étapes de l'AFLP (400).

d'une analyse sur gel d'électrophorèse (Figure 19). Selon les amorces utilisées, une amplification sélective des fragments de restriction est réalisée, produisant des profils très lisibles (187, 508).

C'est une technique qui combine l'efficacité de la PCR et la reproductibilité de l'analyse de restriction. C'est une technique rapide permettant d'obtenir des profils en 5 h. Elle présente un très bon pouvoir discriminant et une bonne reproductibilité. En revanche, l'AFLP peut montrer une reproductibilité inter-laboratoires limitée (difficultés d'obtention de profils lisibles). L'analyse de différentes combinaisons d'enzymes et de différentes amorces complémentaires permet un dépistage des variations génomiques sans connaissance préalable de la séquence complète du génome étudié.

Application chez les mycoplasmes

Cette technique a été appliquée à **différentes espèces de mycoplasmes** dont *M. dispar*, *M. flocculare*, *M. hominis*, *M. hyopneumoniae*, *M. synoviae* (229). Deux enzymes, *Bgl*II et *Mfe*I, ont été utilisées pour digérer l'ADN génomique. L'analyse des fragments amplifiés a été réalisée avec un séquenceur automatique qui améliorait la reproductibilité. L'archivage des résultats dans un format électronique les rendait utilisable pour des échanges inter-laboratoires. Dans ces conditions, le génotypage produisait 60 à 80 fragments dont la taille variait entre 50 et 500 pb. La classification obtenue par l'AFLP était exactement corrélée à l'espèce, indiquant que cette technique est utilisable pour l'identification d'espèce chez les mycoplasmes.

Cette même technique a été utilisée pour la variabilité intra-espèce chez plusieurs espèces de mycoplasmes animaux pathogènes, dont ***M. hyosynoviae*** (230), ***M. bovis*** (239) et ***Mccp*** (228). Chez *M. hyosynoviae* 56 profils AFLP différents ont été mis en évidence à partir de 96 souches, même si toutes les souches étaient originaires du Danemark. Il n'y avait pas de corrélation entre le profil AFLP et l'origine géographique ou la virulence de la souche ; plusieurs profils AFLP étaient obtenus à partir de diverses souches d'un même élevage. Ceci pose la question de savoir si la détection d'un seul profil AFLP au sein d'un troupeau est la conséquence d'un petit nombre de souches analysées, et, inversement, si la présence de plusieurs profils AFLP est le résultat d'introductions successives dans le troupeau d'animaux extérieurs. Une autre explication pourrait être un taux élevé d'évolution au sein de cette espèce et la présence de loci hypervariables ou un nombre variable de séquences d'insertion ou « Insertion Sequences » (IS).

Chez ***M. bovis*** il y avait moins de profils AFLP (42 souches, 18 profils) et les souches reliées sur un plan épidémiologique pouvait être regroupée dans le même profil AFLP. Deux isolats originaires de la même aire géographique, à 10 années d'intervalle, avaient un profil identique, indiquant un ancêtre commun et la grande stabilité de ce marqueur épidémiologique pour cette espèce (239). Plus récemment, 192 isolats américains de *M. bovis* ont été analysés par AFLP. Les 192 isolats montraient plus de 100 profils AFLP différents, suggérant un haut niveau de variabilité dans cette espèce. Les isolats étaient divisés en deux groupes principaux, mais l'analyse de ces groupes ne montrait pas de lien avec l'origine géographique et la date de prélèvement (443).

Tableau 19. Comparaison des méthodes de génotypage basées sur l'analyse de fragments (500).

Méthode	Nécessité culture bactérienne	Enzyme de restriction	Nécessité amorces	Fragments d'ADN		Equipement nécessaire
				Taille	Résolution	
PFGE	Oui	SR ^a rares	Non	Longs (> 20 kbp)	EG ^b	Cuve à électrophorèse adaptée
REA	Oui	SR fréquents	Non	Moyens	EG	Cuve à électrophorèse
RAPD	Oui	Non	Arbitraires	Petits (< 5 kpb)	EG ou EC ^c	Thermocycleur
DGGE	Non	Non	Amorces flanquantes	Petits (< 5 kpb)	Gel dénaturant	Thermocycleur, électrophorèse adaptée
HRM	Non	Non	Amorces flanquantes	Petits (< 5 kpb)	Analyse de courbes de fusion	Thermocycleur pour PCR en temps réel
MLVA	Non	Non	Amorces flanquantes	Très petits (< 1 kpb)	EG ou EC	Thermocycleur
PCR-RFLP	Non	SR fréquents	Amorces flanquantes	Petits (< 5 kpb)	EG	Thermocycleur
AFLP	Non	2 enzymes de restriction	Amorces sélectives avec adaptateurs	Très petits (< 1 kpb)	EG ou EC	Thermocycleur

^a SR, sites de restriction, ^b EG, électrophorèse sur gel, ^c EC, électrophorèse capillaire.

Chez **Mccp**, l'analyse de 38 souches révélait 13 profils AFLP différents. Il est important de signaler que huit souches d'une même épidémie arboraient le même profil, confirmant que cette technique est utilisable pour des enquêtes épidémiologiques. Toutes les souches analysées étaient regroupées dans deux clusters principaux, en accord avec les deux lignées suggérées par le séquençage du gène de l'ARNr 16S. Cette congruence est particulièrement intéressante car les deux méthodes n'analysent pas les mêmes régions, les loci AFLP étant distribués tout le long du génome (228). Plus récemment, une analyse de souches africaines a été réalisée. Parmi les 11 souches de Mccp, isolées chez des chèvres de Tanzanie, il existait deux profils AFLP, avec 10 souches montrant un profil identique. Cinq souches du Kenya montraient trois profils AFLP différents, et deux d'entre elles un profil identique à celui des souches de Tanzanie. Pour toutes ces souches africaines, l'analyse AFLP était plus discriminante que la PFGE (240).

Chez **MMSC**, cinq souches caprines ont été analysées avec cette technique, seule une souche avait un profil différent des autres. La souche de référence, PG1, avait un profil différent des souches cliniques (240).

Pour les deux principaux mycoplasmes des volailles, ***M. gallisepticum*** et ***M. synoviae***, l'AFLP a été appliquée (106), avec une bonne reproductibilité de la technique, supérieure à celle de la RAPD et un pouvoir discriminant satisfaisant.

Chez ***M. hyopneumoniae***, l'AFLP a été comparée à la RAPD et la PCR-RFLP à partir de souches isolées dans différents pays. L'AFLP avait le pouvoir discriminant le plus élevé, avec un index de diversité supérieur à 0,99. Cependant aucune des techniques ne montrait de relation entre les profils obtenus et l'origine géographique (448).

Enfin, cette technique a été utilisée chez deux mycoplasmes humains, ***M. genitalium*** et ***M. pneumoniae***, ce qui sera abordé plus loin.

En résumé, chez les mycoplasmes, l'AFLP semble être une technique de typage robuste, générant 60 à 100 fragments, et ayant un pouvoir discriminant supérieur à celui de la PFGE, de la REA et de la RAPD. Un des points faibles de cette méthode est la distribution aléatoire des sites de restriction et leur possible localisation dans des loci hypervariables, réduisant la fiabilité de certains profils (478).

Le Tableau 19 résume les principales caractéristiques techniques des méthodes de génotypage basées sur l'analyse de fragments.

2. Méthodes avec séquençage

L'utilisation croissante de la Biologie moléculaire dans les laboratoires de microbiologie et la disponibilité croissante des séquenceurs ont permis l'essor des méthodes de génotypage basées sur le séquençage, particulièrement chez les *Mollicutes*.

2.1 Séquençage de gène

2.1.1 Séquençage d'un seul gène et analyse du polymorphisme de mutation ponctuelle

Principe

L'amplification par PCR et le séquençage de gènes bien conservés ont été au début des outils pour des analyses phylogénétiques et pour des identifications plus rapides. Le gène le plus étudié était alors celui de l'ARNr 16S, mais, étant très conservé, ce gène est peu utilisable pour des études épidémiologiques. D'autres gènes avec des taux de mutation plus élevés doivent être préférés pour ce type d'étude. Les gènes codant pour des protéines de surface sont de meilleurs candidats, à condition de ne pas être hypervariables.

Le séquençage d'un seul gène détermine des mutations ponctuelles dans la séquence et permet ensuite de comparer les différents profils au sein d'une collection de souches. Le séquençage d'un seul gène permet l'analyse du polymorphisme de mutation ponctuelle ou SNP, sur un gène. Rappelons que les mutations ponctuelles sont de deux types, les mutations par substitutions et les mutations décalantes. Les mutations par substitution peuvent être à l'origine d'une mutation silencieuse, ou entraîner un changement d'acide aminé, ou enfin entraîner l'apparition d'un codon stop, tronquant la protéine synthétisée. Les mutations décalantes correspondent à des insertions ou des délétions. Une addition ou une suppression de nucléotides non multiples de trois provoque un changement du cadre de lecture qui peut également générer une protéine tronquée.

Comme toutes les méthodes avec amplification d'acide nucléique, elle offre l'avantage de pouvoir être réalisée directement à partir des prélèvements cliniques, sans passer par une étape de culture.

Gène de l'ARNr 16S

L'espèce **Mccp** possède deux opérons ribosomiques, *rrnA* et *rrnB*, au sein desquels des variations intra-espèces ont été étonnamment mises en évidence. La séquence des gènes des deux opérons ribosomiques de 13 souches de Mccp, originaires de trois pays africains limitrophes, Kenya, Ethiopie et Tanzanie, a été déterminée. Quatre nouveaux profils ont été mis en évidence. Des polymorphismes de séquence sur l'ADNr 16S ont été également mis en évidence chez des souches ayant acquis une résistance à la streptomycine. Ces résultats montrent que le polymorphisme de l'ADNr 16S chez Mccp peut être utilisé comme marqueur épidémiologique de la pleuropneumonie caprine contagieuse dans une aire géographique restreinte (165).

Gènes de lipoprotéines

M. conjunctivae est l'agent étiologique des kératoconjunctivites infectieuses, infections oculaires très contagieuses, touchant les caprins des Alpes. Le séquençage d'un domaine variable du gène *lppS*, codant une lipoprotéine a été réalisé. Ce domaine montrait des variations entre des souches de *M. conjunctivae*,

mais il restait stable après plusieurs passages en milieu liquide. Cette méthode était discriminante et pouvait être réalisée sur des souches, mais aussi directement sur des prélèvements d'animaux infectés. Ce travail démontrait que les animaux domestiques étaient contaminés par les animaux sauvages paissant à proximité (29).

Chez le mycoplasme humain *M. hominis*, le séquençage du gène *p75*, codant pour une lipoprotéine hypothétique, a été réalisé sur la souche de référence PG21 et sur deux isolats cliniques, et les trois séquences ont été comparées pour déterminer la variabilité intra-espèce. Des SNP ont été mis en évidence tout le long de la séquence, confirmant l'important polymorphisme de ce gène (346)

Autres gènes

Chez *Mccp*, le séquençage du locus « H2 », qui comprend un gène codant pour une protéine membranaire à son extrémité 5' et un gène codant pour une aldolase à son extrémité 3', a été réalisé. Ce travail a été réalisé sur 19 souches d'origine géographique différente. Onze positions polymorphiques étaient déterminées par rapport à la séquence de la souche de référence. Trois principales lignées ont été définies d'après la séquence nucléotidique, ces lignées corrélaient avec l'origine géographique des souches (Afrique du Nord, Centrale et de l'Est). En revanche, des souches originaires d'animaux d'autres pays comme la Turquie ou Oman avaient des profils correspondant à plusieurs lignées différentes, reflétant l'importation fréquente dans ces pays d'animaux vivants de diverses origines géographiques à des fins religieuses (271).

Chez *M. gallisepticum*, le séquençage du gène *pvpA*, codant pour une adhésine, a été réalisé (262, 385). L'étude de Pillai *et al.* montrait un pouvoir discriminant de cette méthode supérieur à celui de la RAPD. Les résultats du séquençage objectivaient une seule source de contamination des oiseaux étudiés, suivie par une diversification à l'origine d'une variabilité du gène *pvpA*.

Chez *M. synoviae*, le séquençage du gène *vlhA* présentait un important pouvoir discriminant, permettant de séparer les souches cliniques de la souche vaccinale Ms-H (159).

Chez les **phytoplasmes**, le séquençage de gènes a été réalisé, comme le gène *amp* sur des souches de « *Candidatus Phytoplasma asteris* » (32), et une partie du gène *tuf*, codant le facteur d'élongation Tu, sur des souches de « *Candidatus Phytoplasma australiense* » (7). Ce travail, réalisé sur 36 souches néo-zélandaises, a révélé neuf variants, regroupés en deux principaux groupes, sans lien avec l'origine géographique ou l'hôte. L'analyse phylogénétique de ces séquences, avec celles de souches australiennes, montrait trois clusters, un comprenant uniquement des souches australiennes, un deuxième avec uniquement des souches néo-zélandaises et un dernier comprenant des souches des deux pays.

Chez *M. hominis*, le séquençage d'une partie du gène *p120'*, codant pour une protéine de surface, a également été réalisé pour évaluer la variabilité génétique de 27 souches tunisiennes. L'analyse de séquences a révélé un total de 25 SNP, distribués sur 23 positions différentes, générant 13 haplotypes. La protéine P120'

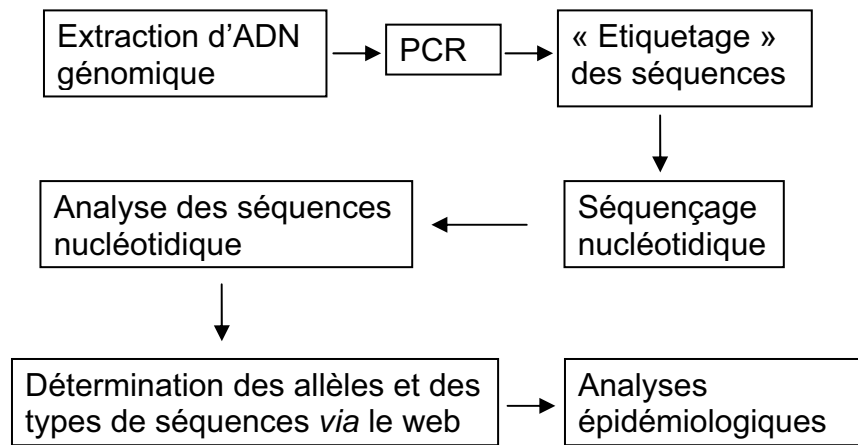


Figure 20. Différentes étapes du typage d'une bactérie par MLST (adapté d'après la référence 63).

montre effectivement un certain niveau de variabilité génétique, nécessitant des analyses supplémentaires pour en préciser les conséquences (298).

Pour *M. genitalium* la recherche de SNP sur une partie du gène *mgpB*, codant pour la principale protéine d'adhésion, a été utilisée comme méthode de génotypage pour cette espèce et sera abordée ultérieurement.

2.1.2 Séquençage de plusieurs gènes

Séquencer un seul gène ne permet pas toujours une différenciation des souches au sein d'une espèce, surtout si l'espèce étudiée est très homogène, d'où l'intérêt de séquençer plusieurs gènes.

a) Typage par séquençage Multilocus ou MLST

Principe

Le typage par séquençage multilocus ou « Multi Locus Sequence Typing » (MLST), est basé sur l'analyse de la séquence de gènes de ménage obtenue après PCR, le principe étant que la combinaison des allèles des différents gènes analysés est unique pour une souche donnée (285, 286). L'analyse d'une séquence interne de 350 à 600 pb de sept gènes sélectionnés a été adoptée par consensus par les utilisateurs et toute mutation relevée dans la séquence d'un de ces gènes définit un nouvel allèle. Le principe méthodologique est illustré sur la Figure 20. Les gènes ont été choisis selon leur variabilité allélique, l'absence de répercussions dues à la pression de sélection du milieu extérieur et surtout selon leur répartition homogène sur le chromosome. Ce sont pour la plupart des gènes codant pour des enzymes du métabolisme intermédiaire. Sont prises en compte des variations génétiques s'étant accumulées lentement, caractérisant une certaine stabilité de la souche dans le temps. Chaque combinaison d'allèles pour les sept gènes séquencés définit un profil allélique ou « Sequence Type » (ST). Les séquences des gènes des souches ayant été typées ainsi que leurs caractéristiques (origine de la souche, nature du prélèvement clinique, date d'isolement, sérotype, phénotype de résistance aux antibiotiques) sont déposées sur plus d'une trentaine de bases de données accessibles par internet, comme par exemple le site « <http://www.mlst.net> ». Chaque allèle est alors identifié par un chiffre. Le profil allélique d'une souche correspond généralement à la combinaison des sept chiffres selon un ordre invariable défini par la banque de données du site. Le profil d'une souche peut être ensuite comparé à celui de toutes les souches ayant déjà été déposées sur le site spécifique à l'espèce étudiée. Cette technique a été appliquée par différents laboratoires pour le marquage épidémiologique d'espèces virulentes et/ou multirésistantes pour lesquelles une grande partie du génome était déjà séquencée, comme *N. meningitidis*, *S. pneumoniae*, *S. pyogenes*, *S. aureus*, *H. influenzae*.

La MLST présente de nombreux avantages, comme le fait de pouvoir être directement réalisée à partir de prélèvements cliniques. Il n'y a aucune variabilité inter-laboratoires des données déposées et l'ensemble des informations concernant des souches isolées de régions voire de pays différents permet de faire un suivi précis et fiable de l'épidémiologie et de la diffusion d'une espèce bactérienne. Par

exemple, il a été montré la faible variabilité génétique de *N. meningitidis* et la responsabilité d'un clone unique dans les micro-épidémies ; on a pu également distinguer les souches invasives responsables de méningites des souches donnant lieu à des portages sains (286).

La MLST n'est cependant utilisable que pour des espèces génétiquement homogènes ou pour celles ayant émergé récemment, comme *B. anthracis*. Elle n'est pas applicable à des espèces à haute fréquence de recombinaison. Enfin, il s'agit d'une méthode relativement lourde en terme de coût et de temps d'analyse.

Application chez les mycoplasmes

La MLST a peu été appliquée aux *Mollicutes*, peut-être à cause de leur trop grande homogénéité rendant difficile l'identification de polymorphisme sur les gènes de ménage.

Chez *M. hyopneumoniae* un schéma MLST a été établi. Les gènes cibles ont été sélectionnés par comparaisons de séquences de génomes. Sept gènes de ménage sur 12 testés ont été sélectionnés. Après analyse de différentes combinaisons, seuls trois gènes ont été retenus, *adk*, *rpoB* et *tpiA*. Ce schéma a été comparé à une méthode de typage basée sur l'analyse du gène *p146*, codant pour une lipoprotéine. Il y avait une cohérence entre les deux méthodes, mais la MLST présentait un pouvoir discriminant supérieur. L'analyse de différentes populations de souches a montré que *M. hyopneumoniae* présentait un taux important de recombinaison et que les souches étaient très diverses, confirmant l'importante hétérogénéité de cette espèce. Il existait aussi une clonalité restreinte avec certaines souches responsables d'épidémies (305).

Chez *M. agalactiae* un schéma MLST a très récemment été proposé, avec le séquençage de huit gènes de ménage. Les premiers résultats étaient congruents avec ceux du schéma MLVA proposé par cette même équipe (308). Un autre schéma MLST a été proposé et appliqué à des souches de *M. agalactiae* issues du bassin méditerranéen, permettant de définir différents types avec un type majoritaire par pays (295).

Pour **MMSC** un séquençage de huit loci polymorphes a été proposé, parmi lesquels seulement un, *ftsY*, correspondait à un gène de ménage. L'analyse de 51 souches a permis de les classer en trois groupes principaux, avec 31 ST différents. L'analyse des clusters a confirmé que les souches européennes isolées depuis les années 90 n'étaient pas originaires d'Afrique, comme cela avait déjà été évoqué. Elle a également montré un lien génétique entre les souches européennes plus anciennes, isolées en 1967, et celles isolées en Afrique du Sud et en Australie, ce qui est en accord avec les données historiques, montrant que la pleuropneumonie contagieuse bovine a été introduite dans ces régions durant la colonisation au 19^{ème} siècle (535).

La MLST a été appliquée au **phytoplasme de la flavescence dorée**, un pathogène de la vigne dans le sud de l'Europe. Deux loci et un gène ont été séquencés sur une collection de phytoplasmes de la flavescence dorée de diverses origines géographiques et isolés dans différentes espèces de plantes. Cette analyse

a permis de regrouper les souches en trois clusters. Un premier cluster, avec une faible variabilité, représente 17 % des souches pathogènes françaises de la vigne. Un deuxième cluster, quasiment clonal, regroupe 87 % des souches pathogènes françaises, ainsi que des souches italiennes. Enfin, un troisième cluster, très variable, comprend uniquement des souches italiennes (10).

Le schéma MLST de *M. pneumoniae* sera abordé ultérieurement.

En résumé, la MLST, avec la MLVA, semble être un des outils de génotypage les plus prometteurs pour les mycoplasmes, complémentaire de la PFGE et de l'AFLP. L'analyse de gènes de ménage est réalisée pour les espèces de mycoplasmes les plus hétérogènes. Pour les espèces plus homogènes, comme MMSC, l'analyse de gènes moins conservés ou de séquences d'ADN non codantes pourrait être proposée (478).

b) Séquençage ciblé de gènes ou GTS

Principe

Le principe du « séquençage ciblé de gènes » ou « Gene-Targeted Sequencing » (GTS), est le même que celui de la MLST sauf que les zones séquencées correspondent à des portions de gènes codant pour des protéines de surface.

Application chez les mycoplasmes

Cette technique n'a été appliquée qu'à une espèce de *Mollicutes*, *M. gallisepticum*. Trois gènes de surface connus ont été partiellement séquencés, *pvpA*, *gapA* et *mgc2*, ainsi qu'une portion d'un gène codant pour une hypothétique lipoprotéine de surface (MGA_0319). Soixante sept souches d'origine géographique différente ont été analysées par GTS permettant d'identifier respectivement sur les gènes *gapA*, MGA_0319, *mgc2* et *pvpA*, 17, 16, 20 et 22 ST. La combinaison des 4 gènes permettait de définir 40 ST. Le pouvoir discriminant de cette méthode était supérieur à celui de la RAPD (109).

2.2 Séquençage d'ADN non codant

2.2.1 ITS 16S-23S

Les espaces de l'ADNr 16S-23S ou « interspacers » ou « Internal Transcribed Spacer » (ITS), séparent les gènes codant pour l'ARNr et contiennent un nombre variable de gènes codant pour les ARN de transfert (ARNt) et de l'ADN non codant. Ces régions sont composées de zones très conservées et de zones hypervariables. La variabilité de séquence de ces ITS entre les souches permet de réaliser du typage épidémiologique. Le séquençage des ITS est surtout utilisé pour l'identification d'espèce au sein d'un genre et moins pour le typage de souches. De plus, il n'est pas applicable à certaines bactéries pour lesquelles les gènes de l'ARNr 16S et 23S ne sont pas contigus.

Le séquençage des ITS 16S-23S a été rarement réalisé chez les différentes espèces de *Mollicutes* dont ***M. hyopneumoniae*** (392) et « ***Candidatus Phytoplasma australiense*** » (7).

Le séquençage de cette zone a été proposé chez ***M. genitalium*** et sera décrit plus loin.

2.2.2 Typage sur les espaces intergéniques

Le typage basé sur les espaces intergéniques ou « Multispace Typing » (MST), est basé sur le polymorphisme des séquences des espaces intergéniques. Il nécessite la connaissance de la séquence du génome de la bactérie à typer. Cette technique a été appliquée à quelques espèces de bactéries pathogènes, dont les bactéries intracellulaires *Rickettsia* (545) et *Bartonella* (255), et *Y. pestis* (90), mais jamais aux *Mollicutes*.

2.3 Séquençage de génomes

2.31 Principe

En ayant accès à l'ensemble du contenu génétique de souches bactériennes, le séquençage de génomes est la méthode ultime de génotypage (373).

Le développement de nouvelles techniques de séquençage permet le séquençage de plusieurs génomes d'une même espèce bactérienne afin de mieux cibler les zones polymorphiques (118). Ces méthodes permettent la recherche de SNP sur l'ensemble du génome bactérien (158).

Ces techniques permettent d'identifier des centaines ou même des milliers de SNP à l'intérieur d'une même espèce bactérienne. Certains SNP sont peu fréquents et très stables chez certaines espèces dont le génome est très conservé. Cette rareté est utile pour identifier des grandes branches ou des positions clé dans la phylogénie d'espèces homogènes comme *B. anthracis* (220).

Pour les études de génotypage à grande échelle, il est nécessaire de recourir à une technologie à haut débit, simple, efficace et qui peut être automatisée. La détection de SNP répond à ces critères. Une technique de regroupement phylogénétique ou « phylotyping » basée sur la détection de 13 SNP a été développée et automatisée pour l'analyse d'isolats de *E. coli* et permet une parfaite classification des groupes et sous-groupes phylogénétiques (172). L'application d'un logiciel identifiant les SNP les plus informatifs dans les bases de données disponibles, comme celles de la MLST, a permis le développement d'une approche de détection de SNP spécifiques pour des pathogènes tels que *N. meningitidis* ou *S. aureus* (401) .

Il s'agit d'une méthode très précise qui donne des résultats de type définitif échangeable entre les laboratoires. Durant ces dernières années ont été développées de nouvelles techniques de séquençage « post-Sanger ». Ces techniques de séquençage en temps réel peuvent être divisées en trois (318). La première est le pyroséquençage (454 sequencing, Roche®), basée sur la détection

des pyrophosphates libérés durant la synthèse de l'ADN, offrant l'avantage d'être peu coûteuse et très rapide (299). Cette nouvelle technologie a été développée pour le typage de bactéries. La deuxième correspond à une technique de séquençage par ligation (SOLiD, Applied Biosystem®). La troisième technique développée (Illumina, SOLEXA®) est basée sur un séquençage massivement parallèle de petits fragments. Ces nouvelles technologies ont été appliquées avec succès pour la détection de SNP.

2.3.2 Application aux espèces bactériennes homogènes

Comme il a été rappelé, ces méthodes de séquençage de génomes sont particulièrement intéressantes pour les bactéries génétiquement homogènes et difficilement typables par les autres techniques. A titre d'exemples, la recherche de SNP sur l'ensemble du génome a été largement utilisée chez *B. anthracis* (399, 501), mais aussi chez *M. tuberculosis* (113, 150) et *S. agalactiae* (47).

2.3.3 Application aux *Mollicutes*

Chez les *Mollicutes*, ces méthodes de recherche de SNP à grande échelle sont en cours de développement et il n'y a pas encore de travaux publiés.

Très récemment une étude a été menée chez *M. hyopneumoniae*. Dix souches isolées aux Etats-Unis ont été séquencées et comparées à la souche de référence. Des SNP tout le long du génome ont été identifiés, particulièrement dans les gènes des lipoprotéines et dans les gènes des protéines de surface impliquées dans l'adhésion (328). Ce polymorphisme pourrait représenter un mécanisme d'échappement à la réponse immunitaire de l'hôte et expliquer en partie la baisse d'efficacité vaccinale constatée ces dernières années.

Une autre étude, récemment présentée, a été menée chez *Mccp* où le séquençage de trois souches de *Mccp* a permis la détection de SNP sur 22 loci polymorphiques. Cette méthode présentait un polymorphisme supérieur à celui de l'analyse du seul locus H2 (296).

3. Méthodes basées sur l'hybridation

3.1 Analyse d'éléments répétés par hybridation ADN / ADN

3.1.1 PCR « ribotyping »

Principe

La technique de Southern blot représentait la première méthode basée sur l'hybridation. Cette méthode comprend deux étapes. La première est une digestion enzymatique standard et la deuxième est le transfert des fragments d'ADN séparés sur une membrane de nylon, suivie d'une hybridation avec une sonde appropriée. Il y peut y avoir différentes combinaisons avec différentes endonucléases et sondes et la combinaison la plus intéressante doit être évaluée pour chaque espèce.

La PCR « ribotyping » est une variation de l'analyse RFLP, utilisant comme sonde les gènes de l'ARNr (397). Le résultat obtenu pour une souche s'appelle ribotype (142). Chez les procaryotes, en règle générale, il existe plusieurs opérons codant pour les ARNr sur le chromosome. Chez les *Mollicutes*, selon les espèces, une ou deux copies de ces gènes sont présentes. Les opérons ribosomiques comprennent une famille de gènes très conservés, chacun des opérons est entouré de régions d'ADN plus variables. Les variations de séquences dans les sites de restriction sont à l'origine des différents profils et la technique permet d'obtenir pour une souche 10 à 15 bandes facilement analysables. Cette technique est reproductible. Les résultats sont faciles à interpréter car peu de fragments sont produits. Des analyses automatisées de ribotypage sont également commercialisées.

Applications chez les mycoplasmes

Chez les mycoplasmes, le « ribotyping » donne des profils avec un faible nombre de bandes, ce qui n'offre pas un pouvoir discriminant élevé (537). Cette technique a donc peu été utilisée.

Chez *M. gallisepticum* après digestion par trois enzymes et utilisation d'une sonde d'ADNr 16S, la technique permettait d'une part de différencier des souches de *M. gallisepticum* entre elles selon leur origine géographique et d'autre part de différencier des souches de *M. gallisepticum* d'autres souches d'espèces de mycoplasmes aviaires (347).

3.1.2 Utilisation de sondes de type séquences d'insertion ou IS

Principe

Une IS est une courte séquence d'ADN correspondant à un élément transposable simple. Les IS ont deux caractéristiques majeures, ce sont des éléments transposables de petite taille et ils codent pour des protéines impliquées dans leur transposition. Ces protéines sont habituellement des transposases qui catalysent la réaction enzymatique permettant la mobilité de l'IS. Certaines IS sont spécifiques d'une espèce bactérienne, comme les séquences IS256 des staphylocoques.

Application chez les mycoplasmes

L'utilisation des IS comme sondes donne des profils avec un nombre plus important de bandes que le « ribotyping », dépendant du nombre de copies d'IS. Le nombre et la répartition des éléments génétiques répétés ont été utilisés pour réaliser le typage de différentes espèces de mycoplasmes.

Pour **MMSC**, le nombre de répétitions d'IS, résultant de l'intégration d'éléments transposables, a permis d'envisager l'utilisation de ces éléments répétés pour le typage. Trois types de séquences IS sont décrites dans le génome de PG1^T : l'ISMmy1 (9 copies), l'IS1296 (28 copies), et l'IS1634 (60 copies). Le génome de MMSC est l'un des génomes possédant le plus d'éléments transposables puisque

ces éléments constituent 29 % du génome. L'ISMmy1 est spécifique de MMSC au sein du cluster « *M. mycoides* », mais on le retrouve également chez *M. bovis*, ce qui suggère la possibilité d'un transfert horizontal de cette IS entre les deux espèces. Toutes les souches testées (15 souches au total) avaient le même profil en Southern blot, excepté les souches PG1^T, Afadé et T1sr qui avaient chacune un profil différent du profil majoritaire (520). Le nombre ainsi que la répétition de l'IS1296 a permis d'obtenir des profils différents pour certaines souches africaines, mais également pour des souches européennes. De plus, des souches de MMSC de petits ruminants européens avaient le même profil que des souches bovines, objectivant qu'une transmission de souches pouvait avoir lieu entre des espèces différentes de ruminants et que le rôle des petits ruminants comme réservoir devait être envisagé (59). L'IS1634 a permis d'obtenir un nombre moins important de profils que l'IS1296 (507). Une copie de cette IS1634 était présente sur le fragment 8,84 kpb spécifique des souches africaines (326).

Chez *M. bovis*, l'analyse de deux IS a été réalisée sur 49 souches. Les profils d'hybridation montraient une variation considérable entre les souches. ISMbov2 était présent entre 2 et 17 copies, et ISMbov3 entre 3 et 14 copies (327).

Chez *M. hyorhinis*, un pathogène respiratoire porcin, l'analyse par Southern blot de l'IS1221 a récemment été présentée. Sur 38 souches analysées, le nombre de copies variait de 15 à 25 par souche. Les souches de la même origine géographique étaient rassemblées dans le même groupe par cette méthode (408).

Chez *M. fermentans*, la comparaison des profils d'IS a été utilisée pour le typage de souches (388), permettant de déterminer des profils différents parmi les 14 souches analysées.

Cependant l'utilisation d'IS peut chez certaines espèces de mycoplasme être impossible ou délicate. C'est le cas de *M. pneumoniae* qui ne possède pas d'IS. Pour certaines espèces, les IS ne sont pas retrouvées dans toutes les souches, impliquant que certaines souches ne puissent pas être typées. ISMag1 n'a été trouvée que dans un nombre limité de souches de *M. agalactiae* (386). De même, l'IS1138 n'a pas été retrouvée dans toutes les souches du pathogène murin, *M. pulmonis* (33).

En résumé, l'analyse d'éléments génétiques répétés par Southern blot peut être très utile pour le typage de souches de mycoplasme. Cependant, son utilisation peut être limitée car des résultats interprétables ne sont obtenus qu'avec des sondes donnant un faible nombre de bandes (10 à 30) dans toutes les souches d'une même espèce. De plus, cette technique est relativement lourde et difficile à standardiser pour une utilisation en routine.

3.2 Hybridation sur puce à ADN

3.2.1 Principe

La puce à ADN ou « DNA array », permet de détecter des mutations ponctuelles. Les sondes oligonucléotidiques sont synthétisées *in situ*, par une technique alliant synthèse chimique sur support solide et photolithographie. Le support, par exemple une surface de verre d'environ 1 cm², constitue l'unité

d'hybridation, chaque unité peut contenir un nombre élevé de sondes oligonucléotidiques uniques (jusqu'à 400 000), autorisant le traitement de plusieurs marqueurs en parallèle. Pour chaque marqueur, toutes les possibilités de séquence sont représentées sur la puce. La positivité est détectée par l'intensité de la fluorescence, proportionnelle au degré d'hybridation entre la sonde et la séquence cible, et chaque sonde est identifiée d'après sa position sur la puce.

L'introduction de ce type de technologie à haute densité est très intéressante pour scanner rapidement la diversité génétique d'un pathogène car elle détecte simultanément plusieurs centaines de gènes. Par exemple, une puce ADN adaptée au typage par MLST de *S. aureus* montre des résultats reproductibles, échangeables entre laboratoires et complètement concordants avec l'analyse MLST conventionnelle (333).

Un « DNA array » permet de tester l'ADN génomique et d'étudier sa capacité à s'hybrider à des centaines ou des dizaines de milliers de fragments d'ADN ou d'oligonucléotides (spots) fixés sur un substrat. Les substrats peuvent être des membranes, du verre ou du plastique. Un « DNA array » est un outil très puissant pour étudier le transcriptome ainsi que la variété génétique d'une bactérie. Il existe deux classes d'arrays, macroarrays et microarrays, qui diffèrent selon la taille et le nombre de spots utilisés sur le support. Les macroarrays sont en général réalisés sur des membranes de nylon et contiennent plus de 5000 spots. Les microarrays sont plus denses, avec plus de 1 000 000 de spots par array. Seuls les microarrays ont été appliqués aux *Mollicutes* et seront détaillés. En revanche, ces techniques présentent l'inconvénient d'être très coûteuses.

3.2.2 Microarrays

Les microarrays sont des surfaces spécialement traitées qui portent des mosaïques de séquences représentant la plupart des gènes du génome de l'organisme. Depuis son premier développement en 1995, la technique du microarray est devenue rapidement un outil pour investiguer le transcriptome bactérien et la diversité génétique. A la différence du Southern blot, où un nombre limité de sondes est transféré sur la membrane de nitrocellulose, un microarray inclut un très grand nombre de sondes et constitue une méthode de génotypage très efficace. Le design des sondes dans un microarray est basé sur la séquence ADN de la souche de référence, incluant les polymorphismes précédemment déterminés par d'autres méthodes de génotypage. La comparaison de multiples génomes d'une espèce bactérienne donnée révèle de nombreux « gènes accessoires » (476), parmi lesquels certains peuvent être absents dans le génome de référence. Ainsi, un microarray peut sous-estimer la diversité génétique au sein d'une population bactérienne.

Il existe deux catégories de microarrays, les microarrays d'ADN complémentaire (ADNc) et les microarrays d'oligonucléotides, qui diffèrent selon la taille de la sonde utilisée.

a) Microarrays d'ADNc

Principe

Un microarray d'ADNc utilise l'ADNc comme sonde et il est souvent réalisé pour identifier la présence ou l'absence de gènes dans une méthode appelée hybridation génomique comparative. Les sondes sont des gènes complets amplifiés par PCR ou issus de bibliothèques d'ADNc. Un microarray de tout le génome est un outil puissant pour investiguer les variations au niveau génomique. De plus, les microarrays d'ADNc sont utiles pour identifier les gènes associés aux sérotypes, à la virulence et à la résistance aux antibiotiques.

Applications chez les mycoplasmes

Des techniques de microarray ont été appliquées aux mycoplasmes, mais davantage pour des analyses de transcriptome que pour de l'épidémiologie moléculaire.

Par exemple, chez *M. hyopneumoniae*, un premier travail analysait le transcriptome à différentes températures de culture pour déterminer la capacité d'adaptation de cette bactérie chez l'animal infecté (282). Dans une autre étude, le microarray servait à rechercher une lipoprotéine hautement immunogène, spécifique des souches non vaccinales, afin de détecter les porcs malades y compris dans des élevages de porcs vaccinés (319).

b) Microarrays d'oligonucléotides

Principe

Un microarray d'oligonucléotides utilise de courts oligonucléotides comme sondes et il est fréquemment réalisé pour identifier des SNP ou de courtes délétions. La sonde est courte de 30 à 70 nucléotides. Ces techniques très précises permettent aussi de « reséquencer » des génomes entiers. Des microarrays d'oligonucléotides spécifiques de certain loci peuvent également être réalisés. Ceci peut être intéressant pour sérotyper certaines bactéries comme *E. coli* avec les antigènes O et H. Cette méthode de microarray est plus discriminante que celle par ADNc.

Applications chez les Mollicutes

Une technique de microarray d'oligonucléotides a été appliquée pour détecter et génotyper des *Mollicutes* sur la séquence de l'ITS. Les résultats ont été comparés à ceux de la PCR-RFLP. Cet essai permettait, grâce à des sondes spécifiques de genre et d'espèce, de détecter 23 espèces, incluant un acholéplasme, 21 mycoplasmes, dont *M. penetrans* et *M. spermatophilum* non détectés par PCR-RFLP, et un uréaplasme (185).

A ce jour, la recherche de SNP par ce type de méthode n'a pas été à notre connaissance réalisée chez les *Mollicutes*.

4. En résumé

Pour les différentes espèces de mollicutes, jusqu'à présent deux méthodes génotypiques ont été le plus utilisées. Ce sont la PGFE et l'AFLP, permettant une étude de l'ensemble du génome avec une reproductibilité supérieure à celle de la RAPD (478). Mais de nouveaux outils d'épidémiologie moléculaire vont émerger remplaçant progressivement les deux précédemment cités, ce sont la MLST, combinant les avantages de la comparaison de séquences avec la possibilité de choisir des cibles à différents niveaux de polymorphisme, la MLVA, pouvant être automatisée et permettant de s'affranchir d'une étape fastidieuse de séquençage, et la recherche de SNP, pouvant être déterminés par le séquençage de plusieurs génomes et par les techniques de microarrays.

C. Analyse et interprétation des résultats obtenus par les marqueurs génotypiques

1. Les profils électrophorétiques

1.1 Analyse visuelle

L'analyse des profils électrophorétiques tels que ribotype, pulsotype (PFGE), AFLP, RAPD, doit permettre de classer ces profils en types clonaux et de comparer le degré de parenté parmi les isolats au sein et entre ces types clonaux.

Dans le cas d'enquête épidémique se limitant à une trentaine d'isolats, une comparaison visuelle à partir d'un gel est suffisante. Lorsque les profils sont identiques, les isolats sont considérés de même type et la probabilité de clonalité est proportionnelle au pouvoir discriminant de la méthode et à la rareté de ce type dans la population considérée. Lorsque les profils sont proches, l'interprétation est plus difficile. Pour le pulsotype, les critères de classification proposés par Tenover ont été rappelés plus haut.

Pour d'autres méthodes telles que ribotype et RAPD, il n'existe pas de règle générale d'interprétation et les discordances d'un seul fragment entre deux profils sont fréquemment jugées suffisantes pour un classement des souches en types distincts. Ces critères demeurent souvent arbitraires et subjectifs, de telle sorte que les mêmes résultats peuvent être interprétés différemment par différents observateurs.

1.2 Analyse sur ordinateur

1.2.1 Principe

Lorsque le nombre de profils à analyser est grand, notamment lorsque le typage est répété pour un programme de surveillance épidémiologique, une analyse objective et quantitative est nécessaire. Celle-ci requiert l'aide d'un ordinateur. Il existe une diversité d'équipements et de logiciels commercialisés pour cette application.

Les étapes de l'analyse des profils de typage moléculaire de type électrophorétique sont les suivantes : digitalisation de l'image, normalisation des profils, comparaison des profils, agrégation des profils et présentation arborée.

La comparaison des profils d'empreintes moléculaires électrophorétiques utilise deux types de coefficient de similitude. Le coefficient de Pearson compare deux à deux la forme et l'aire sous la courbe de densité de gris de toute la piste. Ce type de coefficient est surtout utilisé pour les électrophorèses de protéines. Le coefficient de Dice compare les profils en scorant le nombre de fragments communs multipliés par deux et divisés par le nombre total de fragments dans les deux profils.

1.2.2 Dendrogrammes

La base de données fournit, après comparaison deux à deux de tous les profils par l'un ou l'autre des coefficients de similitude, une matrice de ces similitudes ou distance. Différents algorithmes sont disponibles selon le logiciel pour construire une représentation graphique de ces matrices sous forme de dendrogramme. La méthode de groupement par la distance moyenne ou UPGMA (« Unweighted Pair Group Method using Arithmetic averages ») est la plus courante et fournit l'image la plus fidèle de la matrice de distance.

D'autres méthodes d'agrégation comprennent la méthode de Ward, qui regroupe les profils en minimisant l'augmentation des variances intra-groupes et tend à surestimer la similitude entre profils éloignés. La méthode Neighbor-joining, habituellement utilisée en phylogénie, minimise la longueur totale des branches dont la partie horizontale mesure la distance entre les individus.

Les dendrogrammes sont très utiles pour reconnaître les groupes de profils similaires ou identiques. Il faut cependant éviter d'en déduire une signification phylogénétique, celle-ci nécessitant la mesure de distances dérivées de marqueurs indépendants, ce qui n'est pas le cas des profils de restriction.

2. Les séquences d'ADN

2.1 Comparaison des séquences d'ADN

La méthode la plus couramment utilisée pour comparer des séquences d'ADN consiste à les aligner et à calculer le pourcentage de similitude (ou de discordance) entre ces séquences. Celui-ci correspond au nombre de nucléotides identiques (ou différents) présents dans les séquences alignées divisé par le nombre total de positions correspondant à l'autre séquence.

Plusieurs logiciels sont utilisés pour l'analyse des séquences d'ADN et sont de différents types :

- des logiciels d'alignement de séquences comme les logiciels BLAST (National Center for Biotechnology Information), MultAlign (CRBG Zurich, Suisse)
- des logiciels multi-fonctions comme BioNumerics (Applied Maths) et ClustalX qui permettent l'alignement de séquences et la construction de dendrogrammes de similitude

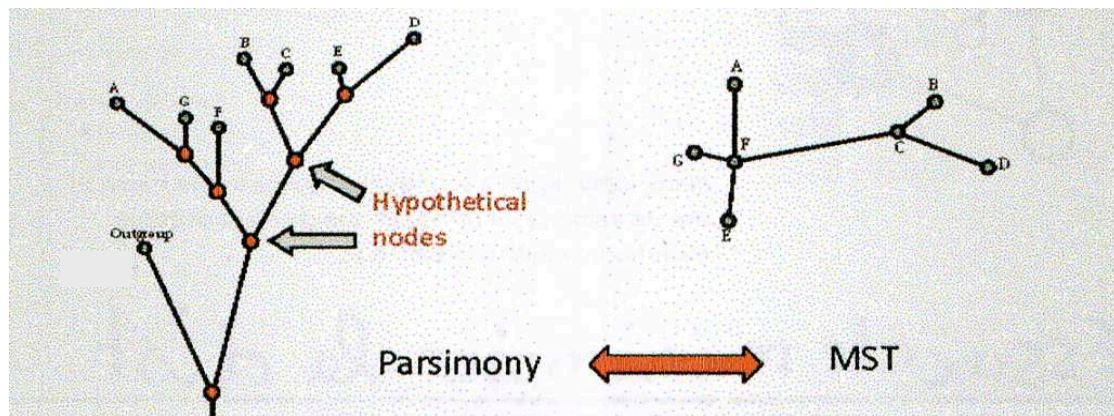


Figure 21. Exemples de représentation d'arbre selon un maximum de parcimonie ou un Minimal Spanning Tree (d'après le « Workshop Notes », International Training Workshop on BioNumerics, Applied Maths).

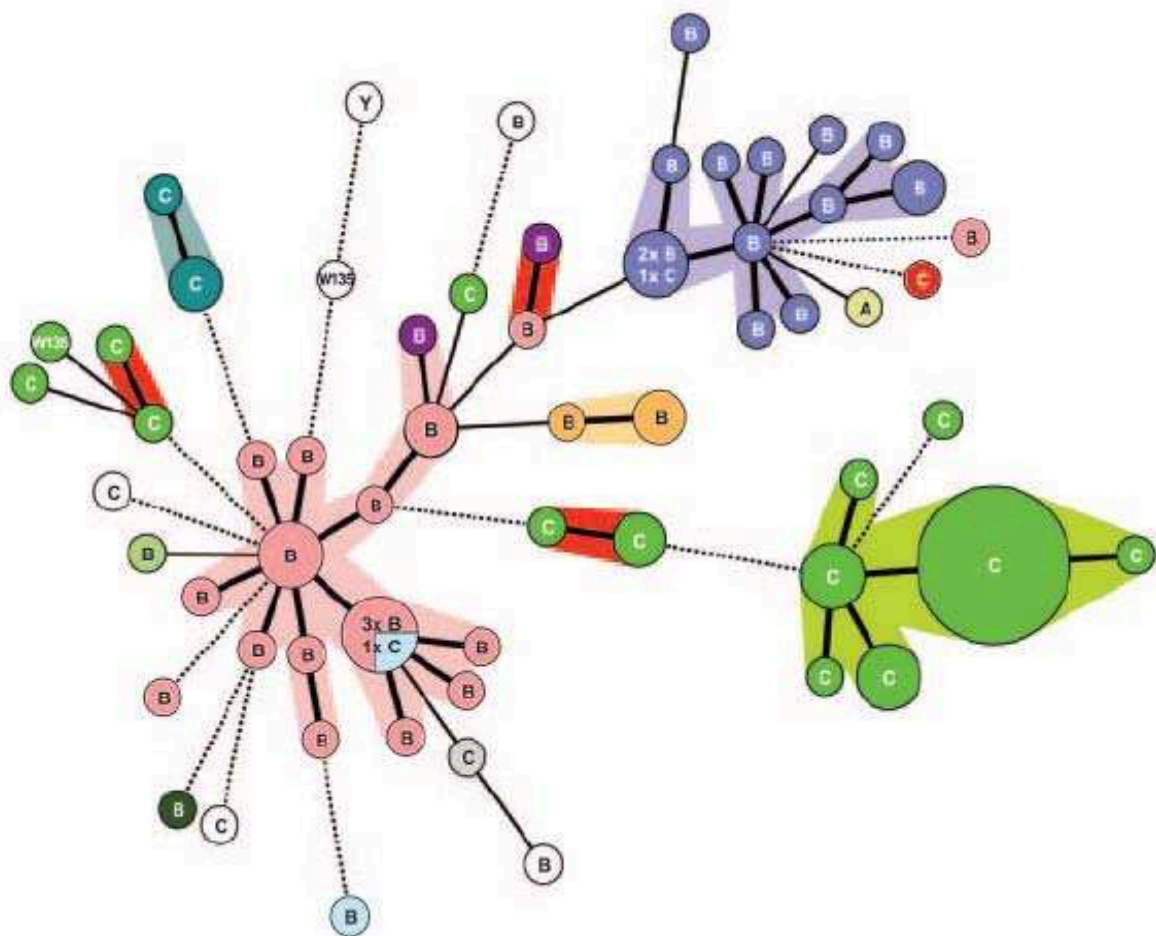


Figure 22. Minimal Spanning Tree à partir des résultats de MLVA de 85 souches allemandes et sept souches de référence de *N. meningitidis* (422).

Chaque cercle représente un génotype MLVA et la taille du cercle est proportionnelle au nombre de souches. Les traits gras représentent les connexions entre les variants sur un seul locus (SLV), les traits fins, les variants sur deux loci (DLV), et les traits en pointillé relient les génotypes MLVA qui diffèrent sur plus de deux loci. Les lettres dans les cercles représentent le séro groupe des souches pour chaque génotype MLVA. Les couleurs des cercles indiquent les complexes clonaux MLST assignés sur le site MLST (<http://pubmlst.org/neisseria>). Les cercles blancs représentent les types de séquence pour lesquels aucun complexe clonal n'a été assigné sur le site MLST. Les halos entourant les différents génotypes MLVA représentent le regroupement de souches réalisés par l'analyse BioNumerics. Les génotypes regroupés par BioNumerics présentent des différences sur un seul des huit VNTR analysés.

- des logiciels appropriés pour une analyse particulière, comme pour la MLST, où la séquence consensus des gènes d'intérêt est comparée via internet ce qui permet d'attribuer un type MLST ou ST et de soumettre de nouveaux ST pour une inclusion dans la base de données.

2.2 Représentations : maximum de parcimonie, arbre minimal couvrant (MST), eBURST

Les approches basées sur une distance utilisent une mesure de distance ou de similarité afin de regrouper des séquences proches. Il existe des approches axées sur les caractères qui cherchent le meilleur arbre possible dans une topologie d'arbre étant donné un critère d'optimalité. Les critères les plus largement utilisés sont le maximum de parcimonie ou « maximum Parsimony » et l'arbre couvrant minimal ou « Minimal Spanning Tree » (MST), pour lesquels on considère que le meilleur arbre est celui qui requiert le minimum de changements. Il existe des différences majeures entre les deux. Le maximum de parcimonie autorise l'introduction d'échantillons hypothétiques permettant de construire les branches internes de l'arbre tandis que les échantillons réels de la série de données occupent l'extrémité de la branche (Figure 21). Le MST, au contraire, requiert la présence de tous les échantillons dans la série de données pour construire l'arbre complet (Figure 22). Ce qui veut dire que lorsque le MST est utilisé dans les études d'évolution, il doit répondre à deux conditions. Premièrement, l'étude doit focaliser sur une petite durée de temps, assumant que toutes les formes ou états sont présents. Deuxièmement, il faut que la série de données échantillonnées soit assez complète pour permettre la construction d'un arbre correct.

Les arbres générés par ces deux méthodes sont différents. La méthode parcimonie suppose que deux échantillons ont évolué à partir d'un ancêtre commun ce qui donne un arbre dichotomique. En revanche, le MST choisit comme nœud-racine l'échantillon qui a le plus grand nombre d'échantillons liés et déduit les autres à partir de ce nœud. Cela a comme résultat un arbre en forme d'étoile. Chaque cercle correspond à un génotype. La taille du cercle est proportionnelle au nombre de souches de chaque type. La différence allélique entre deux génotypes voisins est généralement exprimée par un chiffre sur le trait reliant ces deux groupes. La distance entre chaque cercle est donc proportionnelle au nombre d'allèles qui diffèrent (Figure 22). Le MST permet une classification correcte des systèmes de population qui ont des taux de mutation ou de recombinaison élevés, c'est-à-dire qui comprennent un grand nombre de variants à un seul locus ou « Single Locus Variant » (SLV), qui ont évolué à partir d'un type commun. Une des applications typiques du MST est l'analyse des données de MLST et de MLVA.

Les techniques d'agrégation classiques, comme les dendrogrammes, procurent une mauvaise représentation des événements récents d'évolution. Une approche mieux adaptée, notamment pour les données de MLST, est l'algorithme BURST, « Based Upon Related Sequence Types », qui examine les relations entre génotypes très proches ou complexes clonaux. Les liens existant entre les différents génotypes au sein d'un complexe clonal peuvent être représentés de deux manières :

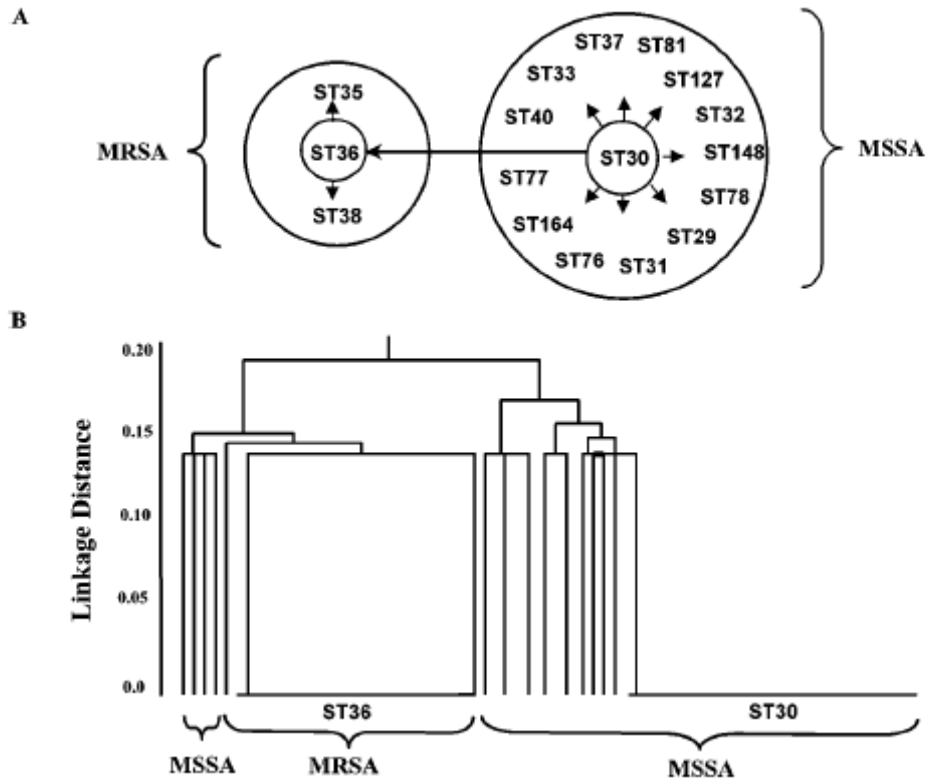


Figure 23. Représentation de complexes clonaux de souches de *S. aureus* typées par MLST (108).

A, Représentation des relations entre génotypes par l'algorithme BURST.

B, Analyse de clusters par UPGMA.

ST, « sequence type », MRSA, *S. aureus* résistant à la méthicilline, MSSA, *S. aureus* sensible à la méthicilline.

La représentation « BURST » soutend l'hypothèse que le clone MRSA ST36 a évolué à partir du clone MSSA ST30 et s'est lui-même diversifié en ST35 et 38. Alors que la représentation « UPGMA » est moins informative sur le plan phylogénétique et groupe 4 ST MSSA au sein des ST MRSA.

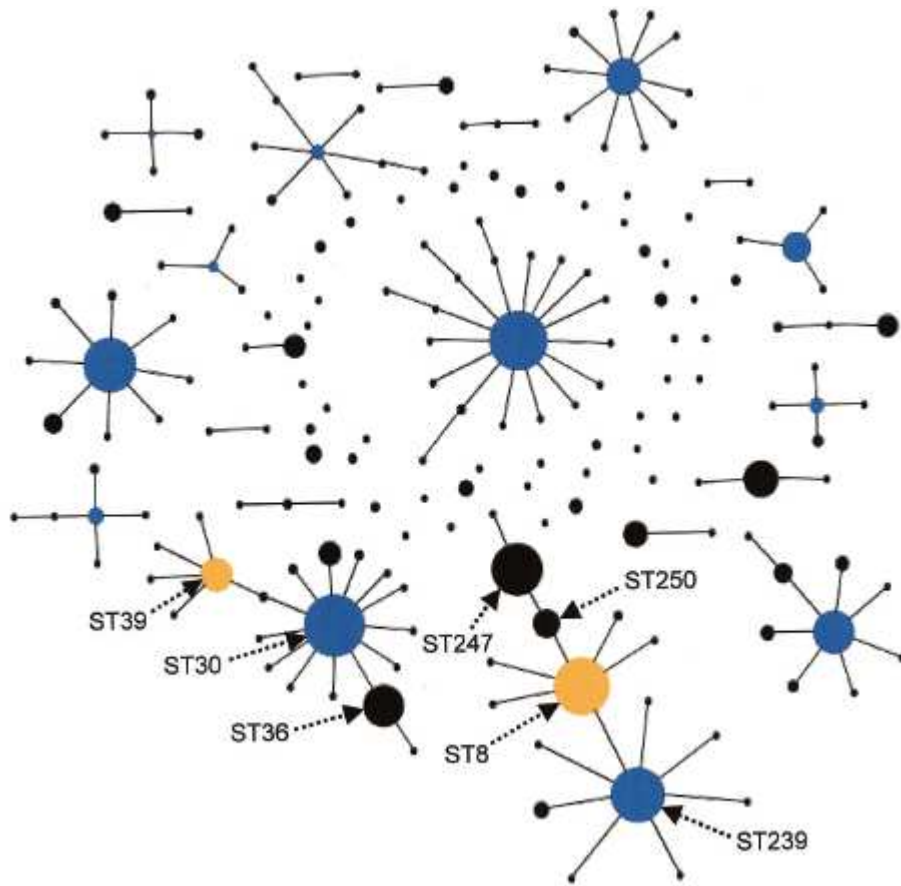


Figure 24. Représentation selon un diagramme eBURST d'une population de souches de *S. aureus* typée par MLST (107).

Les clusters de souches reliées entre elles correspondent à des complexes clonaux. Les souches « ancestrales » sont positionnées au centre et représentées en bleu, et les souches dérivées, « single locus variant », sont représentées en jaune. Seuls quelques types de séquences (ST) sont signalés sur cette figure.

- une première version de BURST positionnait le complexe clonal par une succession de cercles concentriques où le génotype ancestral occupait le centre et les autres cercles englobaient tous les variants clonaux (Figure 23),

- une version récente et plus conservatrice, le eBURST, montre le lien radial existant entre le génotype ancestral et chacun des SLV. Chaque génotype est représenté par un cercle dont la surface est proportionnelle à leur fréquence. Le génotype ancestral indiqué en bleu est relié par un trait à chaque SLV représenté en jaune. L'avantage de ce nouvel algorithme est de diviser des grandes bases de données MLST en groupes de génotypes ou de complexes clonaux proches qui ne se chevauchent pas (Figure 24).

3. Logiciel BioNumerics

Le logiciel BioNumerics (Applied-Maths, Belgique) permet d'analyser différents types de données de typage ou de caractérisation génétique des pathogènes (séquences, profils de bandes, données biochimiques, spoligotyping, matrices de distances...). Parmi ses très nombreuses applications, ce logiciel permet la création de dendrogrammes ou de MST et le calcul rapide de l'index de diversité d'un marqueur.

D. Critères de performance des marqueurs

Un système de typage adéquat pour les applications épidémiologiques doit répondre à un certain nombre de critères.

1. Typabilité

La typabilité, ou capacité de typage, est la proportion des souches au sein d'une espèce qui produisent un résultat interprétable et sont ainsi classées dans un type par les marqueurs utilisés. Idéalement, toutes les souches d'un échantillon devraient être typées. La typabilité est habituellement complète par les méthodes de typage génotypique.

2. Reproductibilité

C'est la capacité d'une technique de classer dans le même type une même souche testée de façon répétée. En pratique, elle doit être supérieure à 95 %.

3. Stabilité

C'est la conservation biologique des marqueurs utilisés pour définir le type, durant la réplication et la conservation bactérienne *in vitro*, la réplication et la persistance chez l'hôte ou dans l'environnement. L'apparition de variations des marqueurs suite à la micro-évolution subclonale n'est qu'un obstacle relatif pour autant que la quantification des divergences permette de distinguer des isolats d'origine indépendante. La connaissance de la structure génétique de l'espèce à typer et de sa plasticité génomique doit être prise en considération lorsqu'elle est connue.

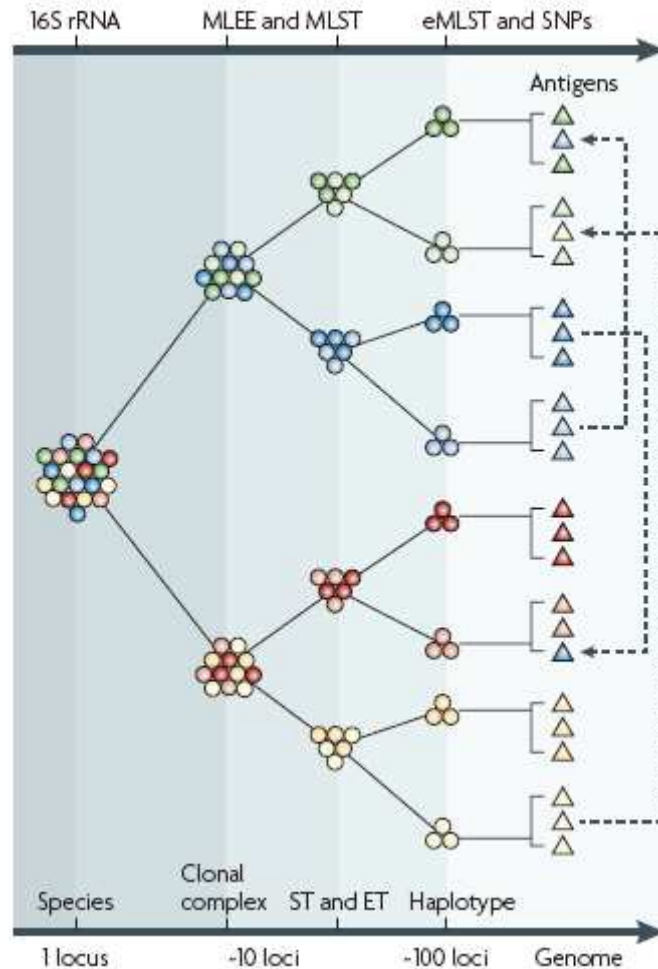


Figure 25. Marqueurs génétiques et leur pouvoir discriminant au sein d'une espèce bactérienne (318).

Représentation schématique des différents niveaux de résolution au sein d'une espèce bactérienne par diverses méthodes de génotypage. Le séquençage de l'ADNr 16S est la méthode de référence pour différencier des espèces au sein d'un genre bactérien, mais basée sur l'analyse d'un seul gène, cette méthode manque de pouvoir discriminant pour différencier des bactéries au sein d'une espèce. Les méthodes basées sur l'analyse d'une dizaine de loci répartis sur l'ensemble du génome bactérien, comme la méthode phénotypique MLEE (« Multi-Locus Enzyme Electrophoresis ») ou le MLST, permettent une résolution intra-espèce plus fine en définissant des types électrophorétiques (« ET ») et des types de séquences (« ST »), elles définissent aussi des « clusters » de types regroupés en complexes clonaux (« clonal complex »). Par l'analyse des SNP sur une centaine de loci ou par des MLST étendues (« eMLST »), analysant d'autres gènes que les gènes de ménage, il est possible d'augmenter la résolution du typage en définissant des haplotypes au sein de l'espèce. Enfin, différents gènes codant pour des antigènes protéiques ont des distributions alléliques ne corrélant pas avec les classifications MLST et seulement les séquençages complets de génomes seront capables de détecter toutes les variations génétiques non clonales qui contribuent à la structure fine d'une population bactérienne.

Tableau 20. Comparaison des performances des principales méthodes de génotypage (adapté d'après la référence 500).

Méthode	Typabilité	Reproductibilité	Pouvoir discriminant	Lisibilité	Coût
PFGE	Excellente	Excellente	Excellent	Bonne	Elevé
REA	Excellente	Variable	Variable	Passable	Modéré
RAPD	Bonne	Passable	Bon	Passable	Modéré
MLVA	Excellente	Excellente	Excellent	Excellente	Modéré
PCR-RFLP	Bonne	Bonne	Variable	Bonne	Modéré
Ribotyping	Excellente	Excellente	Variable	Bonne	Modéré
AFLP	Excellente	Bonne	Excellent	Passable	Elevé
SNP	Excellente	Excellente	Excellent	Excellente	Elevé
MLST	Excellente	Excellente	Bon à excellent	Excellente	Elevé
Puce ADN	Excellente	Excellente	Bon à excellent	Excellente	Très élevé

4. Pouvoir discriminant

Le pouvoir discriminant d'un marqueur traduit le fait que ce marqueur est capable de différencier des souches *a priori* non liées épidémiologiquement. Il peut être apprécié par l'index de discrimination ou de diversité, proposé par Hunter et Gaston (178), qui définit la probabilité qu'ont deux souches non reliées d'être placées dans deux types distincts. En pratique, un système, ou une combinaison de système (MLVA), est valable s'il offre un pouvoir discriminant supérieur à 95 %, ce qui correspond à un index de diversité entre 0,95 et 1. Ce niveau correspond à un risque acceptable de 5 % d'erreur de type I, c'est-à-dire de probabilité de classement incorrect d'isolats non liés épidémiologiquement dans le même type. La Figure 25 représente le pouvoir discriminant des principales méthodes de génotypage décrites dans ce chapitre. De façon générale, les méthodes de génotypage ne doivent pas être uniquement discriminantes, mais elles doivent aussi être informatives et reproductibles.

5. Concordance épidémiologique

C'est la probabilité moyenne de classer dans le même type, les isolats provenant d'une épidémie monoclonale. Cette probabilité peut être estimée par l'analyse en aveugle de plusieurs séries de souches provenant d'épidémies bien documentées par des enquêtes épidémiologiques. La concordance épidémiologique dépend, d'une part, de la stabilité des marqueurs au sein d'une population humaine infectée et des vecteurs de transmission, et d'autre part de l'adéquation des critères d'interprétation de différences mineures utilisées pour définir le type clonal. En fait, ce type d'évaluation rétrospective est le meilleur moyen empirique pour calibrer la définition des types à l'aide d'une nouvelle méthode de typage avant son application ultérieure aux enquêtes épidémiques.

6. Choix et validation des marqueurs

D'une manière générale, aucun système de typage n'offre de performance idéale. Il est habituellement souhaitable de combiner deux voire trois systèmes utilisant des marqueurs indépendants pour obtenir une classification clonale fiable. Pour l'enquête épidémique, la rapidité à produire des résultats est souvent importante. La simplicité de la technique et la facilité d'interprétation des résultats doivent être pris en considération, de même que les coûts d'équipement et de réactifs.

E. Comparaison des performances des méthodes de génotypage

Les comparaisons des performances des différentes méthodes de génotypage sont représentées sur le Tableau 20. La Figure 26 replace au sein du génome les méthodes de typage basées sur l'analyse d'un gène et celles basées sur l'ensemble du chromosome.

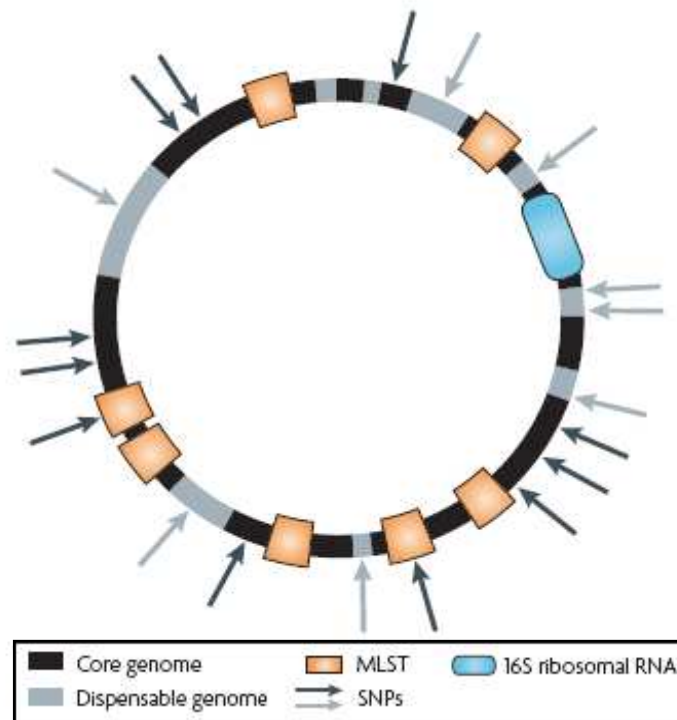


Figure 26. Couverture du génome par les méthodes génotypiques (318).

Schématisation du génome de base (« core genome ») bactérien, qui comprend l'ensemble des gènes partagés par toutes les souches d'une espèce bactérienne, ces gènes codent pour des protéines impliquées dans des fonctions essentielles, comme la réplication, la transcription et la traduction. Schématisation du génome non indispensable (« dispensable genome »), qui comprend des gènes codant pour des protéines facilitant l'adaptation bactérienne. Sont aussi représentées la couverture du génome par l'analyse de l'ARNr 16S (« 16S ribosomal RNA »), par le MLST et par la détermination des SNP. Les deux dernières méthodes analysent l'ensemble du chromosome à la différence de la première n'analysant qu'un gène.

[illegible]

III Méthodes de génotypage utilisées pour *M. genitalium* et *M. pneumoniae*

A. Méthodes utilisées pour *M. genitalium*

1. Méthodes basées sur l'analyse de fragments

1.1 Digestion enzymatique suivant une amplification de l'ADN

1.1.1 PCR-RFLP du gène codant pour la protéine P110

La PCR-RFLP de la région proximale de la protéine accessoire d'adhésion P110, sur le locus MG192, a été réalisée à partir de 54 prélèvements féminins et deux souches de référence avec les enzymes de restriction *MboI* et *RsaI*. Un polymorphisme était mis en évidence chez 7 prélèvements sur 56, soit 12,5 % (344). La portion distale du gène ne présentait pas de variabilité.

1.1.2 AFLP

L'analyse AFLP a été réalisée sur 11 souches de *M. genitalium*, 7 souches ATCC et 4 souches cliniques danoises. Les souches ATCC avaient le même profil, alors que les souches cliniques présentaient chacune un profil différent mais très proche, avec 95,9 % de similarité (229). Cette méthode a été testée sur différentes espèces de mycoplasmes et *M. genitalium* présentait le moins de variabilité.

1.2 MLVA

Le développement d'une méthode MLVA pour l'analyse de *M. genitalium* fait l'objet des résultats de ce travail.

2. Méthodes avec séquençage

2.1 Séquençage du gène de l'adhésine *mgpB*

2.1.1 Intégralité du gène *mgpB*

Le séquençage de l'intégralité du gène *mgpB* a été réalisé sur 21 souches, comprenant les sept souches de référence et 14 souches cliniques dont trois souches isolées consécutivement chez un patient bordelais. Quatre souches ATCC étaient identiques, les souches TW10-5G et UTMB-10G variaient, de même que la souche M30 early. Les souches bordelaises présentaient des différences avec G37 et variaient dans le temps dans les zones répétées du gène *mgpB* (régions EF et G). Les autres souches étaient toutes différentes (198).

2.1.2. Fragment du gène *mgpB*

Hjorth *et al.* ont présenté la première publication d'analyse de SNP dans le gène *mgpB* (Figure 27), (169). La recherche de SNP était réalisée sur un fragment de 281 pb du gène *mgpB* par alignement avec la séquence de référence de G37,

correspondant au type 1. Cette zone est située dans les 500 premières pb du gène, une région qui est présente en un seul exemplaire dans le génome, considérée comme conservée. Sur 267 prélèvements, 56 types de séquences différents ont été décrits. L'index de diversité de Hunter et Gaston ou « Hunter-Gaston Diversity Index » (HGDI), était de 0,95. De plus, les résultats étaient concordants au sein de couples infectés. Cette méthode présente un pouvoir discriminant élevé et une bonne reproductibilité.

Iverson-Cabral *et al.* ont aussi réalisé cette analyse sur des prélèvements cervicaux de neuf femmes présentant une infection chronique. L'analyse montrait neuf types de séquence différents, mais identiques dans le temps pour une même patiente, confirmant la stabilité de ce marqueur (183).

Plus récemment, Musatovova *et al.* ont identifié 18 nouveaux types SNP. Ils ont de plus réalisé l'analyse des acides aminés mettant en évidence des mutations silencieuses sur six acides aminés dans de nombreux prélèvements. Un faible nombre de mutations faux sens était observé (342).

2.2. Analyse multilocus

La première analyse multilocus a été proposée par Ma *et al.* Il s'agissait d'une recherche de SNP dans l'ITS1, entre l'ARNr 16S et 23S, et dans l'ITS2, entre l'ARNr 23S et 5S, couplée à l'analyse d'un VNTR de 3 pb (MG309-STR) dans le locus MG309. L'analyse a été réalisée sur 31 prélèvements de patients et sept souches ATCC. Six types de séquences de l'ARNr et 11 différents allèles du VNTR ont été mis en évidence. L'association de ces deux marqueurs permettait de définir 22 génotypes et toutes les souches ATCC étaient dans le même groupe (280).

Plus récemment, la même équipe a proposé un nouveau système de génotypage multilocus, couplant l'analyse de SNP dans *mgpB* à l'analyse du nombre de répétitions de MG309-STR, réalisée par séquençage directement à partir des prélèvements. L'index de diversité était de 0,989 avec une bonne concordance épidémiologique. A noter que 23 % des prélèvements avaient des allèles multiples pour le VNTR MG309. Les 31 couples infectés présentaient des profils concordants à l'exception de quatre, renforçant la concordance épidémiologique de la méthode (281).

2.3 Séquençage de génomes

Le séquençage de plusieurs génomes de *M. genitalium* permettra de réaliser une analyse génomique comparative et de déterminer plus précisément les différents SNP. Ce travail vient d'être réalisé sur quatre souches cliniques de *M. genitalium*, d'origine géographique différente, séquencées par pyroséquençage. Ces souches ont été comparées à la souche de référence G37. La comparaison des nucléotides en dehors de l'opéron MgPa montrait moins de 1 % de diversité entre les souches, alors que les séquences de l'opéron MgPa avaient plus de 8 % de différence, reflétant l'importance des recombinaisons homologues avec les neuf éléments répétés chromosomiques MgPar (314).

B. Méthodes utilisées pour *M. pneumoniae*

1. Méthodes basées sur l'analyse de fragments

1.1 PFGE

La PFGE a été appliquée à 75 souches de *M. pneumoniae* d'origine géographique différente. Elle séparait les isolats en deux groupes principaux, I et II, comme la PCR-RFLP du gène de l'adhésine P1 qui sera abordée plus loin, et le groupe II était divisé en deux sous-groupes (71).

1.2 Avec amplification d'ADN

1.2.1 RAPD

La RAPD a été appliquée à *M. pneumoniae*. Dans un premier travail, portant sur 24 souches, elle permettait de séparer les souches en deux groupes principaux. Il n'y avait aucune variation dans les motifs d'ADN au sein de chaque groupe, illustrant l'homogénéité de cette espèce (495).

La RAPD a aussi été utilisée pour typer des souches européennes et elle a été comparée à la PCR-RFLP. Elle séparait les souches en deux principaux groupes et les résultats entre les deux méthodes étaient concordants (71).

1.2.2 PCR en temps réel HRM

La distinction des deux types du gène de l'adhésine P1 de *M. pneumoniae* et de ses variants a été réalisée par PCR en temps réel HRM (423, 424).

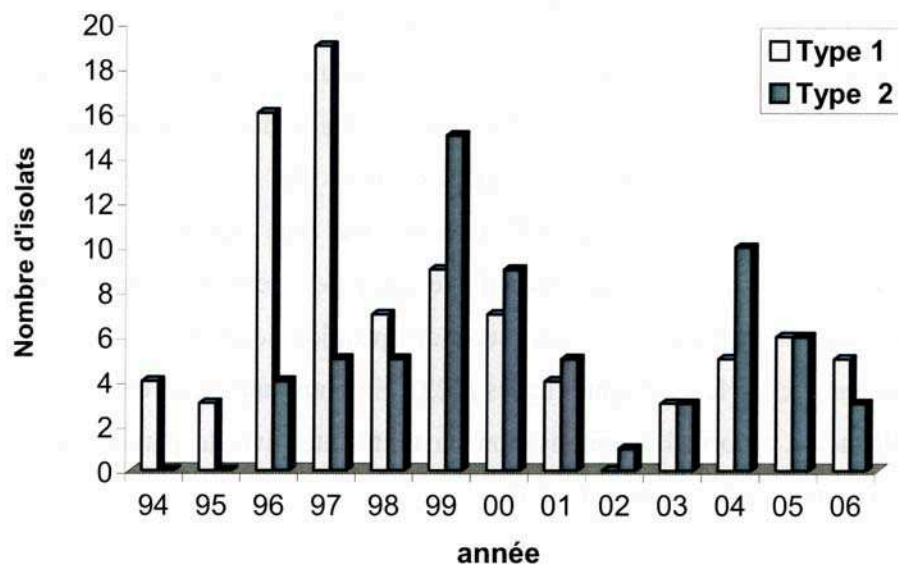
1.2.3 MLVA

Le développement d'une méthode MLVA pour l'analyse de *M. pneumoniae* fait l'objet des résultats de ce travail (77).

1.3 Avec amplification d'ARN

La technique de NASBA permet l'amplification de l'ARN grâce à l'action simultanée de trois enzymes, une transcriptase inverse qui possède aussi une activité polymérase, une RNase et une ARN polymérase. Le produit d'amplification est un simple brin d'ARN, détecté par électrochimiluminescence ou « enzyme-linked gel assay » (ELGA). Un des avantages de cette technique serait d'identifier une infection productive à *M. pneumoniae*, contrairement aux autres techniques d'amplification qui détectent à la fois l'ADN des organismes vivants ou morts (268). Cette technique a été appliquée au typage de 24 souches de *M. pneumoniae* à partir de l'ARNr 16S (365). Les séquences nucléotidiques des amplicons ARN ont été déterminées pour une souche de chaque type, M15/83 pour le type 1 et FH pour le type 2, mettant en évidence une mutation ponctuelle dans l'ARNr 16S entre les deux représentants de chaque type. A partir de cette détermination deux sondes spécifiques de chaque type ont été dessinées. Les résultats de cette méthode pour les 24 souches concordaient avec ceux des autres méthodes de typage.

A



B

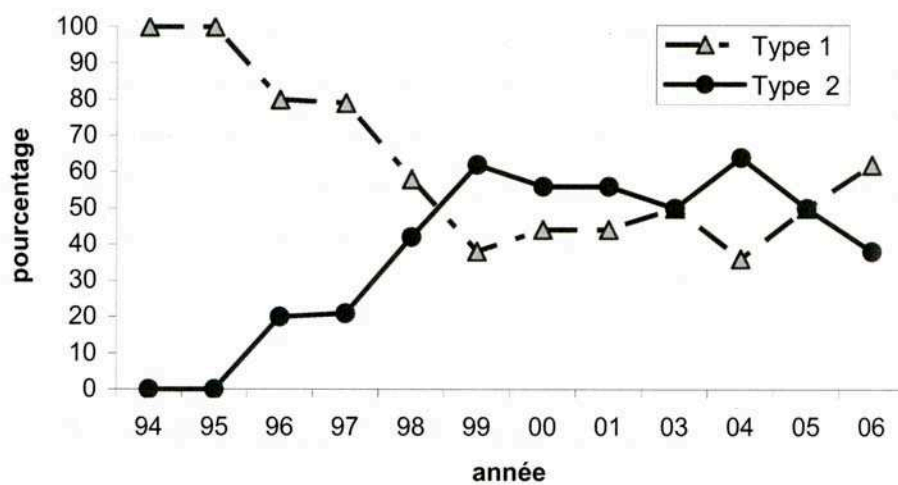


Figure 28. Distribution en fonction du type P1 de 154 souches cliniques de *M. pneumoniae* isolées en France entre janvier 1994 et août 2006 (377).

A Nombre de souches de chaque type isolées par an.

B Pourcentage relatif de souches de chaque type par an.

1.4 Digestion enzymatique suivant une amplification de l'ADN

1.4.1 PCR-RFLP du gène de l'adhésine P1

La PCR-RFLP du gène de l'adhésine P1 a été la première méthode de génotypage décrite pour *M. pneumoniae* et reste la plus utilisée (71, 416). Comme il a déjà été évoqué, cette méthode permet de séparer les souches en deux types principaux, le type 1 dont le représentant est la souche de référence M129 et le type 2 dont le représentant est la souche FH.

Dans certaines zones géographiques il a été démontré la prédominance d'un type de l'adhésine P1 et une alternance de l'infection par les deux types dans le temps (71, 91, 416, 512). Ces changements dans le type de l'adhésine P1 pourraient jouer un rôle dans le développement d'épidémies. Une réponse immune type-spécifique pourrait se développer et protéger ainsi la population contre le type dominant. L'épidémie suivante se développerait alors contre l'autre type (94). En France, les épidémies de 1987 et 1992 étaient dues à des souches de type 2 et 1, respectivement (71). Cependant, en désaccord avec cette théorie, des changements de type ont pu être observés au Japon entre 1979 et 1995, sans être suivis par une épidémie d'infection à *M. pneumoniae* (416). En France, après un pic d'isolats de type 2 en 1987 suivi par un pic de type 1 en 1992, le type 1 était encore prédominant entre 1994 et 1997. Depuis 1998, les deux types sont présents dans la même proportion (Figure 28), (377). Des études sur des échantillons d'ADN collectés en Allemagne et Suisse ont montré aussi une distribution égale des types 1 et 2 au sein de souches isolées entre 2003 et 2005 (93). Les raisons expliquant ces changements de type sont inconnues. Une étude plus récente japonaise, entre 1995 et 2005, a montré la prédominance du type 2 jusqu'en 2001. Puis les souches de type 1 sont apparues en 2002, pour prédominer totalement entre 2003 et 2005 (222).

1.4.2 AFLP

L'analyse par AFLP a été réalisée sur cinq souches de *M. pneumoniae* montrant quatre profils différents avec 90 % d'homologie entre les profils, confirmant la grande homogénéité de cette espèce (229).

2. Méthodes avec séquençage

2.1 Séquençage du gène de l'adhésine P1

Le gène codant l'adhésine P1, situé sur le locus MPN141 de *M. pneumoniae*, contient des copies d'éléments répétés, repMp4 et repMp2/3 (Figure 29). Les différences de séquence au sein de ces éléments répétés sont spécifiques des deux types décrits, les types 1 et 2 (91). Un variant du type 2, le variant 2a (223) et un variant du type 1, le variant 1a (87) ont été d'abord décrits à partir de souches cliniques, tous deux présentant des variations uniquement au sein de repMp2/3. Puis, une méthode de typage réalisée directement à partir des prélèvements respiratoires par PCR-séquençage a été proposée, permettant de décrire un nouveau variant du type 2, le variant V2b (Figure 30), (93). Dans notre laboratoire, un nouveau variant, Mp3896, a été décrit présentant des variations non seulement

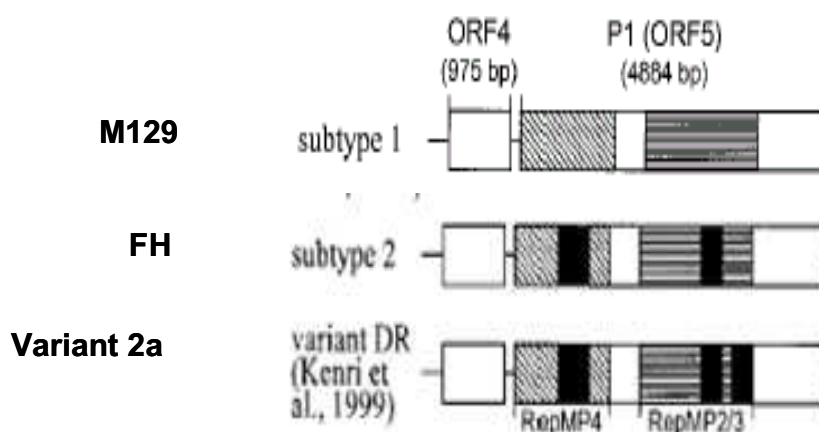


Figure 29. Représentation schématique des types 1 et 2 et du variant 2a du gène de l'adhésine P1 de *M. pneumoniae* (adapté d'après la référence 91).

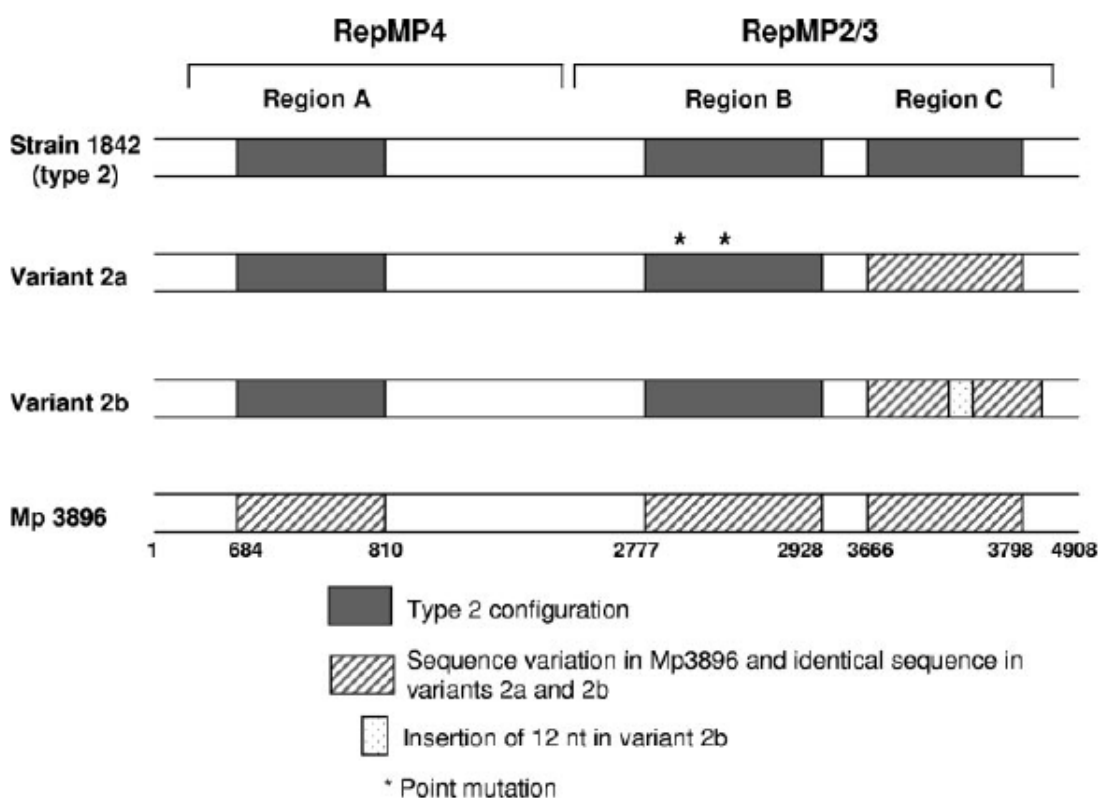


Figure 30. Représentation schématique des divergences de séquence du gène de l'adhésine P1 de la souche Mp3896 et de trois souches de type 2, 1842, variants 2a et 2b (377).

sur repMp2/3, mais aussi sur repMp4 (Figure 30), (377). Récemment, deux nouveaux variants du type 2 ont été décrits par pyroséquençage du gène MPN141. Ils présentaient des réarrangements dans les deux éléments répétés repMp4 et repMp2/3 (446).

2.2 Séquençage de plusieurs gènes

Dumke *et al.* ont proposé une méthode MLST pour le génotypage de *M. pneumoniae*. Des portions de gènes de ménage (*adk*, *pip*, *pdhC*) et de structure (protéines accessoires de cytoadhésion HMW1 à 3), ainsi que des éléments répétés ont été séquencés. La MLST était peu contributive et ne présentait pas un pouvoir discriminant supérieur à celui des méthodes déjà existantes, confirmant la grande homogénéité de cette espèce (91).

C. Synthèse

Le Tableau 21 représente les différentes méthodes de génotypage appliquées aux deux espèces de mycoplasmes humains, *M. genitalium* et *M. pneumoniae*.

Tableau 21. Différentes méthodes de génotypage appliquées à *M. genitalium* et *M. pneumoniae*.

Méthodes	<i>M. genitalium</i>	<i>M. pneumoniae</i>
Méthodes basées sur l'analyse de fragments		
PFGE	NP ^a	(71)
RAPD	NA ^b	(71,495)
Analyse HRM	NA	(423, 424)
MLVA	cette étude	cette étude, (77)
PCR-RFLP	gène <i>mgpC</i> (344)	gène adhésine P1 (71, 91, 222, 377, 416)
AFLP	(229)	(229)
Méthodes avec séquençage		
Analyse d'un seul gène	gène <i>mgpB</i> (169, 183, 342)	gène adhésine P1 (87, 91, 93, 223)
Analyse de plusieurs gènes ou loci	SNP + VNTR (280, 281)	MLST (91)

^a NP, non publié, ^b NA, non appliqué.

RESULTATS DES TRAVAUX

CHAPITRE 1 PROTOCOLE FEMINIST

RESULTATS DES TRAVAUX

CHAPITRE 1 : PROTOCOLE FEMINIST

Résumé du protocole

Un protocole de recherche clinique intitulé, « Etude la prévalence des infections à *Mycoplasma genitalium* et à *Chlamydia trachomatis* chez les femmes infectées par le VIH-1 de la cohorte Aquitaine ANRS CO3 », a été mis en place au cours de cette thèse. Il porte l'acronyme FeminIST et j'en suis le coordonateur.

La prévalence des IST chez les patients VIH+ a été évaluée dans de nombreuses études. Elle est généralement supérieure à celle de la population séronégative concernant les différents agents infectieux. Quelques études de la littérature ont évalué la fréquence des infections génitales à *M. genitalium* chez les hommes VIH+, mais, à notre connaissance, peu d'études ont analysé spécifiquement la prévalence de l'infection à *M. genitalium* chez les femmes VIH+ européennes. De même, il n'y a pas d'étude récente de prévalence de l'infection à *C. trachomatis* chez les femmes VIH+, non enceintes.

L'objectif de cette étude était double. Il s'agissait premièrement de préciser la prévalence du portage de *M. genitalium* et de *C. trachomatis* chez les femmes VIH+ de la cohorte Aquitaine gérée par le GECSA (Groupe d'Epidémiologie du SIDA en Aquitaine), et, deuxièmement, d'enrichir et de diversifier notre collection de prélèvements positifs pour *M. genitalium* pour les analyser ensuite par MLVA.

Il s'agit d'une étude prospective basée sur la réalisation d'auto-échantillonnages vaginaux chez les patientes VIH+ de la cohorte Aquitaine, accompagnée d'un recueil des symptômes, des pratiques sexuelles et des paramètres immunovirologiques et selon les cas d'une consultation gynécologique. Deux cent cinquante inclusions sont prévues. Il s'agit de la première étude d'une telle ampleur chez les femmes VIH+ européennes concernant le portage de *M. genitalium*. Cette étude est réalisée conjointement par les Services de Maladies Infectieuses du CHU de Bordeaux, le Laboratoire de Bactériologie de l'Hôpital Pellegrin, le laboratoire EA 3617, le Centre National de Référence (CNR) des chlamydiae et l'ISPED (Institut de Santé Publique, d'Epidémiologie et de Développement) de l'Université Victor Segalen Bordeaux 2.

Dans un premier temps le protocole dans sa version définitive sera présenté, puis suivront les différents courriers nécessaires à sa mise en place (demande adressé au Comité de Protection des Personnes (CPP) et leur réponse, demande de promotion du CHU de Bordeaux). Le dossier adressé au Comité Consultatif sur le Traitement de l'Information en matière de Recherche dans le domaine de la Santé (CCTIRS) sera présenté, ainsi que les notices élaborées à l'intention des différents intervenants. Enfin, les résultats préliminaires de ce protocole seront présentés.

La version définitive du protocole est présentée avec différentes annexes, ainsi que des résultats préliminaires.

Etude de la prévalence des infections à *Mycoplasma genitalium* et à *Chlamydia trachomatis* chez les femmes infectées par le VIH-1 de la cohorte Aquitaine ANRS CO3

Titre court : *Mycoplasma genitalium* et *Chlamydia trachomatis* chez les femmes VIH+

PROTOCOLE DE RECHERCHE BIOMEDICALE

Version n°1.4 du 10/10/2008

Cette recherche a obtenu le financement du CNR des infections à chlamydiae

Investigateur principal (recherche monocentrique) :

Dr CAZANAVE, Fédération de Maladies infectieuses, hôpital Pellegrin, place A. Raba-Léon, 33076 Bordeaux Cedex

Co-investigateur : Mme le Dr PEREYRE, Laboratoire de Bactériologie EA 3671, bât. 2B, zone nord, 146 rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux Cedex

Centre de Méthodologie et de Gestion des données :

Mme le Dr LAWSON-AYAYI, GECSA, ISPED, Université Victor Segalen, rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux Cedex

Ce protocole a été conçu et rédigé à partir de la version 1.0 du 28/09/2007 du protocole-type de la DIRC Sud-Ouest Outre Mer

HISTORIQUE DES MISES A JOUR DU PROTOCOLE

VERSION	DATE	RAISON DE LA MISE A JOUR
1.0	18.02.2008	Version initiale
1.1	09.04.2008	Version corrigée et complétée
1.2	11.06.2008	Version corrigée selon les remarques des experts
1.3	03/07/2008	Adaptation du protocole au cadre de la recherche observationnelle
1.4	10/10/2008	Soumission au CCTIRS

PRINCIPAUX CORRESPONDANTS

Investigateur principal

Dr CAZANAVE

Adresse : Fédération de Maladies infectieuses, hôpital Pellegrin, place A. Raba-Léon, 33076 Bordeaux Cedex
Tél. : 05 56 79 55 23-Fax : 05 56 79 61 73
Courriel : charles.cazanave@chu-bordeaux.fr

Co-investigateur

Mme le Dr PEREYRE

Adresse : Laboratoire de Bactériologie EA 36 71, bât. 2B, zone nord, 146 rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux Cedex
Tél. : 05 57 57 16 25-Fax : 05 56 93 29 40
Courriel : sabine.pereyre@u-bordeaux2.fr

Infectiologues

Pr Jean-Marie RAGNAUD

Pr Didier NEAU

Dr Mojgan BONAREK

Dr Fabrice BONNET

Pr Jean-Luc PELLEGRIN

Biologistes

Dr Bertille de BARBEYRAC

Pr Cécile BEBEAR

Gynécologues

Pr Jean-Luc BRUN

Pr Claude HOCKE

- Responsable de la recherche au niveau du gestionnaire

Jean-Pierre LEROY - Directeur de la Recherche Clinique et de l'Innovation
Julie BOUSSUGE - Responsable de la Cellule promotion de la recherche clinique et de l'innovation
Tél : 05 57 82 03 13 – Fax : 05 56 79 49 26
Courriel : julie.boussuge@chu-bordeaux.fr

Centre de Méthodologie et de Gestion des données

ISPED, Université Victor Segalen, rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux Cedex

Méthodologistes-Statisticiens

Mme le Dr LAWSON-AYAYI, GECSA, Université Victor Segalen, rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux Cedex

Mme B. UWAMALIYA, ARC, GECSA, Université Victor Segalen, rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux Cedex

1. RESUME DE LA RECHERCHE

INVESTIGATEUR PRINCIPAL	Dr CAZANAVE Fédération de Maladies infectieuses, hôpital Pellegrin, place A. Raba-Léon, 33076 Bordeaux Cedex Tel : 05 56 79 55 23 Fax : 05 56 79 61 73 Courriel : charles.cazanave@chu-bordeaux.fr
CO-INVESTIGATEUR	Mme le Dr Sabine PEREYRE Laboratoire de Bactériologie EA 3671, bât. 2B zone nord, 146 rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux Cedex Tél. : 05 57 57 16 25 Fax : 05 56 93 29 40 Courriel : sabine.pereyre@u-bordeaux2.fr
TITRE	Etude de la prévalence des infections à <i>Mycoplasma genitalium</i> et à <i>Chlamydia trachomatis</i> chez les femmes infectées par le VIH-1 de la cohorte Aquitaine ANRS CO3
VERSION DU PROTOCOLE	N°1.4 du 10/10/08
JUSTIFICATION / CONTEXTE	La prévalence des infections sexuellement transmissibles (IST) chez les patients VIH+ a été évaluée dans de nombreuses études. Elle est généralement supérieure à celle de la population séronégative concernant les différents agents infectieux. Quelques études de la littérature ont évalué la fréquence des infections génitales à <i>M. genitalium</i> chez les hommes VIH+, mais, à notre connaissance, peu d'études ont analysé spécifiquement la prévalence de l'infection à <i>M. genitalium</i> chez les femmes VIH+ européennes. De même, il n'y pas d'étude récente de prévalence de l'infection à <i>C. trachomatis</i> chez les femmes VIH+, non enceintes
OBJECTIFS	L'objectif de cette étude est de préciser la prévalence du portage de <i>M. genitalium</i> et de <i>C. trachomatis</i> chez les femmes VIH+ de la cohorte Aquitaine ANRS CO3 gérée par le GECSA (Groupe d'Epidémiologie du SIDA en Aquitaine).
SCHEMA DE LA RECHERCHE	Il s'agit d'une étude prospective basée sur la réalisation d'auto-échantillonnages vaginaux chez les patientes VIH+ de la cohorte Aquitaine, accompagnée d'un recueil des symptômes, des pratiques sexuelles et des paramètres immunovirologiques et selon les cas d'une consultation gynécologique. Deux cent cinquante inclusions sont prévues. Cette étude est réalisée conjointement par les Services de Maladies Infectieuses du CHU de Bordeaux, le Laboratoire de Bactériologie de l'Hôpital Pellegrin, le Centre National de Référence (CNR) des chlamydiae et l'ISPED.
CRITERES D'INCLUSION	- Patientes incluses dans la Cohorte Aquitaine, ANRS CO3. - Suivies au CHU de Bordeaux, - Ayant entre 18 ans et 50 ans inclus, - En consultation systématique du suivi de leur infection à VIH,

CRITERES DE NON INCLUSION	- Patientes de moins de 18 ans et de plus de 50 ans, - Règles le jour du prélèvement, - Prise d'antibiotiques dans les 5 dernières semaines (macrolides et apparentés dont DALACINE et AZADOSE, fluoroquinolones et tétracyclines)
TRAITEMENTS/STRATEGIES/PROCEDURES DE LA RECHERCHE	Projet observationnel, pas de traitement
CRITERES DE JUGEMENT	La présence de <i>M. genitalium</i> et/ou <i>C. trachomatis</i> sera affirmée par un résultat positif à la PCR en temps réel spécifique de <i>M. genitalium</i> et/ou <i>C. trachomatis</i> . Les prélèvements positifs en PCR spécifique de <i>M. genitalium</i> seront ensuite évalués en PCR quantitative avec les mêmes sondes et amorces.
TAILLE D'ETUDE	250 inclusions
NOMBRE PREVU DE CENTRES	Trois sites du CHU de Bordeaux : Pellegrin, Saint-André et Haut-Lévêque
DUREE DE LA RECHERCHE	Durée de la période d'inclusion : au moins 1 an Durée de participation de chaque patient : 1 jour
ANALYSE STATISTIQUE DES DONNEES	Evaluation de la prévalence des deux IST étudiées. Confrontation avec les données immunovirologiques des patients, leurs pratiques sexuelles, la présence de symptômes et les résultats de l'examen gynécologique.
RETOMBEES ATTENDUES	Première étude d'une telle ampleur chez les femmes VIH+ européennes concernant le portage de <i>M. genitalium</i> . Valorisation par publication.

2. JUSTIFICATION SCIENTIFIQUE ET DESCRIPTION GENERALE

2.1. ETAT ACTUEL DES CONNAISSANCES

Les avancées dans la prise en charge des patients infectés par le VIH (VIH+) permettent une survie prolongée et une meilleure qualité de vie objectivées dès l'introduction des thérapeutiques antirétrovirales hautement actives [1].

La prévalence des infections sexuellement transmissibles (IST) chez les patients VIH+ a été évaluée dans de nombreuses études, elle est généralement supérieure à celle de la population séronégative concernant les différents agents infectieux [2-4]. De plus, les IST augmentent l'infectiosité des personnes séropositives pour le VIH [5].

Mycoplasma genitalium fait partie, avec *M. hominis* et *Ureaplasma urealyticum*, des trois espèces de mycoplasmes trouvées au niveau du tractus urogénital ayant un pouvoir pathogène [6].

M. genitalium est une cause reconnue d'IST chez l'homme, essentiellement d'urétrites non gonococciques (UNG) aiguës mais aussi chroniques [7]. Il peut être également détecté chez des patients asymptomatiques [8]. D'après une récente revue de la littérature, *M. genitalium* est détecté chez 0 à 15% d'hommes asymptomatiques et chez 13 à 42% de patients présentant une UNG aiguë [8]. Chez la femme, le nombre d'études concernant le rôle pathogène de *M. genitalium* est plus faible. Des nouvelles données sont apparues ces dernières années démontrant l'implication de *M. genitalium* dans les cervicites [9] et les endométrites [10]. D'autres études ont montré une association probable entre *M. genitalium* et salpingites [7]. Quelques études récentes sur l'épidémiologie de l'infection à *M. genitalium* sont à signaler. La première est une étude danoise, menée par une équipe de référence dans cette thématique, visant à évaluer la prévalence de l'infection à *M. genitalium* dans la population générale, par une PCR en temps réel sur des échantillons biologiques, premier jet d'urine pour l'homme et auto-écouvillonnage vaginal pour la femme. La prévalence d'infection est de 1,1% chez les hommes et de 2,3% chez les femmes [11]. La deuxième est une étude de grande ampleur portant sur 2932 adolescents américains, 1714 femmes et 1218 hommes. La prévalence de *M. genitalium* est évaluée sur les urines à 1,0 % [12]. La troisième étude est aussi une étude américaine dont l'objectif est d'évaluer la prévalence du portage, symptomatique ou non, de *M. genitalium* au sein d'une population d'adolescentes par auto-écouvillonnage vaginal. La prévalence d'échantillons positifs pour *M. genitalium* est de 0,8 à 4,1 % [13]. Chez la femme séronégative, l'infection à *M. genitalium* est corrélée à l'activité sexuelle et au nombre de partenaires sexuels [5,9,13,14].

Chlamydia trachomatis est une bactérie hétérogène divisée en 19 sérovars responsables de pathologies variées comme le trachome, les infections génitales à type de cervicite et d'urétrite, ou d'ulcérations génitales dans la lymphogranulomatose vénérienne [15]. Chez l'homme, l'infection à *C. trachomatis* se présente dans la majorité des cas comme une urétrite sub-aiguë. Chez la femme, l'infection réalise le plus souvent une cervicite, asymptomatique, et l'infection est généralement de découverte fortuite lors d'un bilan gynécologique systématique. La cervicite varie dans son intensité, le col est souvent oedématisé et friable. Les infections génitales de la femme à *C. trachomatis* sont redoutables par leurs complications à type de salpingites ou de grossesses extra-utérines. *C. trachomatis* est le premier agent d'IST en France. L'incidence des infections génitales est variable suivant

les populations, l'activité sexuelle et l'âge. Les facteurs de risque de l'acquisition d'une infection à *C. trachomatis* incluent l'âge inférieur à 25 ans chez la femme, inférieur à 30 ans chez l'homme, la multiplicité des partenaires sexuels, un nouveau partenaire, le célibat, la non utilisation de préservatifs [15]. En France, l'incidence des infections à *C. trachomatis* dans la population générale est de 3,6 % chez les femmes de moins de 25 ans, 2,7 % chez les femmes de 25 à 29 ans et de moins de 1 % chez les femmes de plus de 30 ans d'après les résultats de l'enquête nationale Natchla effectuée sur 1445 femmes [16]. Les chiffres du réseau Rénachla, réseau national de laboratoires d'analyses de biologie médicale surveillant les chlamydioses uro-génitales françaises, sont en augmentation et dépassent le chiffre de 4% [17]. Dans les populations consultant les CIDDIST et les centres de planification, les chiffres de prévalence vont de 8 à 12 % suivant les sites. Une tendance générale à la hausse est observée. Il faut noter également une progression de la syphilis, notamment chez les femmes [18]. Dans le cadre de cette augmentation des IST bactériennes, la recherche concomitante de *C. trachomatis* et *M. genitalium* se justifie.

Concernant les patients infectés par le VIH, quelques études de la littérature ont évalué la fréquence des infections génitales à *M. genitalium* chez les hommes [2], mais, à notre connaissance, peu d'études ont analysé spécifiquement la prévalence de l'infection à *M. genitalium* chez les femmes VIH+. Une étude de prévalence et d'incidence dans une population à haut risque de VIH a été menée chez des prostituées africaines [14]. Il en ressort une prévalence initiale d'infections à *M. genitalium* de 16 % et une très importante incidence de 22,7/100femmes/années, supérieure à celle de *C. trachomatis* et de *Neisseria gonorrhoeae*. De plus, l'incidence des infections à *M. genitalium* est supérieure chez les femmes séropositives pour le VIH-1 par rapport aux femmes séronégatives, suggérant des conduites à risques ou une immunodépression supérieures chez les femmes VIH+ favorisant l'acquisition de ce mycoplasme [14]. Une étude portant sur 303 femmes séropositives pour le VIH-1 vient aussi de paraître [5]. Il s'agit de femmes africaines, vivant au Kenya, prostituées pour les trois quarts, portant sur des prélèvements réalisés entre 1994 et 1996. La prévalence du portage de *M. genitalium* est évaluée à 17 %. Il faut aussi noter que les prévalences des infections à *C. trachomatis* et à *N. gonorrhoeae*, respectivement de 7 et 10 % sont bien supérieures à celles retrouvées dans les études françaises.

Il y a peu d'études récentes de prévalence de l'infection à *C. trachomatis* chez les femmes VIH+ européennes. Une étude de 1999 portant sur 2625 femmes, 2058 VIH+ et 567 séronégatives, n'a pas mis en évidence de différence de prévalence de l'infection à *C. trachomatis* entre les 2 groupes [3]. Une autre étude a rapporté des chiffres de prévalence d'infection à *C. trachomatis* de l'ordre de 1 % chez des femmes enceintes VIH+ suivie dans une cohorte européenne et d'Ukraine entre 1999 et 2005 [19]. Aucune donnée récente d'infections à *C. trachomatis* chez les femmes VIH+ non enceintes n'a été publiée alors qu'une tendance à la hausse de toutes les IST est observée et particulièrement celles à *C. trachomatis*.

2.2. HYPOTHESES DE LA RECHERCHE ET RESULTATS ATTENDUS

La prévalence des IST chez les patients VIH+ a été évaluée dans de nombreuses études. Elle est généralement supérieure à celle de la population séronégative concernant les différents agents infectieux [2-4].

M. genitalium est un agent reconnu d'IST chez l'homme. Chez la femme, sa responsabilité est encore à définir et aucune étude ne s'est intéressée spécifiquement aux femmes VIH+ des pays industrialisés. Nous nous proposons de déterminer la prévalence de *M. genitalium* chez les femmes VIH+ françaises de la cohorte Aquitaine ANRS CO3, gérée par le GECSA (Groupe d'Epidémiologie du SIDA en Aquitaine). Compte tenu de la récente augmentation des IST en France, en particulier de celle à *C. trachomatis* [17], la prévalence de *C. trachomatis* sera aussi évaluée dans cette population.

3. OBJECTIFS DE LA RECHERCHE

3.1. OBJECTIF PRINCIPAL

Evaluer la prévalence du portage de *M. genitalium* et *C. trachomatis* chez les femmes VIH+ de la cohorte Aquitaine ANRS CO3.

4. CONCEPTION DE LA RECHERCHE

4.1. SCHEMA DE LA RECHERCHE

Il s'agit d'une étude descriptive transversale, prospective, basée sur la réalisation d'auto-écouvillonnages vaginaux chez les patientes VIH+ de la cohorte Aquitaine ANRS Co3 ainsi que sur le recueil des données immunovirologiques des patientes, des pratiques sexuelles, de la présence de symptômes et des résultats de l'examen gynécologique pour les femmes symptomatiques ou détectées positives. Il s'agit d'une étude locale, réalisée sur les 3 sites du CHU de Bordeaux.

5. CRITERES D'ÉLIGIBILITE

5.1. CRITERES D'INCLUSION

- Patientes incluses dans la Cohorte Aquitaine,
- Suivies au CHU de Bordeaux,
- Ayant entre 18 ans et 50 ans inclus,

5.2. CRITERES D'EXCLUSION

- Patientes de moins de 18 ans et de plus de 50 ans,
- Règles le jour du prélèvement,
- Prise d'antibiotiques dans les 5 dernières semaines, parmi les 3 familles d'antibiotiques suivantes, macrolides et apparentés (dont DALACINE[®] et AZADOSE[®]), fluoroquinolones et tétracyclines. La prise de cotrimoxazole n'est pas un critère d'exclusion, cet antibiotique n'étant pas actif sur les 2 micro-organismes étudiés.

5.3. MODALITES DE RECRUTEMENT

D'après nos premières analyses cette étude nécessitera 250 inclusions.

Toute patiente en consultation systématique de son suivi VIH se verra proposer l'étude à l'aide notamment de la note d'information (Annexe B).

Toute patiente incluse se verra proposer, après avoir recueilli leur consentement oral, un auto-questionnaire concernant ses pratiques sexuelles, un auto-écouvillonnage vaginal et une consultation gynécologique dans certains cas (cf. paragraphe 8.5).

Les différents services de maladies infectieuses du CHU de Bordeaux participeront au recrutement (cf. Annexe A).

6. TRAITEMENT(S)/STRATEGIE(S)/PROCEDURE(S) DE LA RECHERCHE

6.1. TRAITEMENT/STRATEGIE/PROCEDURE A L'ETUDE

M. genitalium sera détecté par une technique de PCR en temps réel qualitative publiée [20], sur l'automate AbiPrism 7000 (Applied Biosystem). Les prélèvements positifs en PCR qualitative seront ensuite évalués en PCR quantitative avec les mêmes sondes et amorces. Cette technique a été mise en place et validée dans le laboratoire, notamment avec la construction d'un plasmide de calibration.

C. trachomatis sera détecté par une technique de PCR en temps réel commercialisée sur l'automate Cobas TaqMan® (Roche Diagnostics).

7. CRITERES DE JUGEMENT

La présence de *M. genitalium* et/ou *C. trachomatis* sera affirmée par un résultat positif à la PCR en temps réel spécifique de *M. genitalium* et/ou *C. trachomatis*.

8. DEROULEMENT DE LA RECHERCHE

8.1. CALENDRIER DE LA RECHERCHE

- Début des inclusions : 2ème semestre 2008, dès accord promotion CHU
- Durée de la période d'inclusion : 1 an
- Durée de participation de chaque patient : 1 jour
- Durée totale de la recherche : 1 an

8.2. TABLEAU RECAPITULATIF DU SUIVI PATIENT

	Inclusion J 0	Visite S 2
Consentement éclairé	✓	
Examen clinique	✓ ¹	✓ ²
Auto-questionnaire « pratiques sexuelles »	✓	
Examen para-clinique	✓ ³	✓ ⁴

Examen clinique : ¹Seules les patientes ayant des symptômes génitaux significatifs (prurit, brûlures, leucorrhées anormales) auront d'emblée un examen gynécologique avec colposcopie. ²Examen gynécologique pour les patientes asymptomatiques à J 0 pour lesquelles la recherche d'une des deux bactéries est positive sur l'auto-écouvillonnage.

Examen para-clinique : ³Auto-écouvillonnage vaginal pour toutes les patientes incluses. ⁴Prélèvement endocervical et écouvillonnage vaginal réalisés par le gynécologue pour les patientes dépistées positives à *M. genitalium* et/ou *C. trachomatis*.

8.3. VISITE D'INCLUSION

La visite d'inclusion est assurée par le médecin responsable de la patiente pour sa pathologie rétrovirale.

Avant tout examen lié à la recherche, l'investigateur recueille le consentement oral de la patiente (ou de son représentant légal le cas échéant).

8.3.1. RECUEIL DU CONSENTEMENT

Lors de la visite d'inclusion, le médecin informe la patiente (ou son représentant légal) et répond à toutes ses questions concernant l'objectif, la nature des contraintes, les risques prévisibles et les bénéfices attendus de la recherche. Il vérifie les critères d'éligibilité. Un exemplaire de la note d'information sera alors remise à la patiente (ou à son représentant légal) par son médecin.

8.3.2. DEROULEMENT DE LA VISITE D'INCLUSION

Une fiche d'inclusion (Annexe C) sera en partie remplie par le clinicien.

Un auto-questionnaire anonymisé, sur l'évaluation des conduites sexuelles et sur les symptômes (Annexe B), sera rempli par la patiente et collecté par le GECSA, en vue d'une saisie informatique. Il sera remis et rempli le jour de la visite d'inclusion.

Ce questionnaire sera accompagné d'une notice informative (Annexe B), ainsi que d'une notice explicative sur la technique d'auto-écouvillonnage (Annexe D).

Le prélèvement sera réalisé à l'aide d'un écouvillon floqué, sans milieu de transport. Ces écouvillons permettent d'améliorer la sensibilité des techniques de détection en augmentant le volume de sécrétions absorbé ainsi que le volume libéré.

Le prélèvement aura lieu à l'issue de la consultation systématique de suivi de l'infection à VIH, une fois que la patiente aura compris, accepté l'étude, et rempli l'auto-questionnaire. Pour des raisons pratiques, ce prélèvement sera fait dans les toilettes des postes de prélèvement dédiés aux patients séropositifs des différents sites, Unité de Surveillance Biologique, USB, pour Pellegrin, hôpitaux de jour pour Saint-André et Haut-Lévêque. Une fois le prélèvement réalisé, une étiquette avec le numéro d'anonymat et le nom du protocole sera collée sur l'écouvillon par l'infirmière, ainsi que sur la feuille de demande d'examen. Le prélèvement sera acheminé au laboratoire de Bactériologie de l'hôpital Pellegrin selon le circuit habituel des prélèvements destinés à ce laboratoire.

Les patientes symptomatiques à J 0, présentant prurit vulvaire, brûlures vaginales ou leucorrhées anormales, réaliseront leur auto-écouvillonnage comme il est prévu dans le protocole, puis seront adressées à un gynécologue pour un examen clinique avec colposcopie, consigné sur une fiche de recueil (Annexe E), et pour de nouveaux prélèvements microbiologiques au niveau endocervical et vaginal à la recherche de *M. genitalium* et *C. trachomatis*. Une notice explicative sera remise aux gynécologues pour notamment prescrire lors de cette consultation une recherche des autres IST (autres mycoplasmes génitaux, gonocoque et syphilis). Cette notice comprendra aussi des consignes thérapeutiques en cas de positivité pour *M. genitalium*.

Les différentes données immunovirologiques et thérapeutiques concernant l'infection rétrovirale seront recueillies dans la base de données du GECSA.

8.4. GESTION DES RESULTATS DES ANALYSES BACTERIOLOGIQUES

Les prélèvements seront analysés au fur et à mesure de leur réception au laboratoire.

Les résultats seront adressés au médecin prescripteur. En cas de résultat positif, celui-ci contactera la patiente pour l'adresser à l'un des deux gynécologues participant à l'étude.

Les patientes asymptomatiques le jour de l'inclusion et détectées positives pour *M. genitalium* et/ou *C. trachomatis* seront ensuite adressées à un gynécologue pour un examen clinique, consigné sur une fiche de recueil (Annexe E). Un prélèvement endocervical ainsi qu'un nouvel écouvillonnage vaginal seront aussi réalisés à la recherche de *M. genitalium* et *C. trachomatis*. Les prélèvements seront acheminés au laboratoire de Bactériologie de l'hôpital Pellegrin selon le circuit habituel des prélèvements destinés à ce laboratoire.

9. ASPECTS STATISTIQUES

9.1. CALCUL DE LA TAILLE D'ETUDE

Il s'agit d'une étude descriptive transversale, visant à évaluer de façon prospective la prévalence des infections génitales à *M. genitalium* et *C. trachomatis* chez les femmes VIH+ de la cohorte Aquitaine. Deux cent cinquante inclusions sont nécessaires pour déterminer les prévalences.

9.2. METHODES STATISTIQUES EMPLOYEES

Nous décrirons les patientes incluses dans l'analyse et leurs caractéristiques. Les variables prises en compte pour l'analyse seront la présence ou non d'une des deux IST étudiées, le pays de naissance, l'âge des patientes, le statut marital, l'ancienneté de leur infection VIH, leurs pratiques sexuelles grâce à l'auto-questionnaire, leurs symptômes subjectifs et objectifs et leurs paramètres immunovirologiques.

Les données de l'auto-questionnaire seront saisies par l'attaché de recherche clinique (ARC). L'ensemble des données seront analysées par l'ARC et le statisticien-méthodologiste et interprétées par les investigateurs. Les données de prévalence seront confrontées aux données immunovirologiques de la base du GECSA, aux pratiques sexuelles, à la présence éventuelle de symptômes et aux résultats de l'examen gynécologique.

10. DROITS D'ACCES AUX DONNEES ET DOCUMENTS SOURCE

10.1. DONNEES SOURCE

Tout document ou objet original permettant de prouver l'existence ou l'exactitude d'une donnée ou d'un fait enregistrés au cours de la recherche est défini comme document source.

Ensemble des documents sources :

- Dossier médical,
- Original de résultat d'examen biologique.

10.2. CONFIDENTIALITE DES DONNEES

Conformément aux dispositions législatives en vigueur (articles L.1121-3 et R.5121-13 du code de la santé publique), les personnes ayant un accès direct aux données source prendront toutes les précautions nécessaires en vue d'assurer la confidentialité des informations relatives aux médicaments expérimentaux, aux recherches, aux personnes qui s'y prêtent et notamment en ce qui concerne leur identité ainsi qu'aux résultats obtenus. Ces personnes, au même titre que les investigateurs eux-mêmes, sont soumises au secret professionnel.

Pendant la recherche ou à son issue, les données recueillies sur les personnes qui s'y prêtent seront rendues anonymes. Elles ne doivent en aucun cas faire apparaître en clair les noms des personnes concernées ni leur adresse.

L'auto-questionnaire sera anonymisé à l'aide d'un numéro d'identification à 6 chiffres, correspondant au numéro de la base de données du GECSA. Ce même numéro figurera sur l'écouvillon pour l'analyse au laboratoire de Bactériologie de Pellegrin.

11. CONTROLE ET ASSURANCE QUALITE

11.1. CONSIGNES POUR LE RECUEIL DES DONNEES

L'infirmière de l'Unité de Surveillance Biologique ou des hôpitaux de jour vérifient l'intégralité des réponses de l'auto-questionnaire avant le départ de la patiente. Les données manquantes devront être recueillies à ce moment-là et transcrites dans les auto-questionnaires de façon nette et lisible.

Les données erronées relevées sur les auto-questionnaires seront clairement barrées et les nouvelles données seront copiées, à côté de l'information barrée, accompagnées des

initiales, de la date et éventuellement d'une justification par l'investigateur ou la personne autorisée qui aura fait la correction.

11.2. SUIVI DE LA RECHERCHE

Le suivi de la recherche sera assuré par un ARC du GECSA. Il sera chargé, auprès de l'investigateur coordonnateur, de :

- la logistique et la surveillance de la recherche,
- l'établissement des rapports concernant son état d'avancement,
- la transmission des EIG au promoteur.

Il travaillera conformément aux procédures opératoires standardisées.

11.3. CONTROLE DE QUALITE

L'attaché de recherche clinique visite de façon régulière chaque centre investigateur, lors de la mise en place de la recherche, une ou plusieurs fois en cours de recherche selon le rythme des inclusions et en fin de recherche. Lors de ces visites, les éléments suivants seront revus :

- respect du protocole de la recherche et des procédures qui y sont définies,
- qualité des données recueillies dans les auto-questionnaires : exactitude, données manquantes, cohérence des données avec les documents source (dossiers médicaux, carnets de rendez-vous, originaux des résultats de laboratoire, etc....).

Toute visite fera l'objet d'un rapport de monitoring par compte-rendu écrit.

12. CONSIDERATIONS ETHIQUES

Les investigateur(s) s'engagent à ce que cette recherche soit réalisée en conformité avec la loi n°2004-806 du 9 août 2004, ainsi qu'en accord avec les Bonnes Pratiques Cliniques (I.C.H. version 4 du 1^{er} mai 1996 et décision du 24 novembre 2006) et la déclaration d'Helsinki (Principes éthiques applicables aux recherches médicales sur des sujets humains, Tokyo 2004).

La recherche est conduite conformément au présent protocole. Hormis dans les situations d'urgence nécessitant la mise en place d'actes thérapeutiques précis, l'(es) investigateur(s) s'engage(nt) à respecter le protocole en tous points.

Les données enregistrées à l'occasion de cette recherche font l'objet d'un traitement informatisé au GECSA, à l'ISPD de Bordeaux dans le respect de la loi n°78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés, modifiée par la loi 2004-801 du 6 août 2004.

Le *CHU de Bordeaux* a soumis la recherche au Comité Consultatif sur le Traitement de l'Information en matière de Recherche dans le domaine de la Santé (CCTIRS) et l'a déclarée à la Commission Nationale de l'Informatique et des Libertés (CNIL).

13. TRAITEMENT DES DONNEES ET CONSERVATION DES DOCUMENTS ET DES DONNEES RELATIVES A LA RECHERCHE

13.1. TRAITEMENT DES DONNEES

Modalités de saisie des données : simple saisie par l'ARC du GECSA.

13.2. CONSERVATION DES DOCUMENTS RELATIFS A LA RECHERCHE

Les documents suivants relatifs à cette recherche sont archivés conformément aux Bonnes Pratiques Cliniques :

– Par les médecins investigateurs :

- pour une durée de 15 ans suivant la fin de la recherche

- Le protocole
- L'original des auto-questionnaires
- Les dossiers source des participants ayant signé un consentement
- Tous les autres documents et courriers relatifs à la recherche

14. REGLES RELATIVES A LA PUBLICATION

14.1. COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES

Toute communication écrite ou orale des résultats de la recherche doit recevoir l'accord préalable de l'investigateur coordonnateur et, le cas échéant, de tout comité constitué pour la recherche.

La publication des résultats principaux mentionne tous les investigateurs ayant inclus ou suivi des patients dans la recherche, des membres du(des) comité(s) constitué(s) pour la recherche et la source de financement, CNR des chlamydiae. Il sera tenu compte des règles internationales d'écriture et de publication (Convention de Vancouver, février 2006).

14.2. COMMUNICATION DES RESULTATS AUX PATIENTS

Conformément à la loi n°2002-303 du 4 mars 2002, les patients sont informés, à leur demande, des résultats globaux de la recherche.

14.3. CESSION DES DONNEES

Le recueil et la gestion des données sont assurés par le GECSA et l'investigateur coordonnateur. Les conditions de cession de tout ou partie de la base de données de la recherche sont décidées par le promoteur de la recherche et font l'objet d'un contrat écrit.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] Palella FJ, Jr., Delaney KM, Moorman AC, Loveless MO, Fuhrer J, Satten GA, *et al.* Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. HIV Outpatient Study Investigators. N. Engl. J. Med. 1998;338(13):853-860.
- [2] Martinelli F, Garrafa E, Turano A, Caruso A. Increased frequency of detection of *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma genitalium* in AIDS patients without urethral symptoms. J. Clin. Microbiol. 1999;37(6):2042-2044.
- [3] Greenblatt RM, Bacchetti P, Barkan S, Augenbraun M, Silver S, Delapenha R, Garcia P, Mathur U, Miotti P, Burns D. Lower genital tract infections among HIV-infected and high-risk uninfected women: findings of the Women's Interagency HIV Study (WIHS). Sex. Transm. Dis. 1999;26(3):143-151.
- [4] Palefsky JM, Shiboski S, Moss A. Risk factors for anal human papillomavirus infection and anal cytologic abnormalities in HIV-positive and HIV-negative homosexual men. J. Acquir. Immune Defic. Syndr. 1994;7(6):599-606.
- [5] Manhart LE, Mostad SB, Baeten JM, Astete SG, Mandaliya K, Totten PA. High *Mycoplasma genitalium* organism burden is associated with shedding of HIV-1 DNA from the cervix. J. Infect. Dis. 2008;197:733-736.
- [6] Bébéar CM, de Barbeyrac B, Carcenac G, Pereyre S, Bébéar C. *Mycoplasma genitalium*, a cause of urethritis and other sexually transmitted diseases. Med. Mal. Infect. 2006;36:S25-S27.
- [7] Jensen JS. *Mycoplasma genitalium*: the aetiological agent of urethritis and other sexually transmitted diseases. J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol. 2004;18(1):1-11.
- [8] Ishihara S, Yasuda M, Ito S, Maeda S, Deguchi T. *Mycoplasma genitalium* urethritis in men. Int. J. Antimicrob. Agents 2004;24 Suppl 1:S23-S27.
- [9] Manhart LE, Critchlow CW, Holmes KK, Dutro SM, Eschenbach DA, Stevens CE, Totten PA. Mucopurulent cervicitis and *Mycoplasma genitalium*. J. Infect. Dis. 2003;187(4):650-657.
- [10] Cohen CR, Manhart LE, Bukusi EA, Astete S, Brunham RC, Holmes KK, Sinei SK, Bwayo JJ, Totten PA. Association between *Mycoplasma genitalium* and acute endometritis. Lancet. 2002;359(9308):765-766.
- [11] Andersen B, Sokolowski I, Ostergaard L, Moller JK, Olesen F, Jensen JS. *Mycoplasma genitalium*. Prevalence and behavioural risk factors in the general population. Sex. Transm. Infect. 2007;83(3):237-241.
- [12] Manhart LE, Holmes KK, Hughes JP, Houston LS, Totten PA. *Mycoplasma genitalium* among young adults in the United States: an emerging sexually transmitted infection. Am. J. Public Health 2007;97(6):1118-1125.

- [13] Tosh AK, Van Der Pol B, Fortenberry JD, Williams JA, Katz BP, Batteiger BE, Orr DP. *Mycoplasma genitalium* among adolescent women and their partners. J. Adolesc. Health 2007;40(5):412-417.
- [14] Cohen CR, Nosek M, Meier A, Astete SG, Iverson-Cabral S, Mugo NR, Totten PA. *Mycoplasma genitalium* infection and persistence in a cohort of female sex workers in Nairobi, Kenya. Sex. Transm. Dis. 2007;34(5):274-279.
- [15] de Barbeyrac B, Clerc M, Raheison S, Bébéar CM, Bébéar C. Infections humaines à Chlamydiae : diagnostic biologique et épidémiologique. Rev. Lab. 2007;391:71-76.
- [16] Goulet V, Warszawski J, de Barbeyrac B, Raheison S, Beltzer N, Bozon M, Bajos N, CSF Group. Prevalence of genital *C. trachomatis* infection in France in the national population based survey CSF. 6th Meeting of the European Society for Chlamydia research. 1-4 july 2008. Aarhus. Denmark.
- [17] Goulet V, Laurent E et les biologistes du réseau Rénachla. Augmentation des diagnostics d'infections à *Chlamydia trachomatis* en France : analyse des données du réseau Renachla de 2003 à 2006. Bull. Epidemiol. Hebd. 2008;5-6:42-46.
- [18] Bouyssou Michel A, Gallay A, Janier M, Dupin N, Halioua B, Alcaraz I, Picot E, Milpied B, De Baudouin C, Semaille C. Surveillance de la syphilis en France, 2000-2006 : recrudescence des diagnostics en 2006. Bull. Epidemiol. Hebd. 2008 ;5-6 :39-42.
- [19] Landes M, Thorne C, Barlow P, Fiore S, Malyuta R, Martinelli P, Posokhova S, Savasi V, Semenenko I, Stelmah A, Tibaldi C, Newell ML. Prevalence of sexually transmitted infections in HIV-1 infected pregnant women in Europe. Eur. J. Epidemiol. 2007;22(12):925-936.
- [20] Jensen SJ, Bjornelius E, Dohn B, Lidbrink P. Use of TaqMan 5' nuclease real-time PCR for quantitative detection of *Mycoplasma genitalium* DNA in males with and without urethritis who were attendees at a sexually transmitted disease clinic. J. Clin. Microbiol. 2004;42(2):683-692.

ANNEXES

ANNEXE A : LISTE DES INVESTIGATEURS

CENTRE		LISTE DES INVESTIGATEURS (VEUILLEZ INDIQUER LE NOM ET PRENOM)	
N°	NOM ET ADRESSE COMPLETE		
	CHU de Bordeaux, hôpital Pellegrin, place A. Raba-Léon, 33076 Bordeaux Cedex	Investigateur principal : Dr Charles CAZANAVE	Service : Maladies infectieuses Mail : charles.cazanave@chu- bordeaux.fr Tel : 05 56 79 55 23
		Co-investigateur : Dr Sabine PEREYRE	Service : Bactériologie Mail : sabine.pereyre@u- bordeaux2.fr Tel : 05 57 57 16 25
	Hôpital Pellegrin	Pr Jean-Marie RAGNAUD	Service : Maladies infectieuses
	Hôpital Pellegrin	Pr Didier NEAU	Service : Maladies infectieuses
	Hôpital Saint-André	Dr Mojgan BONAREK	Service : Maladies infectieuses
	Hôpital Saint-André	Dr Fabrice BONNET	Service : Maladies infectieuses
	Hôpital Haut-Lévêque	Pr Jean-Luc PELLEGRIN	Service : Maladies infectieuses
	Hôpital Pellegrin	Dr Bertille de BARBEYRAC	Service : Bactériologie
	Hôpital Pellegrin	Pr Cécile BEBEAR	Service : Bactériologie
	ISPED	Dr Sylvie LAWSON-AYAYI	GECSA
	ISPED	Pr François DABIS	GECSA
	Hôpital Pellegrin	Dr Jean-Luc BRUN	Maternité : Gynécologie
	Hôpital Saint-André	Pr Claude HOCKE	Service : Gynécologie

ANNEXE B : NOTICE D'INFORMATION ET AUTO-QUESTIONNAIRE

NOTICE D'INFORMATION

Etude des infections sexuellement transmissibles chez les femmes

Madame, Mademoiselle,

Le document qui vous a été remis a été conçu par les médecins du Centre Hospitalier Universitaire de Bordeaux. Il s'adresse spécifiquement aux femmes de 18 à 50 ans, suivies, comme vous dans le cadre de la Cohorte ANRS CO3 Aquitaine et entre dans le cadre d'une étude visant à évaluer la prévalence des infections sexuellement transmissibles chez les femmes séropositives.

L'auto-questionnaire comporte 8 questions portant sur votre vie sexuelle, d'éventuels symptômes génitaux et antécédents d'infections sexuellement transmissibles.

En répondant à ce questionnaire vous pouvez nous aider à adapter les messages de prévention spécifiques à certaines infections sexuellement transmissibles.

Cette étude comporte un auto-écouvillonnage, qui a pour but de rechercher la présence d'agents infectieux connus pour être une cause d'infections sexuellement transmissibles.

Une notice explicative vous sera remise pour vous expliquer comment procéder pour la réalisation du geste.

Si une infection est diagnostiquée il faudra impérativement consulter un gynécologue conseillé par votre infectiologue.

Si vous le jugez nécessaire, n'hésitez pas à demander des explications supplémentaires ou des précisions à votre médecin concernant ce questionnaire.

Ce document est confidentiel et anonyme. Après l'avoir rempli, glissez-le dans l'enveloppe ci-jointe et remettez celle-ci aux infirmières du poste de prélèvement en même temps que votre écouvillon.

Toutes les données recueillies vous concernant vont faire l'objet d'un traitement informatisé pour permettre d'analyser les données au regard de l'objectif de cette étude.

Vos données seront anonymisées et identifiées par un code.

Conformément aux dispositions de la loi relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés, vous disposez à tout moment d'un droit d'accès et de rectification des données informatisées vous concernant (loi n° 2004-801 du 6 août 2004 modifiant la loi n° 78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés). Vous disposez également d'un droit d'opposition à la transmission des données couvertes par le secret professionnel susceptibles d'être utilisées dans le cadre de cette recherche et d'être traitées. Vous pouvez également accéder directement ou par l'intermédiaire du médecin de votre choix à l'ensemble de vos données médicales en application des dispositions de l'article L1111-7 du code de la santé publique. Ces droits s'exercent auprès du médecin qui vous suit dans le cadre de la recherche et qui connaît votre identité.

Votre participation à cette étude est entièrement volontaire et vous avez le droit de refuser d'y participer. Dans ce cas-là, vous continuerez à bénéficier de la meilleure prise en charge médicale possible, conformément aux connaissances actuelles.

Si vous acceptez d'y participer, merci de bien vouloir prendre quelques minutes de votre temps pour remplir ce questionnaire. Faites-le en toute franchise et avec soin, s'il vous plaît.

Nous vous remercions par avance pour votre participation

AUTO-QUESTIONNAIRE

Numéro GECSA : | | | . | | | |

Date : | | | . | | | . | | | |

Avez-vous un partenaire sexuel <u>régulier</u> ?	☐ oui	☐ non	
<i>Si oui, ce partenaire est :</i>	☐ un homme	☐ une femme	
<i>son statut VIH/SIDA est :</i>	☐ positif	☐ négatif	
	☐ il m'est inconnu		
<i>a-t-il déjà eu des maladies sexuellement transmissibles :</i>	☐ oui	☐ non	
Avez-vous eu des partenaires <u>occasionnels</u> au cours des 12 derniers mois ?	☐ oui	☐ non	
Combien de partenaires sexuels avez-vous eu			
<i>- au cours des 3 derniers mois ?</i>			
<i>- au cours des 12 derniers mois ?</i>			
<i>- dans votre vie ?</i>	☐ 1 à 5	☐ 6 à 10	
	☐ 11 à 15	☐ 16 à 20	
	☐ plus de 20		
Avant de connaître votre séropositivité pour le VIH/SIDA aviez-vous des rapports protégés ? <i>(une seule réponse)</i>	☐ toujours		
	☐ occasionnellement		
	☐ jamais		
Au cours des 12 derniers mois, avez-vous utilisé des préservatifs ? <i>(une seule réponse)</i>	☐ toujours		
	☐ souvent		
	☐ rarement		
	☐ jamais		
	☐ non pratiqué		
Avez-vous des troubles au niveau génital ?	☐ oui	☐ non	
<i>Si oui, précisez :</i>	☐ pertes récentes anormales		
	☐ démangeaisons		
	☐ douleurs urinaires		
	☐ saignements entre les règles		
	☐ rapports douloureux		
	☐ autre :		
Avez-vous eu connaissance d'avoir eu une autre infection sexuellement transmissible ?	☐ oui	☐ non	
<i>Si oui, précisez :</i>	☐ chlamydiae		
	☐ gonocoque		
	☐ herpès génital		
	☐ syphilis		
	☐ condylomes (HPV)		
	☐ je ne sais pas		
Avez-vous été traitée pour une infection sexuellement transmissible ?	☐ oui	☐ non	
<i>Si oui, il y a combien d'années ?</i>			

ANNEXE C : FICHE D'INCLUSION

FICHE D'INCLUSION

A remplir par le clinicien

Numéro GECSA : |_|_|_|_|. |_|_|_|_|_|

Date de naissance : .|_|_|_|_|. |_|_|_|_|_| (mm/aaaa)

Date de suivi : |_|_|_|_|. |_|_|_|_|. |_|_|_|_|_|

Patiente symptomatique : ☐ oui ☐ non

Si oui, consultation gynécologique programmée : ☐ oui ☐ non

Auto-prélèvement réalisé : ☐ oui ☐ non

Auto-questionnaire rempli : ☐ oui ☐ non

Résultats de l'auto-prélèvement :

Date du prélèvement : |_|_|_|_|. |_|_|_|_|. |_|_|_|_|_|

M. genitalium ☐ positif ☐ négatif

C. trachomatis ☐ positif ☐ négatif

Si 1 ou 2 résultat(s) positif(s), consultation gynécologique programmée : ☐ oui ☐ non

Résultats du bilan infectieux si visite chez le gynécologue :

Date du prélèvement : |_|_|_|_|. |_|_|_|_|. |_|_|_|_|_|

M. genitalium : ☐ positif ☐ négatif

C. trachomatis : ☐ positif ☐ négatif

Autres :

M. hominis : ☐ positif ☐ négatif Si positif, seuil :

U. urealyticum : ☐ positif ☐ négatif Si positif, seuil :

Gonocoque : ☐ positif ☐ négatif

Trichomonas : ☐ positif ☐ négatif

Candida sp. ☐ positif ☐ négatif

Syphilis : TPHA : |_|_|_|_|_|_|_|_|_|_| VDRL : |_|_|_|_|_|

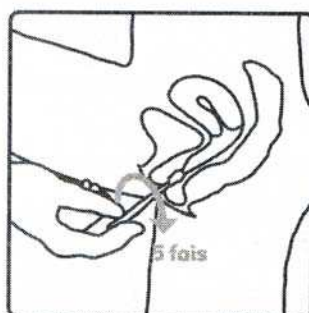
Comment réaliser l'autoprélèvement génital ?

ETAPE 1



Choisir la position qui vous convient le mieux : debout la jambe surélevée ou accroupie.
Introduire le bout du coton dans le vagin. Inutile de l'enfoncer profondément.

ETAPE 2



Tourner le coton-tige 5 fois,
puis le sortir du vagin.

Résultats préliminaires

Ce protocole a été validé sur le plan méthodologique par l'ISPED, puis présenté au CPP qui, compte tenu du caractère peu invasif du protocole, n'a pas retenu l'indication d'une Saisine du comité pour entreprendre la recherche. Le jour de l'inclusion une information orale est réalisée avec remise d'une notice d'information. L'auto-questionnaire est anonymisé et les résultats des analyses biologiques seront aussi traités de façon anonyme lors de l'analyse finale. Le protocole a été édité dans sa version définitive au mois d'octobre 2008 et le CHU a accepté d'en assurer la promotion.

Les premières inclusions ont débuté en novembre 2008 et se poursuivent toujours. Au 19 juillet 2010, 86 patientes avaient été incluses. Pour l'une d'elles notre laboratoire n'a pas reçu de prélèvement. La moyenne d'âge était de 39,5 ans, avec des extrêmes de 20 à 50 ans.

Concernant les résultats biologiques, trois patientes sur 85 présentaient une PCR positive pour *M. genitalium*, soit 3,53 %. Une première patiente était symptomatique et présentait un tableau d'endométrite clinique, confirmée par les examens complémentaires. En l'absence d'autre étiologie microbiologique, le diagnostic d'endométrite à *M. genitalium* a été posé dont l'évolution a été favorable sous moxifloxacine. Les deux suivantes étaient des patientes asymptomatiques. La deuxième a eu un examen gynécologique, sans lésion de cervicite authentifiée, et avec un prélèvement endocervical négatif pour *M. genitalium*. La troisième a eu un examen, mais en raison d'un antécédent de conisation, il n'a pas été réalisé de prélèvement endocervical, la PCR sur le prélèvement vaginal de contrôle était également négative. Toutes deux ont été traitées par azithromycine pendant 5 j. A ce jour, aucun prélèvement n'est positif pour *C. trachomatis*.

Deux des trois prélèvements *M.genitalium*-positifs (B19356 et B22053) ont été typés par MLVA et ont été inclus à notre collection de prélèvements typés par MLVA, présentée dans le Tableau 1 de notre publication.

Les auto-questionnaires, permettant de relier les résultats microbiologiques aux comportements sexuels, seront analysés à la fin des inclusions.

Globalement ce protocole est bien accepté par les patientes, sans refus d'inclusion. L'auto-écouvillonnage est également bien accepté et ne pose pas de problème pratique pour sa réalisation et pour son analyse au laboratoire.

CHAPITRE 2
DEVELOPPEMENT DE LA MLVA POUR LE
TYPAGE MOLECULAIRE DE
MYCOPLASMA GENITALIUM

CHAPITRE 2 : DEVELOPPEMENT DE LA MLVA POUR LE TYPAGE MOLECULAIRE DE *MYCOPLASMA GENITALIUM*

Résumé

Dans cette étude, nous rapportons le développement d'un schéma MLVA (« multiple-locus variable-number tandem-repeat (VNTR) analysis ») utilisé pour le typage moléculaire de *Mycoplasma genitalium*. Le génome de la souche de référence G37 de *M. genitalium* a été analysé à la recherche de VNTR et six des 47 VNTR identifiés ont été finalement utilisés pour la MLVA. La MLVA a pu être appliquée directement aux prélèvements cliniques, ce qui était indispensable pour cette espèce dont la culture est exceptionnelle. Les six VNTR ont été multiplexés en deux PCR triplexes. Les amorces servant à amplifier les différents loci ont été marquées et les produits de PCR analysés par électrophorèse capillaire. Une collection de 123 prélèvements français et tunisiens ont été étudiés par cette méthode et 110 (89,4 %) ont pu être correctement amplifiés et typés. Soixante dix-huit types MLVA ont été déterminés et seulement sept sets de deux prélèvements non reliés épidémiologiquement avaient des profils génotypiques concordants. Concernant les 24 prélèvements concomitants pour un même patient (12 sets de deux prélèvements), il existait une bonne concordance génotypique. L'important nombre de types MLVA déterminés dans cette étude confirme l'hétérogénéité génétique de *M. genitalium*, suggérant que cette espèce est endémique en France et en Tunisie et que la dissémination de l'infection n'est pas clonale. Ce schéma MLVA a été comparé à deux autres méthodes génotypiques, l'analyse SNP du gène *mgpB* et la combinaison de l'analyse d'un VNTR et du typage SNP de *mgpB*. La MLVA a un pouvoir discriminant supérieur aux deux autres méthodes, avec un indice de diversité de 1 ; mais, à la différence des deux autres méthodes, la MLVA ne nécessite pas de séquençage. L'utilisation de cette méthode MLVA pourra être désormais envisagée pour des études épidémiologiques des infections génitales à *M. genitalium* et appliquée à des couples infectés de façon concomitante.

Development of a Multiple-Locus Variable-Number Tandem-Repeat Analysis (MLVA) for *Mycoplasma genitalium* Molecular Typing

C. Cazanave^{1,3}, A. Charron¹, H. Renaudin², and C. Bébéar^{1,2*}

¹Laboratoire de Bactériologie EA 3671, Université Victor Segalen Bordeaux 2, 33076 Bordeaux, France

²Laboratoire de Bactériologie, CHU de Bordeaux, 33076 Bordeaux, France

³Service de Maladies infectieuses, CHU de Bordeaux, 33076 Bordeaux, France

*Corresponding author

Cécile Bébéar

Laboratoire de Bactériologie EA 3671, Mycoplasma and chlamydiae infections in humans, Université Victor Segalen Bordeaux 2, 146 rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux Cedex, France. Phone (33) 5.57.57.16.25. Fax (33) 5.56.93.29.40.

Electronic mail address: cecile.bebear@u-bordeaux2.fr

Running title: MLVA typing of *Mycoplasma genitalium*.

Article soumis à Journal of Clinical Microbiology

Abstract

In this study, we report the development of a multiple-locus variable-number tandem-repeat (VNTR) analysis (MLVA) method for the molecular typing of *Mycoplasma genitalium*. The genome of *M. genitalium* G37 was analyzed for VNTRs, and 6 of the 47 identified VNTRs were used for an MLVA. The method can be used directly with clinical specimens and was based on a GeneScan analysis of VNTR loci labeled with fluorescent dyes by multiplex PCR and capillary electrophoresis. This approach was applied to a collection of 123 samples from France and Tunisia, of which 89.4% were amplified and typed. Seventy-eight different MLVA types were identified, and only seven sets of two unrelated specimens had matching genotype profiles. A high degree of concordance was detected between specimens collected from the same patients. Genetic heterogeneity, revealed by the large number of MLVA types, suggested that *M. genitalium* was endemic in France and Tunisia and that the infections were not due to a clonal dissemination. The VNTR assay was compared to the *mgpB* single nucleotide polymorphism (SNP) typing method and to an analysis using a combination of a VNTR marker in locus MG309 and the *mgpB* SNP. The VNTR assay had a better resolution than both of these other methods; MLVA had the highest discriminatory power (Hunter-Gaston diversity index [HGDI] of 1.00), but unlike the other two methods, MLVA did not require a fastidious sequencing step. The use of the VNTR markers in MLVA in future studies of sexual networks of *M. genitalium* infection is proposed.

INTRODUCTION

Mycoplasma genitalium is a sexually transmitted pathogen (8) that is a recognized cause of urethritis in men (12) and cervicitis (19) and endometritis (3) in women. *M. genitalium* has been also associated with pelvic inflammatory disease (4, 27) and tubal factor infertility (28). *M. genitalium* is an extremely fastidious species that is difficult to isolate from clinical specimens. Currently, clinical strain identification is dependent on the use of polymerase chain reaction (PCR) (13).

Several methods have been developed for the molecular typing of *M. genitalium*. Most of these methods are based on a specific genomic locus analysis, such as restriction fragment length polymorphism (RFLP) of the MG192 (*mgpC*) gene (24) and single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the rRNA operon (17) or the conserved MG191 (*mgpB*) gene (8). Recently, multilocus genotyping was proposed in combination with a short tandem repeat (TR) analysis of lipoprotein (LP) genes and SNPs in rRNA or *mgpB* genes (18). However, the majority of molecular typing in *M. genitalium* and most of the clinical sequences that are currently available are based on the *mgpB* gene, which encodes the adhesin MgPa (8, 10, 23).

Multiple-locus variable-number tandem-repeat (VNTR) analysis (MLVA) is a new genotyping method that has been applied successfully to several bacterial species (30). MLVA is based on the variation between isolates in the copy numbers of tandem repeated sequences at different genomic loci. MLVA has been used successfully to subtype *Mycoplasma* isolates of one species that infects humans, *Mycoplasma pneumoniae* (6), and two species that infect other animals, *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC (20) and *Mycoplasma agalactiae* (21).

The present study developed an MLVA scheme using VNTR loci selected from the sequence of the only published *M. genitalium* genome, isolate G37, and applied it to a large collection of French and Tunisian *M. genitalium* clinical samples. The method was compared to the *mgpB* SNP typing method (8) and to a combination analysis of a VNTR marker in MG309 and *mgpB* SNPs (18).

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains, specimens, culture and DNA preparation. Thirteen *M. genitalium* strains (Table 1) were used in this study, including two reference

strains (*M. genitalium* G37 (ATCC 33530) and M30 (ATCC 49895)) and the seventh passage of the M30 strain (designated M30 early, acquired from the Mollicutes Collection of Cultures and Antisera, Gainesville, Florida). Ten clinical strains isolated from genital tract specimens were also analyzed, including three isolates (M6151 on day 1, M6090 on day 41, and M6312 on day 79) obtained from the same French male patient, six strains from Denmark and one strain from Sweden (1, 13). The growth conditions used for the *M. genitalium* strains have been described previously (32). DNA was isolated with a MagNa Pure LC DNA Isolation Kit I (Roche Diagnostics, France) according to the manufacturer's instructions.

Clinical specimens

A total of 123 samples that were collected between 2001 and 2009 from 111 unrelated patients were analyzed: 109 from France (105 from Bordeaux and 4 from Paris) and 14 from Tunisia. Most samples (99) were single patient samples, with the exception of 12 sets of 2 samples taken from the same patients. Characteristics of the specimens that were analyzed by the MLVA typing method are shown in Table 1. The study was conducted in accordance with the guidelines of the ethical committees of the participating hospitals. Specimens were collected as part of routine patient management without any additional sampling. All patient data were anonymously reported, with no possibility of connecting the isolates to individual patients.

***mgpB* SNP typing.** PCR amplification and sequencing of 281 base pairs (bp) of the MG191 conserved region were adapted from previously described methods (8) using the MgPa-1/MgPa-3 primer set (14). Samples were initially denatured at 94°C for 4 min and were then subjected to 40 cycles of 94°C for 30 s, 67°C for 30 s and 72°C for 30 s, with a final extension step of 72°C for 10 min. *mgpB* SNP typing was performed for 82 specimens, including 12 sets of 2 samples taken from the same French patients (24 total samples), 14 Tunisian samples, and 44 single French samples. Out of these 44 specimens, 24 had a single allele at all 6 loci of the MLVA assay. A SNP type was assigned to each specimen according to previously described types (8, 10, 18, 23).

Identification of TRs. VNTR markers were identified in the *M. genitalium* G27 sequenced genome (7) using the Tandem Repeats Finder program with the

Microorganisms Tandem Repeats database (<http://minisatellites.u-psud.fr>) and the Sputnik database (<http://www.cbib.u-bordeaux2.fr/pise/sputnik.html>). Loci were chosen if they had >75% matches between the DNA sequences of the repeat units.

To screen for variability in the number of TRs, PCR primers targeting the region flanking the TR loci were designed. As a preliminary step, 47 selected VNTRs (26 from the MLVA database and 21 from the Sputnik database) were tested with specific primers to amplify DNA from 13 *M. genitalium* strains, including the 2 reference strains. Each locus was amplified individually and analyzed by agarose gel electrophoresis. To confirm that length polymorphisms were the result of repeat copy number variations, products were purified with a Wizard PCR Preps DNA Purification System (Promega) and sequenced using fluorescently labeled dideoxynucleotide technology (Applied Biosystems) according to the manufacturer's recommendations. Six VNTR loci were chosen for further assessment based on these preliminary analyses. The three previously described TR loci, MG307-STR, MG309-STR, and MG338-STR, were named according to a previous study (18), and three TR loci described in this study, Mge1, Mge2, and Mge3, were designated with the letters "Mge" followed by a number corresponding to each genomic position.

MLVA typing. The six loci selected for MLVA were multiplexed in two solutions, T1 and T2. The two triplex PCRs were performed with a Mastercycler ep gradient S thermal cycler (Eppendorf, Hamburg, Germany) in a final volume of 25 µL. The reaction mixtures were composed of 1X Qiagen PCR buffer containing 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM each deoxynucleotide triphosphate, 2.5 mM and 3 mM MgCl₂ for solutions T1 and T2, respectively, 0.625 U HotStart *Taq* polymerase (Qiagen, Hilden Germany), 0.5 µM each primer pair (Mge1-F–Mge1-R, MG338-STR-F–MG338-STR-R, and Mge3-F–Mge3-R for solution T1 or MG307-STR-F–MG307-STR-R, MG309-STR-F–MG309-STR-R, and Mge2-F–Mge2-R for solution T2), and 5 µL of template DNA. Forward or reverse primers were fluorescently labeled at their 5' ends with 4,4',7,2',4',5',7'-hexachloro-6-carboxyfluorescein (HEX), 6-carboxyfluorescein (FAM; Eurogentec, France) or 2'-chloro-5'-fluoro-7',8'-fused phenyl-1,4-dichloro-6-carboxyfluorescein (NED, Applied Biosystems), depending on the locus to be amplified (Table 2). Both multiplex solutions were performed under similar conditions: 95°C for 15 min followed by 40 cycles of 95°C for 45 s, 58°C or 54°C for 1 min for solutions T1 or T2, respectively, and 72°C for one min, with a final elongation step of

72°C for 10 min. Prior to GeneScan analysis, 5 µL of each amplicon were analyzed by agarose gel electrophoresis to dilute the amplicons according to their signal intensities. For example, if no signal was observed on the gel, then the amplicon was not diluted, whereas if the signal was equal in intensity to the 500-bp band of the 100-bp DNA Ladder (Promega), the amplicon was diluted 1:100 in distilled water. Then, 1 µL of each pure or diluted amplicon was mixed with 10 µL of Hi-Di formamide (Applied Biosystems) and 0.5 µL of GeneScan ROX 500 size standard (Applied Biosystems). After heat denaturation for 5 min at 95°C and rapid cooling on ice, the fragments were separated on an ABI 3130 genetic analyzer (Applied Biosystems) and electrophoresed at 15,000 V for 20 min at 60°C. The GeneScan data were analyzed with GeneMapper software (version 4.0; Applied Biosystems) to perform sizing and calculate the numbers of repeats in the PCR fragments. Each locus was identified according to color, and an allele number string based on the number of repeats (rounded up to integer values) at each locus was assigned to all isolates.

If no signal was obtained for one or more loci of each triplex PCR, semi-nested, or nested PCRs were used. The primers that were used for primary PCRs, semi-nested PCRs, and nested PCR are listed Table 2. When two or more loci were not amplified, nested or semi-nested PCRs were multiplexed as described above. Amplifications were performed as described above, except that 25 cycles were performed and only 2 µL of amplicons from the first PCR were added to the reaction mixtures in the nested PCRs.

To further confirm the presence of heterogeneous repeat populations, some PCR products were sequenced after subcloning into the AT cloning vector pGEM-T Easy (Promega). Recombinant plasmids were transformed into *E. coli* XL1-Blue competent cells according to standard transformation protocols (26), which permit cloning of unstable DNA. For specimens containing mixed TR alleles, the proportion of individual alleles was estimated by the cloning results and the heights of the sequence chromatogram peaks. The PCR products were purified and sequenced as described above.

Data analysis. The calculated numbers of repeats were imported into the BioNumerics (version 6.0) software package (Applied Maths), and dendrograms were generated to visualize the relationships between samples according to the typing method. The BioNumerics software can evaluate the relatedness of *M. genitalium*

specimens by analyzing heterozygous genotypes and the frequency of each genotype. Dendrograms were created based on the categorical values and UPMGA for MLVA, the combination of MG309-STR and *mgpB* SNP analyses, and multiple alignments of *mgpB* SNP sequences. The polymorphism index of individual or combined VNTR loci was calculated with the Hunter-Gaston diversity index (HGDl) (9). The correlation between the repeat copy number and the prevalence of mixed alleles of TRs was assessed by Spearman's correlation test.

Stability determination. Five *M. genitalium* isolates (reference strain G37 and four clinical isolates, M2282, M2300, M6151 and M2341) were evaluated in a stability study. Each strain was passaged ten times in Hayflick modified broth medium supplemented with glucose to determine the stability of each locus before and after passaging. DNA was extracted and sequenced to identify the number of repeats in each locus.

Nucleotide sequence accession numbers. The new sequence types, types 78 to 85, of the *mgpB* conserved region obtained in this study have been deposited in GenBank under accession numbers HM565865 to HM565872.

RESULTS

Identification of VNTRs for MLVA typing and stability analyses. We identified 26 regions with TRs ranging from 3 bp to 108 bp in length in the *M. genitalium* G37 genome using the Microorganisms Tandem Repeats Database. In addition, 21 regions with 3-5-bp TRs were identified using the Sputnik database. TRs were amplified using primer pairs that were complementary to the sequences flanking each direct-repeat locus (data not shown). Preliminary amplification of these 47 loci from reference and clinical strains revealed that only 6 were polymorphic with different allele sizes.

The two reference strains, G37 and M30, had identical genotypes, while the genotype of the M30 early strain differed from that of M30 at the Mge1, MG307-STR and MG338-STR loci. Two out of three sequential isolates from a male patient from France, M6151 (isolated on day 1) and M6312 (isolated on day 79), had the same

MLVA type (Table 1), while the third isolate, M6090 (isolated on day 41), differed at the MG307-STR locus (five repeats instead of seven) (Table 1).

The stability of the six polymorphic VNTR markers was studied in five strains (one reference strain and four clinical isolates) after ten passages in Hayflick broth medium. Analysis revealed identical MLVA profiles for all markers in the five strains. Thus, an MLVA method including six markers (Mge1, Mge2, Mge3, MG307-STR, MG309-STR, and MG338-STR) that allowed unambiguous type assignment using agarose gels was proposed. The PCR product sizes ranged from 195 to 414 bp. The six loci were distributed throughout the genome, from base pair 224,535 to base pair 485,782. Three of the six VNTRs were located in LP-encoding loci (MG307-STR, MG309-STR and MG338-STR, located in the MG307, MG309 and MG338 genes, respectively) and were previously described by Ma *et al.* (18). Mge1 was located in the *mgpB* locus, which encodes the MG191 protein (P140 cytoadhesin), the main antigenic protein associated with attachment (2). Mge2 was located in the P32 adhesin locus (MG318 protein), which also encodes an adhesin that is necessary for cytoadherence and virulence. Mge3 was located in the P200-encoding locus (MG386 protein), a protein involved in gliding motility (25). The characteristics of each VNTR marker are shown in Table 3. The size of the unit repeats ranged from 3 bp for Mge1, MG307-STR, MG309-STR and MG338-STR to 30 bp for Mge2. Sequencing of the PCR products of different sizes from the 6 loci of the 13 strains confirmed the sizes and sequences of individual VNTR loci.

MLVA typing of specimens. A set of 6 VNTR markers was used to type 123 *M. genitalium* strains that were isolated from the lower urogenital tracts of unrelated French and Tunisian patients, 64 of whom (52%) were men. The use of fluorescently labeled primers in multiplex PCRs (Mge1-MG338-STR-Mge3 and MG307-STR-MG309-STR-Mge2) and capillary electrophoresis resulted in an easier interpretation of the results than could be achieved with agarose gel electrophoresis. Most loci were identified on electropherograms following the first two triplex PCRs (T1 and T2) according to their size ranges and colors. The amplicon sizes were exported and translated to allele numbers by the Genetic Analyzer software (Applied Biosystems). For 35 out of 123 (28.5%) samples, one or more VNTRs were not amplified in the triplex PCRs, so nested or semi-nested PCR was applied to these samples to amplify the VNTRs. The 6 VNTRs were successfully amplified in 110 out of 123 (89.4%)

samples. Analysis of the 6 VNTR loci for the 110 *M. genitalium* isolates revealed 78 MLVA types and 16 matching or identical MLVA profiles (Table 1, Fig. 1).

According to the electropherograms, some samples had multiple alleles at different TR loci, as described previously (18). Multiple alleles in at least one TR locus were identified in 55 of 110 (50%) samples, corresponding to 53 out of 98 patients (54.1%). GeneScan analysis revealed a mixture of two or more alleles of five of the six TR-containing loci: Mge1 (30%), MG307-STR (10.9%), MG309-STR (13.6%), Mge2 (3.6%), and MG308-STR (14.5%). The prevalence of mixed sequences in Mge1, MG307-STR, MG309-STR and MG338-STR did not increase significantly with repeat copy number (Spearman's correlation coefficient, $p > 0.05$). For samples containing multiple alleles, the genotypes are listed in order from predominant to minor types (Table 1). To verify the presence of multiple alleles as determined by the Genetic Analyzer, we subcloned PCR products from two selected specimens, B9927 and B9874, and sequenced ten plasmid clones per specimen. According to the GeneScan results, specimen B9927 contained a mixture of 9, 10 and 11 repeats at the MG309-STR locus, and specimen B9874 contained a mixture of 6 and 10 repeats at the MG338-STR locus. Furthermore, plasmid cloning of specimen B9927 revealed the presence of a fourth allele (9, 10, 11 and 12 repeats). This finding provided evidence that multiple alleles identified in VNTR loci could not be attributed to GeneScan artifacts.

Samples were considered to have matching profiles if they had identical alleles at all loci or if they shared at least one common allele at each of the six VNTR loci when mixed TR alleles were present. Sets of 2 samples obtained from single patients had identical genotypes in 9 out of 12 cases (Table 1, Fig. 1). Two patients had a difference of one repeat at the Mge1 locus between samples (samples P01/P02 and B14604/B14608), while another patient had a three-repeat difference at the MG338-STR locus (samples B11554/B11555).

The MG309-STR and MG338-STR markers were the most discriminatory VNTRs, with 15 and 13 different alleles, respectively, and repeat copy numbers ranging from 7 to 22 and 4 to 17, respectively. The third LP TR, MG307-STR, was also a very discriminatory VNTR, with 13 allele sizes and repeat numbers ranging from 1 to 14. Mge1 had 11 alleles with repeat numbers ranging from 4 to 14, whereas Mge2 and Mge3 produced three and two PCR products of different sizes, respectively. Mge3 was the most homogeneous marker, with all except two samples having 4 21-bp

repeats. This difference in discriminatory power was also reflected by the diversity index (DI) of each VNTR, calculated using 38 specimens with a single allele at the 6 loci (Table 1, only one set of samples from the same patient was analyzed). The DI, estimated from the HGDI, was 0.898 for MG338-STR, the most discriminatory marker, and 0.053 for Mge3, the least discriminatory marker (Table 3).

As a complementary analysis, the MLVA profiles were imported to the BioNumerics software package (Applied Maths), and the genetic relationships of the 110 specimens were deduced by constructing a hierarchical dendrogram (Fig. 1). This population modeling lacked distinct clusters, highlighting the diversity among the tested samples. There was no obvious link between the MLVA type and the specimen collection year, patient age, patient gender, clinical syndrome, isolation site or geographic origin (Fig. 1).

***mgpB* SNP typing.** *mgpB* SNP typing was performed on 82 samples, all but 1 of which were typed with the MLVA assay. In 72 out of 82 (87.8%) samples, a single sequence variant was amplified from each specimen. Nineteen different sequence types were identified (Table 1), and eight new sequence types (types 78 to 85) were described. As a complementary analysis, 71 sequences of samples typed by both *mgpB* SNP and MLVA were imported to the BioNumerics software package (Applied Maths) in FASTA format, and a dendrogram was constructed (Fig. 2B). This finding highlighted the diversity among the samples, with distinct clusters corresponding to the more frequent sequence types of 1, 2, and 4. A new sequence type (type 78) was identified in 12 French and Tunisian samples. Interestingly, these samples were collected between 2002 and 2004 and could correspond to a clonal dissemination. However, this distribution was not identified with the MLVA method (Fig. 2A) or with the combination analysis of the MG309-STR marker and *mgpB* SNP (Fig. 2C). Notably, 75% of the 71 samples corresponded to 4 sequences types (1, 2, 4 and 78), each of which contained at least 11 samples. Three consecutive isolates from a male patient from France all had sequence type 2 (Table 1).

Comparison of the MLVA, *mgpB* SNP and the combination analysis of the MG309-STR marker and *mgpB* SNP for the molecular typing of *M. genitalium* samples. Our MLVA scheme was compared to *mgpB* SNP typing, the most commonly used method, and to the MG309-STR TR marker and *mgpB* SNP

combination analysis that was recently proposed by Ma *et al.* (18). The DI for each method was calculated using 38 specimens with a single allele at the 6 loci, which were used in the MLVA assay and also typed by the *mgpB* SNP assay (Table 1). The DIs were 1.00 for the MLVA method, 0.986 for the MG309-STR and *mgpB* SNP combination analysis and 0.872 for the *mgpB* SNP assay alone.

Clustering dendrograms were constructed that included the 71 samples typed by both the MLVA and *mgpB* SNP assays (Table 1); one with MLVA profiles (Fig. 2A), one with *mgpB* SNP typing data (Fig. 2B) and one with data from an MG309-STR TR and *mgpB* SNP combination analysis (Fig. 2C). No correlations were detected between the MLVA and the *mgpB* SNP. Furthermore, a congruence analysis of the two methods, calculated with the BioNumerics software, confirmed the absence of congruence. Combining the results of the 2 methods for the 71 samples using BioNumerics provided no additional information (data not shown).

The congruence between MLVA and the marker combination proposed by Ma *et al.* (18) was also low (9.4%). The DI values of both methods indicated that some specimens containing identical MG309-STR and *mgpB* SNP genotypes, such as B10187, B13748, B22297, B9353 and T391 (Fig. 2C), could be still distinguished by the MLVA scheme (Fig. 2A).

DISCUSSION

MLVA has been used to genotype several bacterial species, including the three *Mycoplasma* species, *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC (20), *M. agalactiae* (21) and *M. pneumoniae* (6). Recently, a multilocus genotyping assay was developed for *M. genitalium* that combined TR sequences and *mgpB* SNPs (18). In this study, we evaluated the applicability of MLVA to type *M. genitalium*. We performed MLVA with a group of 123 geographically diverse and temporally separated samples from unrelated French and Tunisian patients. A set of 6 VNTR markers that can be used to genotype 13 *M. genitalium* isolates by simple PCR and agarose gel electrophoresis was defined. Three VNTR markers, MG307-STR, MG309-STR and MG338-STR, were previously published (18), and three others, Mge1-3, were described in this study. To improve the assay, two triplex PCRs with fluorescently labeled primers were performed; one to amplify the Mge1, MG338-STR, and Mge3 loci and one to amplify the MG307-STR, MG309-STR, and Mge2 loci. Amplification

was successful in 71.5% of the specimens, and after a second round of nested or semi-nested PCR for the specimens that were not originally amplified, 89.4% of the 123 specimens were typed. Multiplex PCR and capillary electrophoresis on a Gene Analyzer enabled high-throughput analysis and allowed an easier interpretation of results compared to agarose gel electrophoresis, particularly for VNTRs with small numbers of repeat units. In comparison, the *mgpB* SNP typing resulted in amplification of 87.8% of the specimens, higher than the percentage reported in a recent study using this typing method (38.9%) (23) but slightly lower than the percentage described for MLVA in this study. Furthermore, SNP typing is laborious and requires an unambiguous sequence analysis of 281 bp.

A disadvantage of MLVA for *M. genitalium* typing is the presence of mixed repeat patterns that were identified at certain loci in 50% of the specimens, which may complicate the analysis of the results. However, these mixed patterns could be separated and their copy number quantified by fluorescent fragment sizing without sequencing. The mixed patterns were controlled in our study by subcloning and sequencing two representative specimens. Mixed repeat patterns have been described in *M. genitalium* for the MG307, MG309, and MG338 TRs, and the mixed alleles were identical between couples who were infected simultaneously, confirming the stability of these highly discriminatory genotypes (18). In our study, mixed TR alleles were not associated with larger repeat copy numbers in the six VNTR loci. In each of the samples containing mixed TR alleles that were analyzed in our study, the individual alleles generally differed by only one or two repeat units, and there was no evidence of mixed alleles in the *mgpB* SNP analysis. Thus, the presence of mixed alleles was probably not due to co-infections with two or more distinct isolates. Mixed TR alleles are believed to be caused by slipped strand mispairing during DNA replication (15). The intrahelical process of slipped-strand mispairing is likely to be a major factor in the initial expansion of short repeated motifs, as in our four trinucleotide patterns; simple tandem repeats may be predisposed to further expansion after the initial expansion by unequal crossing over or other interhelical events due to their propensity to mispair (15, 31). Moreover, environmental stresses may increase the phylogenetic diversity measured by MLVA (5). This phenomenon could explain the presence of mixed TR alleles during infection, an environmental stress for *M. genitalium*.

VNTR stability was evaluated in vitro in five strains by determining the number of repeats before and after ten passages in broth medium. Reproducibility was verified with a group of 24 samples that was composed of sets of 2 samples taken from 12 patients, and matching genotype profiles were observed in 9 out of 12 cases. Specimens taken from the same patients only varied at a single TR locus, with a one-repeat difference observed in two of the three patients. However, these specimens (P01/P02, 11554/11555, and 14607/14608) were closely related, as indicated by the dendrogram analyses (Fig. 1). Moreover, for samples B14607 and B14608, which were taken from the same patient, we hypothesized that co-infection of two different *M. genitalium* isolates occurred because the MLVA genotypes and *mgpB* SNP types differed between the samples (Table 1).

The discriminatory power of this MLVA scheme with 6 markers was 1.00 for 38 samples. Ideally, the DI should be 1.00; in practice, it should be at least 0.90-0.95 for a typing system to be considered more or less ideal (29); the global HGDI of our MLVA method exceeded this value. However, the HGDI value must be interpreted while considering the discriminatory powers of the other typing methods used in this study. In comparison, the HGDI of the *mgpB* SNP typing method of the 38 samples was 0.872, and the HGDI of the combination of MG309-STR marker and *mgpB* SNP analyses was 0.986, similar to the previously described value of 0.989 (18). The allelic diversity of the VNTR loci varied significantly at each locus, and the four trinucleotide markers (Mge1, MG307-STR, MG309-STR and MG338-STR) were more discriminatory than others (Mge2 and Mge3) that had larger repeat sizes. In theory, the association of this set of markers with variable HGDI makes this MLVA set the optimal method for typing *M. genitalium* in epidemiological studies.

The six tested VNTRs are located in genes; three are located in LP-encoding genes (MG307-STR, MG309-STR, and MG338-STR) and are known to be highly variable among clinical strains (18), which could explain the allelic variation of these three markers in our study and in Ma *et al.* (18). Mge1 is located in the *mgpB* gene (MG191), and previous studies found that the short TRs in this locus could undergo extensive intra-strain variation due to DNA recombination and other mechanisms (10, 11), possibly indicating that the short TRs in this locus are unsuitable for strain typing. Mge1 is located between nt 2,886 and nt 3,080 in the *mgpB* gene sequence, downstream of the 281-bp *mgpB* conserved region (nt 179 to 460) that was analyzed for the *mgpB* SNP. Moreover, it is located outside the *mgpB* EF and G regions, which

share homology with the nine MgPar repeat sequences and undergo reciprocal recombination with them (11). Thus, Mge1 is located in an *mgpB* gene site that is not known to recombine in the G37 genome. Mge1 is an “AGT” trinucleotide repeat, and Iverson-Cabral *et al.* (11) analyzed the variability in the number of “AGT” trinucleotide repeats present in *M. genitalium* single-colony clones, revealing a stable number of AGT repeats in four out of five clones. In our study, Mge1 was stable in vitro in the five analyzed strains. In vivo stability was also detected in samples taken from the same patient; the same repeat copy number was detected between the two specimens in 10 out of 12 patients, and co-infection with two different *M. genitalium* isolates was hypothesized for 1 of the 2 discordant patients. Moreover, this VNTR was stable in sequential isolates from a French patient; however, with a DI of 0.797, it was not the most discriminatory marker and was less variable than the MG338- and MG309-STRs. For these reasons, we selected this VNTR for our MLVA scheme. Mge2 is located in an adhesin gene, and adhesion genes are known to have antigenic variations in *M. genitalium* (16). The Mge3 marker was located in a gliding protein gene that is not known to be variable, which could explain the absence of frequent allelic variations of this marker in our study. Furthermore, Mge2 and Mge3 had larger repeat sizes, which is a possible explanation for their lower variabilities. No clustering corresponding to geographic location, collection year, specimen origin, patient age, patient gender or clinical syndrome was observed for any of the samples tested with the MLVA method. The genetic heterogeneity, revealed by the number of MLVA types, suggested that *M. genitalium* is endemic in France and Tunisia and that infections were not the consequence of a clonal dissemination. These observations have been described for specimens from other geographic areas that were typed by the *mgpB* SNP assay (8).

The two reference strains, G37 and M30 (American Type Culture Collection), had identical MLVA types that were previously assigned using *mgpB* SNP typing (8). We confirmed that the strain M30 early, acquired from the Mollicutes Collection of Strains and Antisera (Gainesville, Florida), was different from the M30 strain that was available from the ATCC.

Our MLVA scheme was used to study the course of infection in a French patient. Three clinical isolates obtained from the same patient at different times (isolates M6151, M6090 and M6312) had different MLVA profiles. M6151 and M6312 had the same genotype, whereas M6090, temporally obtained between the other two

isolates, had an MLVA type that differed at the MG307-STR locus (Table 1). Although these strains had the same *mgpB* SNP sequence type, M6090 had a different PFGE pattern (data not shown), confirming the MLVA typing results and ruling out instability of the MG307-STR locus. The patient received tetracycline treatment between sample collections; thus, the second isolate could correspond to a reinfection of the patient with a new strain. Furthermore, due to the poor treatment efficacy of tetracyclines (22), M6312 could have resulted from the reactivation of the M6151 infection.

In the present study, we investigated the genotype profiles at 6 genomic loci in 110 specimens from 98 unrelated patients. Among them, only seven sets of two unrelated specimens had matching genotype profiles (Fig. 1). Furthermore, a high degree of agreement between specimens taken from the same patients was observed, suggesting that this MLVA typing method has sufficient epidemiological concordance. It would be interesting to test our MLVA scheme on concurrently infected couples. Because sexually transmitted infections are managed anonymously in France, specimens from couples who are infected simultaneously were not included in our study.

In conclusion, the MLVA method has been adapted to *M. genitalium* and used to type a large collection of French and Tunisian specimens. Other TR markers may be identified to improve the proposed MLVA scheme, as the genome sequencing of several strains of *M. genitalium* is ongoing. MLVA typing has a slightly higher discriminatory power than *mgpB* SNP typing and the multilocus genotyping method described by Ma *et al.* (18). Further, it has good epidemiological concordance, and unlike the other methods, it does not require a fastidious sequencing step. Furthermore, the MLVA-typing results are expressed numerically, allowing data to be exchanged among laboratories, possibly through a web-based database for *M. genitalium*, similar to those that have been developed for other bacterial species.

Acknowledgments

We thank Dr. I. Casin and Dr. A. Znazen for providing *M. genitalium* samples from the St Louis Hospital, Paris, France, and the Habib Bourguiba Hospital, Sfax, Tunisia, respectively. We are greatly indebted to Dr. J. S. Jensen, Statens Serum

Institute, Copenhagen, Denmark, for providing the Danish and Swedish clinical isolates. We are grateful to Cyril Férandon for technical assistance.

References

1. **Bébéar, C. M., B. de Barbeyrac, S. Pereyre, H. Renaudin, M. Clerc, and 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.
2. **Burgos, R., O. Q. Pich, M. Ferrer-Navarro, J. B. Baseman, E. Querol, and J. Pinol.** 2006. *Mycoplasma genitalium* P140 and P110 cytoadhesins are reciprocally stabilized and required for cell adhesion and terminal-organelle development. J. Bacteriol. **188**:8627-8637.
3. **Cohen, C. R., L. E. Manhart, E. A. Bukusi, S. Astete, R. C. Brunham, K. K. Holmes, S. K. Sinei, J. J. Bwayo, and P. A. Totten.** 2002. Association between *Mycoplasma genitalium* and acute endometritis. Lancet **359**:765-766.
4. **Cohen, C. R., N. R. Mugo, S. G. Astete, R. Odondo, L. E. Manhart, J. A. Kiehlbauch, W. E. Stamm, P. G. Waiyaki, and P. A. Totten.** 2005. Detection of *Mycoplasma genitalium* in women with laparoscopically diagnosed acute salpingitis. Sex. Transm. Infect. **81**:463-466.
5. **Cooley, M. B., D. Carychao, K. Nguyen, L. Whitehand, and R. Mandrell.** Effects of environmental stress on stability of tandem repeats in *Escherichia coli* O157:H7. Appl. Environ. Microbiol. **76**:3398-3400.
6. **Dégrange, S., C. Cazanave, A. Charron, H. Renaudin, C. Bébéar, and C. M. Bébéar.** 2009. Development of multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis for molecular typing of *Mycoplasma pneumoniae*. J. Clin. Microbiol. **47**:914-923.
7. **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, R. D. Fritchman, J. F. Weidman, K. V. Small, M. Sandusky, J. Fuhrmann, D. Nguyen, T. R. Utterback, D. M. Saudek, C. A. Phillips, J. M. Merrick, J. F. Tomb, B. A. Dougherty, K. F. Bott, P. C. Hu, T. S. Lucier, S. N. Peterson, H. O. Smith, C. A. Hutchison, 3rd, and J. C. Venter.** 1995. The minimal gene complement of *Mycoplasma genitalium*. Science **270**:397-403.
8. **Hjorth, S. V., E. Bjornelius, P. Lidbrink, L. Falk, B. Dohn, L. Berthelsen, L. Ma, D. H. Martin, and J. S. Jensen.** 2006. Sequence-based typing of *Mycoplasma genitalium* reveals sexual transmission. J. Clin. Microbiol. **44**:2078-2083.
9. **Hunter, P. R., and M. A. Gaston.** 1988. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. J. Clin. Microbiol. **26**:2465-2466.
10. **Iverson-Cabral, S. L., S. G. Astete, C. R. Cohen, E. P. Rocha, and 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.
11. **Iverson-Cabral, S. L., S. G. Astete, C. R. Cohen, and P. A. Totten.** 2007. *mgpB* and *mgpC* sequence diversity in *Mycoplasma genitalium* is generated

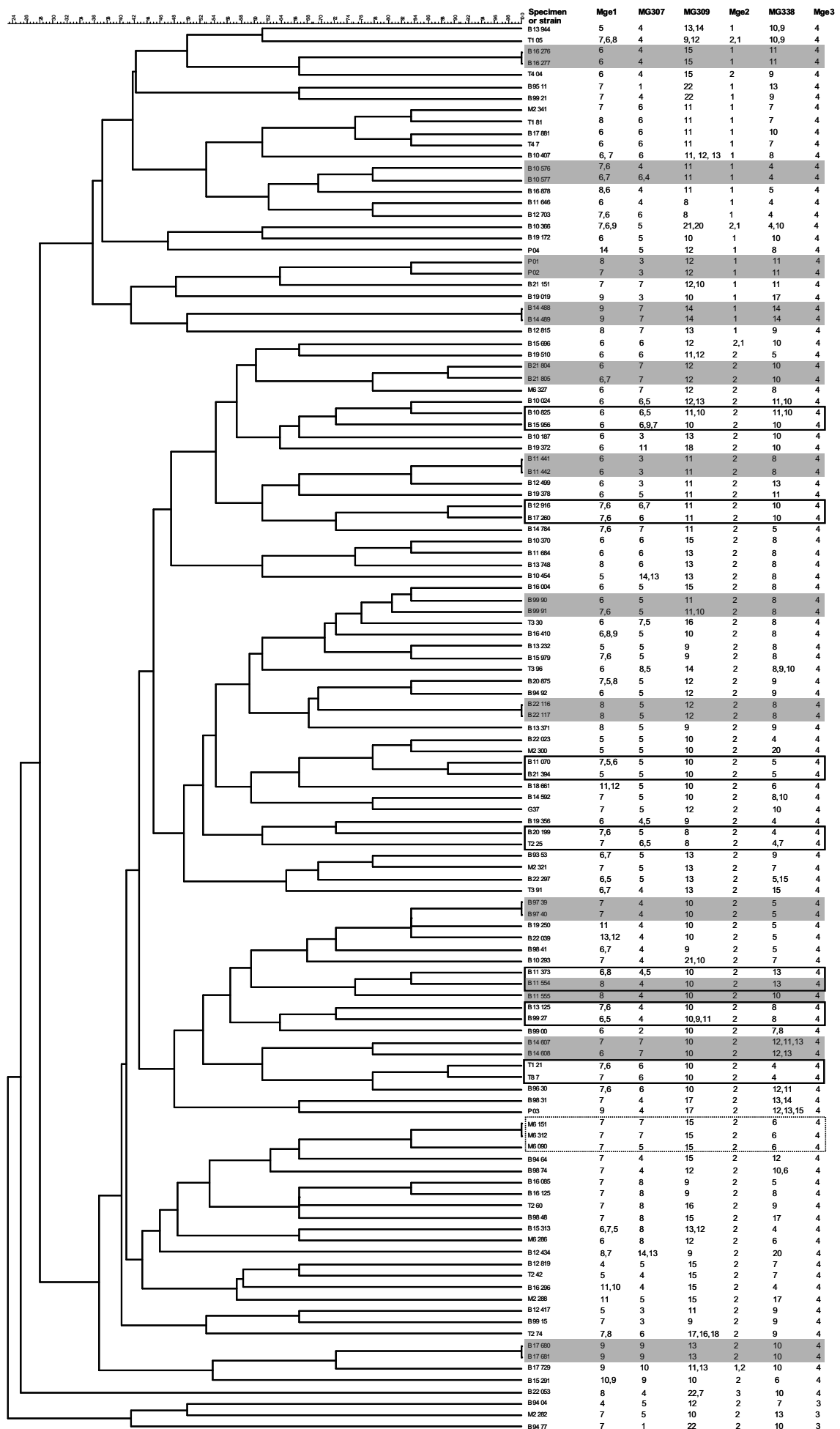
- by segmental reciprocal recombination with repetitive chromosomal sequences. *Mol. Microbiol.* **66**:55-73.
12. **Jensen, J. S.** 2004. *Mycoplasma genitalium*: the aetiological agent of urethritis and other sexually transmitted diseases. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* **18**:1-11.
 13. **Jensen, J. S., E. Bjornelius, B. Dohn, and P. Lidbrink.** 2004. Use of TaqMan 5' nuclease real-time PCR for quantitative detection of *Mycoplasma genitalium* DNA in males with and without urethritis who were attendees at a sexually transmitted disease clinic. *J. Clin. Microbiol.* **42**:683-692.
 14. **Jensen, J. S., S. A. Uldum, J. Sondergard-Andersen, J. Vuust, and K. Lind.** 1991. Polymerase chain reaction for detection of *Mycoplasma genitalium* in clinical samples. *J. Clin. Microbiol.* **29**:46-50.
 15. **Levinson, G., and G. A. Gutman.** 1987. Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution. *Mol. Biol. Evol.* **4**:203-221.
 16. **Ma, L., J. S. Jensen, L. Myers, J. Burnett, M. Welch, Q. Jia, and D. H. Martin.** 2007. *Mycoplasma genitalium*: an efficient strategy to generate genetic variation from a minimal genome. *Mol. Microbiol.* **66**:220-236.
 17. **Ma, L., and D. H. Martin.** 2004. Single-nucleotide polymorphisms in the rRNA operon and variable numbers of tandem repeats in the lipoprotein gene among *Mycoplasma genitalium* strains from clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.* **42**:4876-4878.
 18. **Ma, L., S. Taylor, J. S. Jensen, L. Myers, R. Lillis, and D. H. Martin.** 2008. Short tandem repeat sequences in the *Mycoplasma genitalium* genome and their use in a multilocus genotyping system. *BMC Microbiol.* **8**:130.
 19. **Manhart, L. E., C. W. Critchlow, K. K. Holmes, S. M. Dutro, D. A. Eschenbach, C. E. Stevens, and P. A. Totten.** 2003. Mucopurulent cervicitis and *Mycoplasma genitalium*. *J. Infect. Dis.* **187**:650-657.
 20. **McAuliffe, L., R. D. Ayling, and R. A. Nicholas.** 2007. Identification and characterization of variable-number tandem-repeat markers for the molecular epidemiological analysis of *Mycoplasma mycoides* subspecies *mycoides* SC. *FEMS Microbiol. Lett.* **276**:181-188.
 21. **McAuliffe, L., C. P. Churchward, J. R. Lawes, G. Loria, R. D. Ayling, and R. A. Nicholas.** 2008. VNTR analysis reveals unexpected genetic diversity within *Mycoplasma agalactiae*, the main causative agent of contagious agalactia. *BMC Microbiol.* **8**:193.
 22. **Mena, L. A., T. F. Mroczkowski, M. Nsuami, and D. H. Martin.** 2009. A randomized comparison of azithromycin and doxycycline for the treatment of *Mycoplasma genitalium*-positive urethritis in men. *Clin. Infect. Dis.* **48**:1649-1654.
 23. **Musatovova, O., and J. B. Baseman.** 2009. Analysis identifying common and distinct sequences among Texas clinical strains of *Mycoplasma genitalium*. *J. Clin. Microbiol.* **47**:1469-1475.
 24. **Musatovova, O., C. Herrera, and J. B. Baseman.** 2006. Proximal region of the gene encoding cytoadherence-related protein permits molecular typing of *Mycoplasma genitalium* clinical strains by PCR-restriction fragment length polymorphism. *J. Clin. Microbiol.* **44**:598-603.
 25. **Pich, O. Q., R. Burgos, M. Ferrer-Navarro, E. Querol, and J. Pinol.** 2006. *Mycoplasma genitalium* *mg200* and *mg386* genes are involved in gliding motility but not in cytoadherence. *Mol. Microbiol.* **60**:1509-1519.

26. **Sambrook, J., and D. W. Russell.** 2001. Molecular cloning : a laboratory manual, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
27. **Short, V. L., P. A. Totten, R. B. Ness, S. G. Astete, S. F. Kelsey, and C. L. Haggerty.** 2009. Clinical presentation of *Mycoplasma genitalium* infection versus *Neisseria gonorrhoeae* infection among women with pelvic inflammatory disease. Clin. Infect. Dis. **48**:41-47.
28. **Svenstrup, H. F., J. Fedder, S. E. Kristoffersen, B. Trolle, S. Birkelund, and G. Christiansen.** 2008. *Mycoplasma genitalium*, *Chlamydia trachomatis*, and tubal factor infertility-a prospective study. Fertil. Steril. **90**:513-520.
29. **van Belkum, A., P. T. Tassios, L. Dijkshoorn, S. Haeggman, B. Cookson, N. K. Fry, V. Fussing, J. Green, E. Feil, P. Gerner-Smidt, S. Brisse, and M. Struelens.** 2007. Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. Clin. Microbiol. Infect. **13 Suppl 3**:1-46.
30. **Vergnaud, G., and C. Pourcel.** 2006. Multiple Locus VNTR analysis, p. 83-104. In E. Stackebrandt (ed.), Molecular identification, Systematics, and Population Structure of Prokaryotes. Springer-Verlag, Berlin.
31. **Vogler, A. J., C. Keys, Y. Nemoto, R. E. Colman, Z. Jay, and P. Keim.** 2006. Effect of repeat copy number on variable-number tandem repeat mutations in *Escherichia coli* O157:H7. J. Bacteriol. **188**:4253-4263.
32. **Waites, K. B., C. M. Bébéar, J. A. Roberston, D. F. Talkington, and G. E. Kenny (ed.).** 2001. Cumitech 34, Laboratory diagnosis of mycoplasmal infections. American Society for Microbiology, Washington D. C.

Legends

FIG. 1. Clustering dendrogram of unrelated *M. genitalium* clinical strains and specimens based on genotype profiles at six VNTR loci. The dendrogram was constructed using categorical coefficient and UPGMA clustering and included 97 specimens from French patients (B, Bordeaux; P, Paris), 13 from Tunisia (T), 10 clinical strains (M) and the reference strain G37. For specimens containing mixed TR sequences, the genotypes are listed in order of major to minor type. Twelve sets of two concurrent samples from the same patients are highlighted in gray. Unrelated specimens with matching profiles are outlined in black. Sequential specimens from the same French patient are shown in a dotted line box.

FIG. 2. Clustering dendrograms of 71 unrelated *M. genitalium* clinical strains typed by the MLVA, *mgpB* SNP, and MG309-STR marker and *mgpB* SNP combination methods. (A) Dendrogram based on MLVA genotype profiles at six VNTR loci, constructed using categorical coefficient and UPGMA clustering. (B) Dendrogram based on *mgpB* DNA sequences, constructed using multiple alignments of the sequences. (C) Dendrogram based on the genotype profiles at the MG309-STR-TR locus and the *mgpB* SNP sequence types, constructed using categorical coefficient and UPGMA clustering. Seven sets of two concurrent samples from the same patients are highlighted in gray.



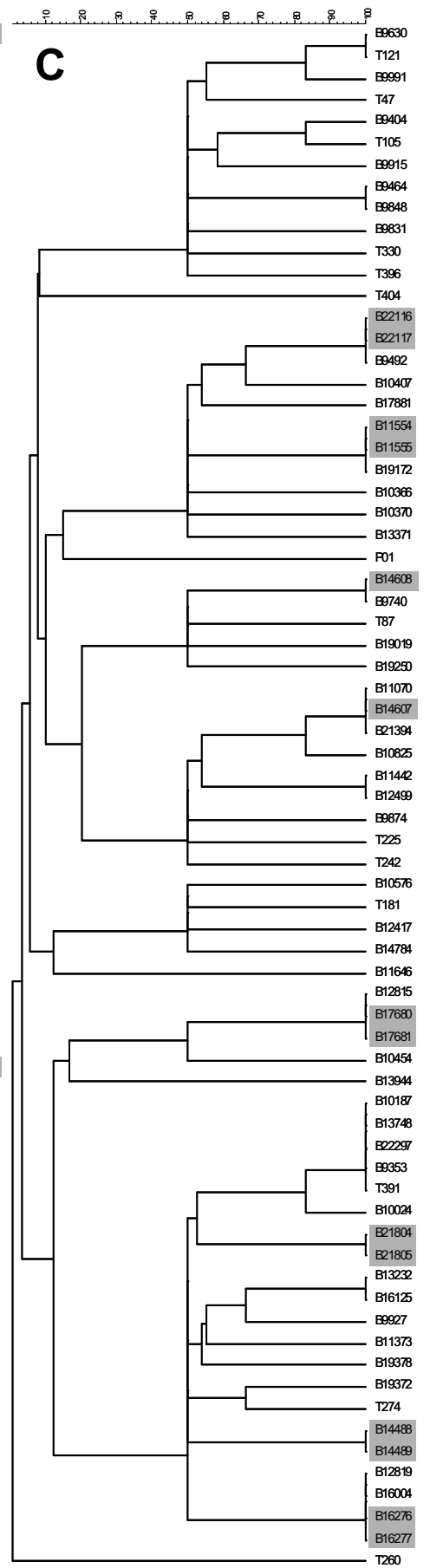
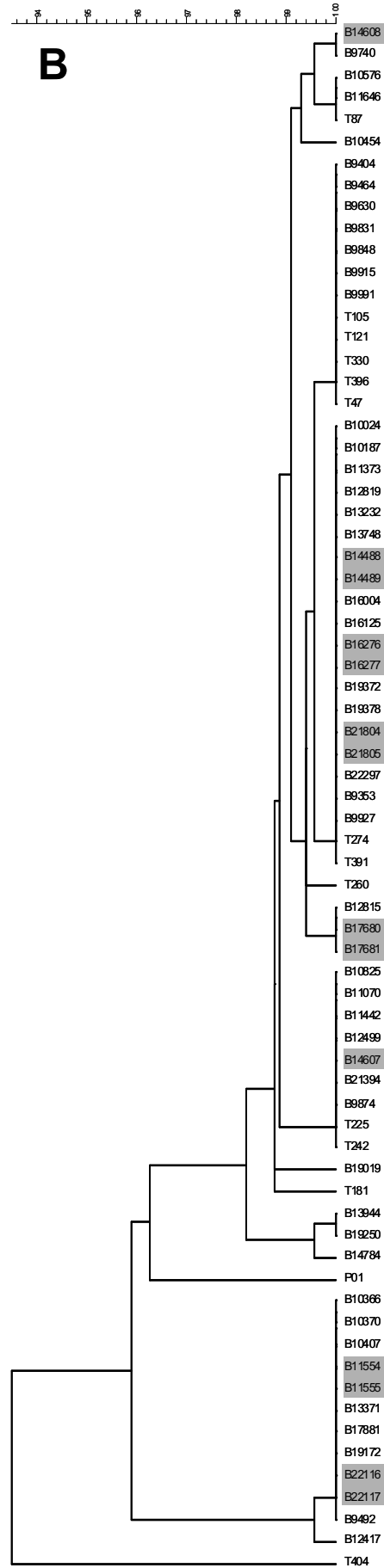
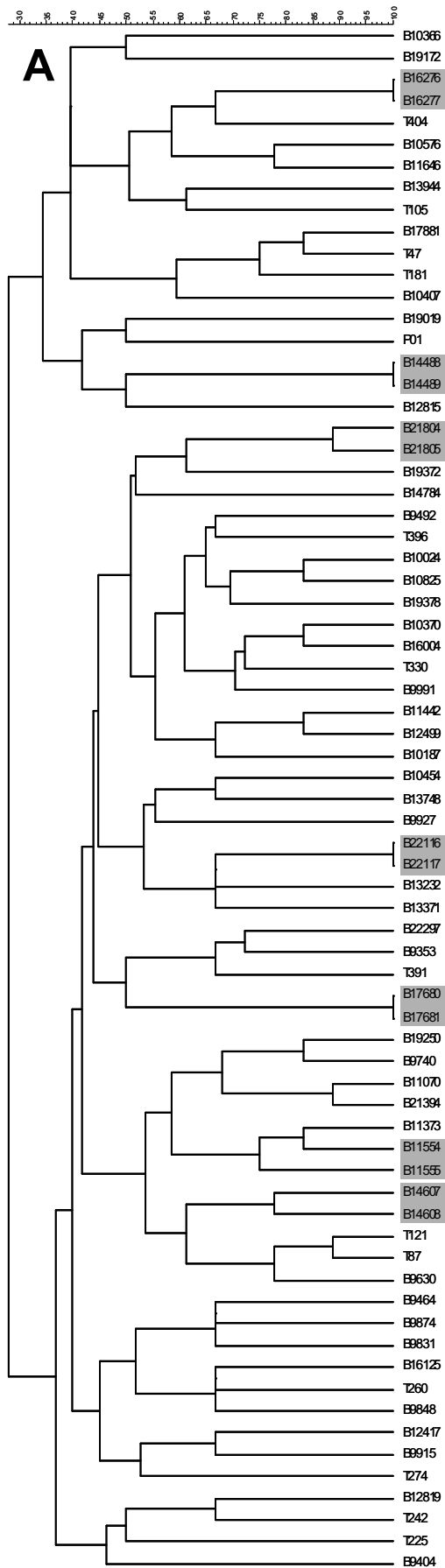


TABLE 1. Characteristics of the 13 strains and 110 *M. genitalium* samples used in this study and their MLVA and *mgpB* SNP types.

Strain or specimen ^a	Origin		Year of isolation	SNP type	No. of TRs in locus					
	Country	Source			Mge1	MG307-	MG309-	Mge2	MG338-	Mge3
						STR	STR		STR	
Strains										
G37	UK	Urethra	1985	1	7	5	12	2	10	4
M30	USA	Urethra	1984	1	7	5	12	2	10	4
M30 early	USA	Urethra	1984	2	6	6	12	2	13	4
M6151 ^b	France	Urethra	1994	2	7	7	15	2	6	4
M6090 ^b	France	Urethra	1994	2	7	5	15	2	6	4
M6312 ^b	France	Urethra	1994	2	7	7	15	2	6	4
M2282	Denmark	Urethra	2004	5	7	5	10	2	13	3
M2288	Denmark	Urethra	2004	32	11	5	15	2	17	4
M2300	Denmark	Urethra	2004	20	5	5	10	2	20	4
M2321	Denmark	Urethra	2004	11	7	5	13	2	7	4
M2341	Denmark	Urethra	2004	2	7	6	11	1	7	4
M6327	Denmark	Urethra	2006	78	6	7	12	2	8	4
M6286	Sweden	Urethra	2005	14	6	8	12	2	6	4
Specimens										
B9353	Bordeaux/France	Cervix	2003	2	6, 7	5	13	2	9	4
B9404*	Bordeaux/France	Vagina	2003	78	4	5	12	2	7	3
B9464*	Bordeaux/France	Cervix	2004	78	7	4	15	2	12	4
B9477	Bordeaux/France	Cervix	2004	ND ^c	7	1	22	2	10	3
B9492*	Bordeaux/France	Cervix	2004	4	6	5	12	2	9	4
B9511	Bordeaux/France	Cervix	2004	ND	7	1	22	1	13	4
B9630	Bordeaux/France	Urine	2004	78	7, 6	6	10	2	12, 11	4
<u>B9739</u> ^d	Bordeaux/France	Urethra	2004	ND	7	4	10	2	5	4
<u>B9740</u> *	Bordeaux/France	Urine	2004	5	7	4	10	2	5	4
B9831	Bordeaux/France	Sperm	2004	78	7	4	17	2	13, 14	4

Continued on following page

TABLE 1–Continued

Strain or specimen ^a	Origin		Year of isolation	SNP type	No. of TRs in locus					
	Country	Source			Mge1	MG307-STR	MG309-STR	Mge2	MG338-STR	Mge3
B9841	Bordeaux/France	Anus	2004	ND	6, 7	4	9	2	5	4
B9848*	Bordeaux/France	Cervix	2004	78	7	8	15	2	17	4
B9874	Bordeaux/France	Cervix	2004	1	7	4	12	2	10, 6	4
B9900	Bordeaux/France	Cervix	2004	ND	6	2	10	2	7, 8	4
B9915*	Bordeaux/France	Cervix	2004	78	7	3	9	2	9	4
B9921	Bordeaux/France	Cervix	2004	ND	7	4	22	1	9	4
B9927	Bordeaux/France	Cervix	2004	2	6, 5	4	10, 9, 11	2	8	4
<u>B9990</u>	Bordeaux/France	Cervix	2004	ND	6	5	11	2	8	4
<u>B9991</u>	Bordeaux/France	Urine	2004	78	7, 6	5	11, 10	2	8	4
B10024	Bordeaux/France	Urine	2004	2	6	6, 5	12, 13	2	11, 10	4
B10187*	Bordeaux/France	Urine	2004	2	6	3	13	2	10	4
B10293	Bordeaux/France	Cervix	2004	ND	7	4	21, 10	2	7	4
B10366	Bordeaux/France	Cervix	2004	4	7, 6, 9	5	21, 20	2, 1	4, 10	4
B10370*	Bordeaux/France	Urine	2004	4	6	6	15	2	8	4
B10407	Bordeaux/France	Cervix	2004	4	6, 7	6	11, 12, 13	1	8	4
B10454	Bordeaux/France	Cervix	2005	85	5	14, 13	13	2	8	4
<u>B10576</u>	Bordeaux/France	Urethra	2005	8	7, 6	4	11	1	4	4
<u>B10577</u>	Bordeaux/France	Urine	2005	ND	6, 7	6, 4	11	1	4	4
B10825	Bordeaux/France	Cervix	2005	1	6	6, 5	11, 10	2	11, 10	4
B11070	Bordeaux/France	Urine	2005	1	7, 5, 6	5	10	2	5	4
B11373	Bordeaux/France	Urine	2005	2	6, 8	4, 5	10	2	13	4
<u>B11441</u>	Bordeaux/France	Urethra	2005	ND	6	3	11	2	8	4
<u>B11442*</u>	Bordeaux/France	Urine	2005	1	6	3	11	2	8	4
<u>B11554*</u>	Bordeaux/France	Urethra	2005	4	8	4	10	2	13	4
<u>B11555</u>	Bordeaux/France	Urine	2005	4	8	4	10	2	10	4

Continued on following page

TABLE 1–Continued

Strain or specimen ^a	Origin		Year of isolation	SNP type	No. of TRs in locus					
	Country	Source			Mge1	MG307-	MG309-	Mge2	MG338-	Mge3
						STR	STR		STR	
B11646*	Bordeaux/France	Urine	2005	8	6	4	8	1	4	4
B11684	Bordeaux/France	Cervix	2005	ND	6	6	13	2	8	4
B12417*	Bordeaux/France	Vagina	2006	82	5	3	11	2	9	4
B12434	Bordeaux/France	Urethra	2006	ND	8, 7	14, 13	9	2	20	4
B12499*	Bordeaux/France	Vagina	2006	1	6	3	11	2	13	4
B12703	Bordeaux/France	Cervix	2006	ND	7, 6	6	8	1	4	4
B12815*	Bordeaux/France	Cervix	2006	79	8	7	13	1	9	4
B12819*	Bordeaux/France	Cervix	2006	2	4	5	15	2	7	4
B12916	Bordeaux/France	Vagina	2006	ND	7, 6	6, 7	11	2	10	4
B13125	Bordeaux/France	Vagina	2006	ND	7, 6	4	10	2	8	4
B13232*	Bordeaux/France	Urine	2006	2	5	5	9	2	8	4
B13371*	Bordeaux/France	Vagina	2006	4	8	5	9	2	9	4
B13748*	Bordeaux/France	Vagina	2006	2	8	6	13	2	8	4
B13944	Bordeaux/France	Urethra	2007	6	5	4	13, 14	1	10, 9	4
<u>B14488*</u>	Bordeaux/France	Urethra	2007	2	9	7	14	1	14	4
<u>B14489</u>	Bordeaux/France	Urine	2007	2	9	7	14	1	14	4
B14592	Bordeaux/France	Urine	2007	ND	7	5	10	2	8, 10	4
<u>B14607</u>	Bordeaux/France	Urine	2007	1	7	7	10	2	12, 11, 13	4
<u>B14608</u>	Bordeaux/France	Urethra	2007	5	6	7	10	2	12, 13	4
B14784	Bordeaux/France	Urine	2007	11	7, 6	7	11	2	5	4
B15291	Bordeaux/France	Cervix	2007	ND	10, 9	9	10	2	6	4
B15313	Bordeaux/France	Urine	2007	ND	6, 7, 5	8	13, 12	2	4	4
B15696	Bordeaux/France	Urethra	2007	ND	6	6	12	2, 1	10	4
B15956	Bordeaux/France	Vagina	2007	ND	6	6, 9, 7	10	2	10	4
B15979	Bordeaux/France	Vagina	2007	ND	7, 6	5	9	2	8	4

Continued on following page

TABLE 1–Continued

Strain or specimen ^a	Origin		Year of isolation	SNP type	No. of TRs in locus					
	Country	Source			Mge1	MG307-STR	MG309-STR	Mge2	MG338-STR	Mge3
B16004*	Bordeaux/France	Vagina	2007	2	6	5	15	2	8	4
B16085	Bordeaux/France	Urine	2007	ND	7	8	9	2	5	4
B16125*	Bordeaux/France	Urine	2007	2	7	8	9	2	8	4
<u>B16276*</u>	Bordeaux/France	Urethra	2007	2	6	4	15	1	11	4
<u>B16277</u>	Bordeaux/France	Urine	2007	2	6	4	15	1	11	4
B16296	Bordeaux/France	Vagina	2007	ND	11, 10	4	15	2	4	4
B16410	Bordeaux/France	Cervix	2007	ND	6, 8, 9	5	10	2	8	4
B16878	Bordeaux/France	Vagina	2008	ND	8, 6	4	11	1	5	4
B17260	Bordeaux/France	Cervix	2008	ND	7, 6	6	11	2	10	4
<u>B17680*</u>	Bordeaux/France	Urine	2008	79	9	9	13	2	10	4
<u>B17681</u>	Bordeaux/France	Urethra	2008	79	9	9	13	2	10	4
B17729	Bordeaux/France	Urethra	2008	ND	9	10	11, 13	1, 2	10	4
B17881*	Bordeaux/France	Urine	2008	4	6	6	11	1	10	4
B18661	Bordeaux/France	Vagina	2008	ND	11, 12	5	10	2	6	4
B19019*	Bordeaux/France	Cervix	2008	83	9	3	10	1	17	4
B19172*	Bordeaux/France	Vagina	2008	4	6	5	10	1	10	4
B19250*	Bordeaux/France	Vagina	2008	6	11	4	10	2	5	4
B19356	Bordeaux/France	Cervix	2008	ND	6	4, 5	9	2	4	4
B19372*	Bordeaux/France	Vagina	2008	2	6	11	18	2	10	4
B19378*	Bordeaux/France	Vagina	2008	2	6	5	11	2	11	4
B19510	Bordeaux/France	Vagina	2008	ND	6	6	11, 12	2	5	4
B20199	Bordeaux/France	Urine	2009	ND	7, 6	5	8	2	4	4
B20875	Bordeaux/France	Vagina	2009	ND	7, 5, 8	5	12	2	9	4
B21151	Bordeaux/France	Cervix	2009	ND	7	7	12, 10	1	11	4
B21394*	Bordeaux/France	Vagina	2009	1	5	5	10	2	5	4

Continued on following page

TABLE 1–Continued

Strain or specimen ^a	Origin		Year of isolation	SNP type	No. of TRs in locus					
	Country	Source			Mge1	MG307-STR	MG309-STR	Mge2	MG338-STR	Mge3
<u>B21804*</u>	Bordeaux/France	Urine	2009	2	6	7	12	2	10	4
<u>B21805</u>	Bordeaux/France	Urethra	2009	2	6, 7	7	12	2	10	4
B22023	Bordeaux/France	Vagina	2009	ND	5	5	10	2	4	4
B22039	Bordeaux/France	Vagina	2009	ND	13, 12	4	10	2	5	4
B22053	Bordeaux/France	Vagina	2009	ND	8	4	22, 7	3	10	4
<u>B22116*</u>	Bordeaux/France	Urethra	2009	4	8	5	12	2	8	4
<u>B22117</u>	Bordeaux/France	Urine	2009	4	8	5	12	2	8	4
B22297	Bordeaux/France	Vagina	2009	2	6, 5	5	13	2	5, 15	4
<u>P01*</u>	Paris/France	Urine	2008	84	8	3	12	1	11	4
<u>P02</u>	Paris/France	Urethra	2008	ND	7	3	12	1	11	4
P03	Paris/France	Urine	2008	ND	9	4	17	2	12, 13, 15	4
P04	Paris/France	Urine	2008	ND	14	5	12	1	8	4
T225	Tunisia	Urethra	2001	1	7	6, 5	8	2	4, 7	4
T242*	Tunisia	Urethra	2001	1	5	4	15	2	7	4
T260*	Tunisia	Urethra	2001	68	7	8	16	2	9	4
T274	Tunisia	Urethra	2001	2	7, 8	6	17, 16, 18	2	9	4
T87*	Tunisia	Urethra	2002	8	7	6	10	2	4	4
T105	Tunisia	Urethra	2002	78	7, 6, 8	4	9, 12	2, 1	10, 9	4
T121	Tunisia	Urethra	2002	78	7, 6	6	10	2	4	4
T181*	Tunisia	Urethra	2002	80	8	6	11	1	7	4
T330	Tunisia	Urethra	2002	78	6	7, 5	16	2	8	4
T391	Tunisia	Urethra	2002	2	6, 7	4	13	2	15	4
T396	Tunisia	Urethra	2002	78	6	8, 5	14	2	8, 9, 10	4
T404*	Tunisia	Urethra	2002	81	6	4	15	2	9	4
T47	Tunisia	Urethra	2003	78	6	6	11	1	7	4

Continued on following page

^a For the French samples, the town is specified before the country.

^b Sequential strains of the same patient.

^c ND, not determined.

^d Concurrent samples of the same patient are underlined.

* Samples used to calculate the Hunter-Gaston diversity index.

TABLE 2. Oligonucleotide primers used for MLVA.

Amplified TRs and primer names ^a	Dye sequence (5' → 3')	Primers used in primary, semi-nested or nested PCRs	Reference
<i>Mge1 TR</i>			
Mge1-F	GGATAGTGAGCAGAAATG	P ^b	This study
Mge1-R	CAACCACCAAGTTGAAACCC	P, SN ^c	This study
Mge1-F-Nest	TGCCGCATTACTCCATACC(NED)	SN	This study
<i>MG307-STR</i>			
MG307-STR-F	TGACCATTATCGCTTCATTT	P	(249)
MG307-STR-R	AGTTGTTGGGTGCCTGTAT	P	(249)
MG307-STR-F-Nest	ACCAGACAAGCAGTATCAAC	N ^d	This study
MG307-STR-R-Nest	TTGGTTGGTTTGGGTACTTC (HEX)	N	(249)
<i>MG309-STR</i>			
MG309-STR-F	GTGCTAGAGAAGTGTTTCTAGGATC	P	(248)
MG309-STR-R	AACTAGCAGAACGTAACCAACC	P, SN	(248)
MG309-STR-F-Nest	TATTGCGGTGAGGGAATTAC (NED)	SN	This study
<i>Mge2 TR</i>			
Mge2-F	GGGCATAAACAACACTAACATC	P, SN	This study
Mge2-R	ACCCAAGGATGAACCCAAAC	P	This study
Mge2-R-Nest	CCCCATCCTAACCAATTTGC (FAM)	SN	This study
<i>MG338-STR</i>			
MG338-STR-F	TCATCACAAAGTTCAGCTGC	P	This study
MG338-STR-R	GACTTTTTGTCATAGCACTC	P, SN	This study
MG338-STR-F-Nest	CAAGTATAGTGCAAGCAAAG (FAM)	SN	This study
<i>Mge3 TR</i>			
Mge3-F	GGTTGAGATTCTACAGGTTG	P	This study
Mge3-R	CACCAGTTGAAACTGTTGAAC	P, SN	This study
Mge3-F-Nest	TGAACTTCTTCAAGGAGAGG (HEX)	SN	This study

^a F, forward primer; R, reverse primer; Nest, nested primer.^b P, primary PCR.^c SN, semi-nested PCR.^d N, nested PCR.

TABLE 3. Characteristics of VNTR markers.

Name	Genome position ^a (bp)	Locus (protein designation in the genome sequence)	Repeat size (bp)	Identity percentage between TRs	HGDI ^b (38 samples)	Reference
Mge1	224535/224555	MgpB (MG191)	3	100	0.797	This study
MG307-STR	378382/378396	Lipoprotein (MG307)	3	100	0.844	(249)
MG309-STR	384453/384488	Lipoprotein (MG309)	3	76	0.878	(249)
Mge2	397480/397536	P32 adhesin (MG318)	30	93	0.371	This study
MG338-STR	425824/425856	Lipoprotein (MG338)	3	100	0.898	(249)
Mge3	485718/485782	P200 protein (MG386)	21	86	0.053	This study

^a Position (5'-end) on the *M. genitalium* G37 genome sequence.

^b Hunter-Gaston diversity index, calculated using 38 samples with a single allele at the 6 VNTR loci.

CHAPITRE 3
DEVELOPPEMENT DE LA MLVA POUR LE
TYPAGE MOLECULAIRE DE
MYCOPLASMA PNEUMONIAE

CHAPITRE 3 : DEVELOPPEMENT DE LA MLVA POUR LE TYPAGE MOLECULAIRE DE *MYCOPLASMA PNEUMONIAE*

Résumé

Dans cette étude nous rapportons le développement d'un schéma MLVA (« multiple-locus variable-number tandem-repeat (VNTR) analysis ») pour le typage moléculaire de *Mycoplasma pneumoniae*. La souche de référence M129 de *M. pneumoniae* a été analysée à la recherche de VNTR potentiels. Dix sept VNTR ont été identifiés et cinq ont été finalement retenus. Les cinq VNTR ont été multiplexés en une PCR triplexe et une PCR duplexe. Les amorces servant à amplifier ces cinq loci ont été marquées et les produits de PCR analysés par électrophorèse capillaire. Cette méthode a été appliquée à une collection de 265 souches d'origine géographique différente (pays européens, Japon et Tunisie). Vingt six types MLVA ont été déterminés. La MLVA a été comparée à la méthode de typage de référence, la PCR-RFLP du gène de l'adhésine P1. L'indice de diversité de la MLVA était de 0,91, comparé à 0,51 pour la PCR-RFLP. Un minimal spanning tree a été construit, n'objectivant pas de cluster et confirmant l'homogénéité génétique de cette espèce. Il existait cependant une corrélation entre les résultats de typage obtenus par MLVA et ceux de la PCR-RFLP de P1. Celle-ci était visible sur le minimal spanning tree où les souches de *M. pneumoniae* de type 1 et 2 étaient bien séparées. La MLVA représente un outil intéressant pour le typage moléculaire de *M. pneumoniae*, elle devra être appliquée à l'analyse de souches issues d'une épidémie pour renforcer son intérêt épidémiologique.

Development of Multiple-Locus Variable-Number Tandem-Repeat Analysis for Molecular Typing of *Mycoplasma pneumoniae*

S. Dégrange, ‡ C. Cazanave, ‡ A. Charron, H. Renaudin, C. Bébéar, and C. M. Bébéar*

Laboratoire de Bactériologie EA 3671, Université Victor Segalen Bordeaux 2, and CHU de Bordeaux, 146 rue Léo Saignat, Bordeaux 33076 Cedex, France

*Corresponding author

Cécile Bébéar

Laboratoire de Bactériologie EA 3671, Mycoplasma and chlamydiae infections in humans, Université Victor Segalen Bordeaux 2, 146 rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux Cedex, France. Phone (33) 5.57.57.16.25. Fax (33) 5.56.93.29.40
Electronic mail address: cecile.bebear@u-bordeaux2.fr

‡ S.D. and C.C. ont contribute de façon égale à ce travail.

Article publié dans J. Clin. Microbiol. 2009;47(4):914-23.

Development of Multiple-Locus Variable-Number Tandem-Repeat Analysis for Molecular Typing of *Mycoplasma pneumoniae*[∇]

S. Dégrange,[†] C. Cazanave,[†] A. Charron, H. Renaudin, C. Bébéar, and C. M. Bébéar*

Laboratoire de Bactériologie EA 3671, Université Victor Segalen Bordeaux 2, and CHU de Bordeaux,
146 rue Léo Saignat, Bordeaux 33076 Cedex, France

Received 7 October 2008/Returned for modification 18 December 2008/Accepted 30 January 2009

In this study we report on the development of a multilocus variable-number tandem-repeat (VNTR) analysis (MLVA) method for the molecular typing of *Mycoplasma pneumoniae*. The genomic content of *M. pneumoniae* M129 was analyzed for VNTRs, and 5 of the 17 VNTRs identified were selected for use in an MLVA assay. The method was based on a GeneScan analysis of VNTR loci labeled with fluorescent dyes by multiplex PCR and capillary electrophoresis. This approach was applied to a collection of 265 isolates from various European countries, Japan, and Tunisia; and 26 distinct VNTR types were found. The VNTR assay was compared to the P1 adhesin PCR-restriction fragment length polymorphism (RFLP) typing method and showed a far better resolution than the P1 PCR-RFLP method. The discriminatory power of MLVA (Hunter-Gaston diversity index [HGDI], 0.915) for the 265 isolates was significantly higher than that of the P1 PCR-RFLP method (HGDI, 0.511). However, there was a correlation between the typing results obtained by MLVA and the P1 gene PCR-RFLP method. The potential value of MLVA of *M. pneumoniae* as an epidemiological tool is discussed, and the use of the VNTR markers in further investigations of the potential use of MLVA in outbreaks of *M. pneumoniae* infections is proposed.

Mycoplasma pneumoniae represents one of the most common etiological agents of community-acquired respiratory tract infections, with the clinical courses ranging from mild forms of pharyngitis and tracheobronchitis to severe cases of interstitial pneumonia. *M. pneumoniae* infections are responsible for 20% or more of all cases of community-acquired pneumonia (22) and occur endemically, with epidemic peaks occurring every 4 to 7 years. School-age children and young adults are the populations that are the most affected.

Strain subtyping by molecular methods is a powerful tool for surveillance and outbreak investigation. However, molecular typing is hampered by the fact that *M. pneumoniae* is a genetically homogeneous species and isolates are poorly differentiated by PCR-restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis of the P1 gene, the most common genotyping method. PCR-RFLP analysis of the gene encoding the P1 protein, a major adhesin that induces a strong humoral immune response during infection, enables the separation of isolates into two types, types 1 and 2 (1, 2, 17). More recent studies used repetitive regions, RepMp2/3 and RepMp4, which can be found in the P1 gene, for molecular typing. Besides the subtype classification, those methods allow the identification of variants of subtypes 1 and 2 (3, 5, 8).

In addition to these molecular typing methods that target only one gene, other methods based on the study of the whole genome have been adapted to *M. pneumoniae*, such as pulsed-field electrophoresis (1) and multilocus sequence typing (MLST) (4). Pulsed-field electrophoresis is able to differenti-

ate strains into two groups (groups 1 and 2), like P1 gene PCR-RFLP analysis can, and can subdivide group 2 into two subgroups, subgroups 2a and 2b (1). Due to the homogeneity of the *M. pneumoniae* species, very little polymorphism can be found in *M. pneumoniae* housekeeping genes. Thus, the attempt to use MLST with housekeeping and structural genes was not useful for molecular typing (4). Among the new genotyping methods, multiple-locus variable-number tandem-repeat (VNTR) analysis (MLVA) has successfully been tested with many bacterial species (20). MLVA is a molecular typing method based on the variation in the copy number of tandemly repeated sequences, called VNTRs, found at different loci on the genome. The variation of the copy number of these tandem repeats (TRs) depends on the isolate tested. Recently, MLVA has proven its suitability for the subtyping of isolates of one animal *Mycoplasma* species, *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC (12). Furthermore, a multilocus genotyping system has recently been developed for the human species *Mycoplasma genitalium*, based in part on the analysis of short TR sequences (10).

As current genotyping methods have low discriminatory powers, an alternative method with a high discriminatory ability is needed to differentiate *M. pneumoniae* isolates according to geographical origin, specimen type, isolation date, and patient age or to differentiate a reinfection from a relapse. The present study aims to develop a new epidemiological tool based on whole-genome analysis, an MLVA scheme, by using VNTR loci selected from the sequence of the sole published genome of *M. pneumoniae*, that of strain M129, and to apply it to a large collection of isolates.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains, culture, and DNA preparation. A total of 265 *M. pneumoniae* strains were used in this study, including the 2 reference strains of types 1 and 2, *M. pneumoniae* M129 (ATCC 29342) and FH (ATCC 15531), respectively. Among the 263 clinical strains, 7 were isolated from extra-respiratory tract

* Corresponding author. Mailing address: Laboratoire de Bactériologie EA 3671, Mycoplasma and Chlamydiae Infections in Humans, Université Victor Segalen Bordeaux 2, CHU de Bordeaux, 146 rue Léo Saignat, Bordeaux 33076 Cedex, France. Phone: (33) 5.57.57.16.25. Fax: (33) 5.56.93.29.40. E-mail: cecile.bebear@u-bordeaux2.fr.

[†] S.D. and C.C. contributed equally to the work.

[∇] Published ahead of print on 9 February 2009.

specimens. The isolates were from France ($n = 210$), Germany ($n = 15$), Denmark ($n = 11$), Japan ($n = 9$), Belgium ($n = 8$), Tunisia ($n = 8$), and Spain ($n = 2$) and were collected between 1962 and 2008. All except two of the isolates were single patient isolates. The strain collection included 253 fully macrolide-susceptible and 12 macrolide-resistant isolates (11, 14). The characteristics of the strains analyzed by the MLVA typing method are shown Table 1. The growth conditions used for the *M. pneumoniae* strains have been described previously (21). DNA was isolated with a MagNa Pure LC DNA isolation kit I (Roche Diagnostics, France), according to the manufacturer's instructions.

P1 gene typing. The type of P1 adhesin gene of 155 clinical isolates collected in France between 1994 and 2006 was previously determined (14). For the 102 remaining clinical isolates, typing by P1 gene PCR-RFLP analysis was performed as described previously (1, 14). Among six clinical isolates characterized previously, one isolate was a type 1a variant (3) and the five other isolates were type 2a variants (5) (Table 1).

Identification of TRs. VNTR markers were identified in the sequenced genome of *M. pneumoniae* M129 (6) by using the Tandem Repeats Finder program and the Microorganisms Tandem Repeats database, available at <http://minisatellites.u-psud.fr>. Loci were chosen on the basis of matches of more than 80% between the DNA sequences of the repeat units. The different TR loci were designated by the letters Mpn, followed by a number corresponding to the order of detection and the position on the genome.

To screen for variability in the number of TRs, PCR primers targeting the regions flanking TR loci were designed. As a preliminary step, a total of 17 selected VNTRs were tested with specific primers to amplify DNA from a set of 13 diverse *M. pneumoniae* strains, including the 2 reference strains, 5 type 1 clinical isolates, 5 type 2 clinical isolates, and 1 isolate that could not be classified by P1 gene PCR-RFLP analysis. These strains were collected over a long time frame and from diverse geographical origins. Each locus was amplified individually and was analyzed by conventional agarose gel electrophoresis. To confirm that length polymorphisms were the result of repeat copy number variations, the PCR products were purified with a Wizard PCR preps DNA purification system (Promega) and were sequenced by using the fluorescence-labeled dideoxynucleotide technology, according to the manufacturer's recommendations (Applied Biosystems). By this approach, five VNTR loci were selected and taken forward for full assessment.

PCR amplification for MLVA. The five loci ultimately selected for MLVA were multiplexed in two solutions, solutions M1 and M2, and the amplifications were performed with a Mastercycler eppgradient S apparatus (Eppendorf, Hamburg, Germany) in a final volume of 25 μ l. The reaction mixtures contained 1 $\times$ Qiagen PCR buffer containing 1.5 mM MgCl₂; 0.2 mM deoxynucleotide triphosphates; 2 mM and 3 mM MgCl₂ for solutions M1 and M2, respectively; 1.25 U of HotStar Taq polymerase (Qiagen, Hilden, Germany); 0.5 μ M each primer pairs Mpn1-F-Mpn1-R, Mpn14-F-Mpn14-R, and Mpn16-F-Mpn16-R for solution M1 and primer pairs Mpn13-F-Mpn13-R and Mpn15-F-Mpn15-R for solution M2; and 1 μ l of template DNA. Forward or reverse primers were fluorescently labeled at the 5' end with 4,4',7,7'-hexachloro-6-carboxy-fluorescein (HEX), 6-carboxyfluorescein (FAM; Eurogentec, France), or NED (2'-chloro-5'-fluoro-7',8'-fused phenyl-1,4-dichloro-6-carboxyfluorescein; Applied Biosystems), depending on the locus to be amplified (Table 2). Both multiplex solutions were run with the same cycling conditions of 95°C for 15 min, followed by 25 cycles of 95°C for 1 min, 60°C for 1 min, and 72°C for 1 min and with a final extension of 72°C for 10 min. Prior to GeneScan analysis, the amplicons were diluted 1:50 in distilled water, and 1 μ l of the diluted samples was mixed with 10 μ l of Hi-Di formamide (Applied Biosystems) and 0.5 μ l of GeneScan ROX 500 size standard (Applied Biosystems). After heat denaturation for 5 min at 95°C and rapid cooling on ice, the fragments were separated on an ABI 3130 genetic analyzer (Applied Biosystems) and were electrophoresed at 15,000 V for 20 min at 60°C. The GeneScan data were analyzed with GeneMapper software (version 4.0; Applied Biosystems) to perform sizing and to calculate the number of repeats in the PCR fragments. Each locus was identified according to color. An allele number string, based on the number of repeats at each locus, was assigned to all isolates. The number of repeats was rounded up to an integer value.

Data analysis. The data with the calculated number of repeats were imported into the Bionumerics (version 5.0) software package (Applied Maths) and a minimum-spanning tree (MST) was generated for visualization of the relationships between large numbers of isolates in a single compact image. The MST was created on the basis of the categorical coefficient and a priority rule consisting of the highest number of single-locus variants (when two types were equal distances from the tree, the type with the highest number of single-locus variants was linked first). The creation of hypothetical types was allowed. A detailed description of the analysis of MLVA by MST can be found in the study of Schouls et al.

(18). The polymorphism index of individual or combined VNTR loci was calculated by using the Hunter-Gaston diversity index (HGDI) (7).

Stability determination. Five *M. pneumoniae* isolates, including reference strains M129 and FH, were chosen for use in the stability study. Each strain was passaged 10 times in Hayflick modified broth medium supplemented with glucose to determine the stability of each locus before and after the 10 passages. DNA was extracted and subjected to multiplexing PCR.

RESULTS

Identification of VNTRs for typing by MLVA and stability. Seventeen regions with TRs spread over the genome of *M. pneumoniae* M129 were identified by using the Microorganisms Tandem Repeats database (<http://minisatellites.u-psud.fr>). Amplification was achieved by the use of primer pairs complementary to the sequences in DNA flanking each direct-repeat locus (data not shown). Preliminary amplification of these 17 loci, named Mpn1 to Mpn17, from both reference strains *M. pneumoniae* M129 and FH and 11 clinical strains showed that only six loci were polymorphic with different allele sizes. Eight markers turned out to be monomorphic, while for two loci, specific primers failed to amplify the DNA satisfactorily. One marker was eliminated from this study since the sequence variability observed between strains was not related to a variation in repeat number but was due to insertions.

The stability of the six polymorphic VNTR markers was studied for five strains after 10 passages in Hayflick broth medium. Analysis of the five strains resulted in identical MLVA profiles for all markers except one, Mpn6, which harbored a variation in the amplification size between the 1st and the 10th passages of one strain.

Thus, an MLVA scheme that included five markers (Mpn1, Mpn13, Mpn14, Mpn15, and Mpn16) and that allowed unambiguous type assignment by using agarose gels was proposed. The PCR products ranging in size from 219 to 419 bp. The five loci were distributed around the genome from base pair positions 111920 to 736123. Four of the five VNTRs were located in open reading frames, and three of them encoded hypothetical proteins. Marker Mpn1 was located in the *hdsS* gene, which encodes the S subunit of a type I restriction-modification enzyme. The characteristics of each VNTR marker are shown in Table 3. The sizes of the unit repeats ranged from 12 bp for Mpn1 to 47 bp for Mpn16. Sequencing of the PCR products of different sizes at each of the five loci from each of the 13 strains confirmed the sizes and sequences of the individual VNTR loci.

Typing of clinical strains. The set of five VNTR markers was used to type a large collection of 265 *M. pneumoniae* strains isolated from several countries, including France, Germany, Denmark, Japan, Belgium, Tunisia, and Spain. This study mostly included strains isolated from the respiratory tract, and 12 of them were resistant to macrolides; but the study also included some extra-respiratory tract isolates. The use of fluorescently labeled primers in a multiplex PCR associating Mpn1-Mpn14-Mpn16 and Mpn13-Mpn15 and adapted to capillary electrophoresis allowed the easier interpretation of the results compared to that required for agarose gel electrophoresis. All loci were clearly identified on electropherograms according to their size ranges and colors, and the amplicon sizes were extracted and turned into allele numbers by the Genetic Analyzer software (Applied Biosystems).

TABLE 1. Characteristics of the 263 *M. pneumoniae* isolates used in this study

Isolate ^a	Origin		Yr of isolation	P1 gene PCR-RFLP type	MLVA type
	Country	Source			
J7	Germany	Respiratory tract	1991	2	B
J4	Germany	Respiratory tract	1991	2	O
Ho	Germany	Respiratory tract	1991	2a	B
J17	Germany	Respiratory tract	1992	1	P
J19	Germany	Respiratory tract	1992	1	P
J16	Germany	Respiratory tract	1992	1	P
J13	Germany	Respiratory tract	1992	1	P
J20	Germany	Respiratory tract	1992	1	U
J11	Germany	Respiratory tract	1992	1	X
J22	Germany	Respiratory tract	1993	1	Z
Sta	Germany	Respiratory tract	1995	2a	M
B2146	Germany	Respiratory tract	1996	2	B
79692	Germany	Respiratory tract	2000	2a	M
79809	Germany	Respiratory tract	2000	2a	M
F59	Germany	Respiratory tract	Unknown	2a	V
M5	Denmark	Respiratory tract	1962	1	P
M40	Denmark	Respiratory tract	1963	1	P
M38	Denmark	Respiratory tract	1963	1	Z
M62	Denmark	Respiratory tract	1964	1	X
M547	Denmark	Respiratory tract	1967	2	T
M1121	Denmark	Respiratory tract	1977	1	J
M1873	Denmark	Respiratory tract	1987	2	C
M2018 ^b	Denmark	Respiratory tract	1988	1	P
M2155	Denmark	Respiratory tract	1990	1	P
M4350	Denmark	Respiratory tract	1991	2	V
4817	Denmark	Respiratory tract	1993	1a	J
J173 ^b	Japan	Unknown	Unknown	1	A
J186 ^b	Japan	Unknown	Unknown	1	A
J380 ^b	Japan	Respiratory tract	2000–2003	1	J
J381 ^b	Japan	Respiratory tract	2000–2003	1	K
J378 ^b	Japan	Respiratory tract	2000–2003	2	M
J377 ^b	Japan	Respiratory tract	2000–2003	2	C
J376 ^b	Japan	Respiratory tract	2000–2003	2	C
J382 ^b	Japan	Respiratory tract	2000–2003	1	P
J379 ^b	Japan	Respiratory tract	2000–2003	2	S
AV1	Belgium	Unknown	1992	2	C
AV2	Belgium	Unknown	1992	1	E
AV4	Belgium	Unknown	1992	1	E
AV3	Belgium	Unknown	1992	1	P
AV8	Belgium	Unknown	1993	1	E
AV9	Belgium	Unknown	1993	1	E
AV6	Belgium	Unknown	1993	1	J
AV7	Belgium	Unknown	1993	1	J
A131	Tunisia	Respiratory tract	2006	1	P
A138	Tunisia	Respiratory tract	2006	1	P
A167	Tunisia	Respiratory tract	2006	1	P
A168	Tunisia	Respiratory tract	2006	1	P
A195	Tunisia	Respiratory tract	2007	1	P
A251	Tunisia	Respiratory tract	2007	1	P
A340	Tunisia	Respiratory tract	2008	1	P
A355	Tunisia	Respiratory tract	2008	1	P
B2285	Madrid, Spain	Pericardial fluid	1995	1	E
B2283	Madrid, Spain	Pericardial fluid	1995	1	E
Pn19	Bordeaux, France	Respiratory tract	1992	1	E
Pn25	Bordeaux, France	Respiratory tract	1992	1	E
Pn18	Bordeaux, France	Respiratory tract	1992	1	E
Pn15	Bordeaux, France	Respiratory tract	1992	1	J
B699	Bordeaux, France	Respiratory tract	1992	1	P
Pn22	Bordeaux, France	Respiratory tract	1992	1	R
Pn21	Bordeaux, France	Respiratory tract	1992	1	U
B718	Bordeaux, France	Respiratory tract	1993	1	D
B833	Bordeaux, France	Respiratory tract	1993	1	J
B773	Bordeaux, France	Respiratory tract	1993	2	O
B4812	Bordeaux, France	Respiratory tract	1993	1	P
B767	Bordeaux, France	Respiratory tract	1993	1	X
B936	Bordeaux, France	Respiratory tract	1994	1	J

Continued on following page

TABLE 1—Continued

Isolate ^a	Origin		Yr of isolation	P1 gene PCR-RFLP type	MLVA type
	Country	Source			
B932	Bordeaux, France	Cervix	1994	1	X
B2036	Bordeaux, France	Respiratory tract	1995	1	E
B2329	Bordeaux, France	Respiratory tract	1996	1	P
B2365	Bordeaux, France	Respiratory tract	1996	1	U
B2359	Bordeaux, France	Respiratory tract	1996	1	U
B2085	Bordeaux, France	Respiratory tract	1996	2	W
B2483	Bordeaux, France	Respiratory tract	1997	1	P
B2759	Bordeaux, France	Respiratory tract	1999	2	H
B2882	Bordeaux, France	Synovial fluid	1999	2	O
B2832	Bordeaux, France	Respiratory tract	1999	2	O
B2818	Bordeaux, France	Respiratory tract	1999	2	O
B2823	Bordeaux, France	Respiratory tract	1999	2	O
B2852	Bordeaux, France	Respiratory tract	1999	2	O
B2892	Bordeaux, France	Respiratory tract	1999	2	O
B2864	Bordeaux, France	Respiratory tract	1999	2	O
B2854	Bordeaux, France	Respiratory tract	1999	1	U
B2829	Bordeaux, France	Respiratory tract	1999	1	U
B3063	Bordeaux, France	Respiratory tract	2000	1	E
B2912	Bordeaux, France	Respiratory tract	2000	1	J
B3041	Bordeaux, France	Respiratory tract	2000	2	O
B3049	Bordeaux, France	Respiratory tract	2000	1	P
B2918	Bordeaux, France	Respiratory tract	2000	1	Q
B2934	Bordeaux, France	Respiratory tract	2000	2	T
B3140	Bordeaux, France	Respiratory tract	2001	2	C
B3163	Bordeaux, France	Sternal wound	2001	2	C
B3188	Bordeaux, France	Respiratory tract	2001	1	E
B3174	Bordeaux, France	Respiratory tract	2001	1	E
B3148	Bordeaux, France	Respiratory tract	2001	2	H
B3179	Bordeaux, France	Respiratory tract	2001	1	U
B3168	Bordeaux, France	Respiratory tract	2001	1	U
B3119	Bordeaux, France	Respiratory tract	2001	2	V
B3357	Bordeaux, France	Respiratory tract	2002	2	C
B3487	Bordeaux, France	Respiratory tract	2003	1	A
B3568	Bordeaux, France	Respiratory tract	2003	1	A
B3448	Bordeaux, France	Respiratory tract	2003	2	C
B3570	Bordeaux, France	Respiratory tract	2003	1	E
B3573	Bordeaux, France	Respiratory tract	2003	2	H
B3436	Bordeaux, France	Respiratory tract	2003	2	T
B3816	Bordeaux, France	Respiratory tract	2004	2	B
B3786	Bordeaux, France	Respiratory tract	2004	2	C
B3836	Bordeaux, France	Respiratory tract	2004	2	C
B3887	Bordeaux, France	Respiratory tract	2004	1	G
B3803	Bordeaux, France	Respiratory tract	2004	2	H
B3648	Bordeaux, France	Respiratory tract	2004	2	O
B3805	Bordeaux, France	Respiratory tract	2004	2	O
B3676	Bordeaux, France	Respiratory tract	2004	2	O
B3654	Bordeaux, France	Respiratory tract	2004	2	O
B3627	Bordeaux, France	Respiratory tract	2004	2	O
B3766	Bordeaux, France	Respiratory tract	2004	1	U
B3722	Bordeaux, France	Respiratory tract	2004	1	U
B3834	Bordeaux, France	Respiratory tract	2004	1	U
B3737	Bordeaux, France	Respiratory tract	2004	1	X
B4051	Bordeaux, France	Respiratory tract	2005	1	J
B3996	Bordeaux, France	Respiratory tract	2005	1	N
B3858	Bordeaux, France	Respiratory tract	2005	2	O
B3912	Bordeaux, France	Synovial fluid	2005	1	P
B3885	Bordeaux, France	Respiratory tract	2005	1	P
B3891	Bordeaux, France	Respiratory tract	2005	2	T
B3896	Bordeaux, France	Respiratory tract	2005	NT ^c	S
B3881	Bordeaux, France	Respiratory tract	2005	1	U
B3869	Bordeaux, France	Respiratory tract	2005	1	U
B3851	Bordeaux, France	Respiratory tract	2005	1	U
B4027	Bordeaux, France	Respiratory tract	2005	2	V
B4079	Bordeaux, France	Respiratory tract	2005	2	W
B3944	Bordeaux, France	Respiratory tract	2005	2	V
B4100	Bordeaux, France	Respiratory tract	2006	1	E

Continued on following page

TABLE 1—Continued

Isolate ^a	Origin		Yr of isolation	P1 gene PCR-RFLP type	MLVA type
	Country	Source			
B4391	Bordeaux, France	Respiratory tract	2006	1	I
B4291	Bordeaux, France	Respiratory tract	2006	2	H
B4254	Bordeaux, France	Respiratory tract	2006	2	H
B4223	Bordeaux, France	Respiratory tract	2006	1	J
B4112	Bordeaux, France	Respiratory tract	2006	2	M
B4381	Bordeaux, France	Respiratory tract	2006	2	O
B4074	Bordeaux, France	Respiratory tract	2006	1	P
B4104	Bordeaux, France	Respiratory tract	2006	2	S
B4288	Bordeaux, France	Respiratory tract	2006	2	T
B4209	Bordeaux, France	Respiratory tract	2006	1	U
B4229	Bordeaux, France	Respiratory tract	2006	1	U
B4098	Bordeaux, France	Respiratory tract	2006	2	V
B4628	Bordeaux, France	Respiratory tract	2007	2	B
B4578	Bordeaux, France	Respiratory tract	2007	1	E
B4550	Bordeaux, France	Respiratory tract	2007	1	J
B4581	Bordeaux, France	Respiratory tract	2007	2	O
B4470	Bordeaux, France	Respiratory tract	2007	2	O
B4495	Bordeaux, France	Respiratory tract	2007	2	O
B4543	Bordeaux, France	Respiratory tract	2007	2	O
B4567	Bordeaux, France	Respiratory tract	2007	2	O
B4675	Bordeaux, France	Respiratory tract	2007	2	O
B4449	Bordeaux, France	Respiratory tract	2007	2	T
B4466	Bordeaux, France	Respiratory tract	2007	2	S
B4594	Bordeaux, France	Respiratory tract	2007	2	T
B4608	Bordeaux, France	Respiratory tract	2007	2	T
L20730	Lyon, France	Respiratory tract	1992	1	X
L25861	Lyon, France	Respiratory tract	1993	2	T
L1	Lyon, France	Respiratory tract	1994	1	J
L2	Lyon, France	Respiratory tract	1995	1	E
L3	Lyon, France	Respiratory tract	1995	1	X
L8	Lyon, France	Respiratory tract	1996	2	B
L33	Lyon, France	Respiratory tract	1996	1	E
L11	Lyon, France	Respiratory tract	1996	1	J
L5	Lyon, France	Respiratory tract	1996	1	J
L10	Lyon, France	Respiratory tract	1996	1	Q
L4	Lyon, France	Respiratory tract	1996	1	P
L12	Lyon, France	Respiratory tract	1996	1	U
L13	Lyon, France	Respiratory tract	1996	1	U
L6	Lyon, France	Respiratory tract	1996	1	U
L9	Lyon, France	Respiratory tract	1996	1	U
L7	Lyon, France	Respiratory tract	1996	1	X
L18	Lyon, France	Respiratory tract	1997	2	C
L17	Lyon, France	Respiratory tract	1997	1	E
L20	Lyon, France	Respiratory tract	1997	1	J
L22	Lyon, France	Respiratory tract	1997	1	J
L35	Lyon, France	Respiratory tract	1997	1	J
L19	Lyon, France	Respiratory tract	1997	2	L
L14	Lyon, France	Respiratory tract	1997	2	M
L34	Lyon, France	Respiratory tract	1997	1	P
L16	Lyon, France	Respiratory tract	1997	1	P
L21	Lyon, France	Respiratory tract	1997	1	U
L36	Lyon, France	Respiratory tract	1997	1	U
L37	Lyon, France	Respiratory tract	1997	1	U
L15	Lyon, France	Respiratory tract	1997	2	W
L24	Lyon, France	Respiratory tract	1998	1	E
L38	Lyon, France	Respiratory tract	1998	2	O
L39	Lyon, France	Respiratory tract	1998	1	P
L23	Lyon, France	Respiratory tract	1998	2	S
L26	Lyon, France	Respiratory tract	1998	1	U
L27	Lyon, France	Respiratory tract	1998	1	U
L25	Lyon, France	Respiratory tract	1998	2	V
L28	Lyon, France	Respiratory tract	1998	1	X
L53	Lyon, France	Respiratory tract	1999	1	E
L54	Lyon, France	Respiratory tract	1999	2	H
L40	Lyon, France	Respiratory tract	1999	2	H
L47	Lyon, France	Respiratory tract	1999	2	G

Continued on following page

TABLE 1—Continued

Isolate ^a	Origin		Yr of isolation	P1 gene PCR-RFLP type	MLVA type
	Country	Source			
L43	Lyon, France	Respiratory tract	1999	1	J
L56	Lyon, France	Respiratory tract	1999	1	J
L42	Lyon, France	Respiratory tract	1999	2	O
L49 ^b	Lyon, France	Respiratory tract	1999	2	O
L50	Lyon, France	Respiratory tract	1999	2	M
L41	Lyon, France	Respiratory tract	1999	1	P
L45	Lyon, France	Respiratory tract	1999	1	P
L48	Lyon, France	Respiratory tract	1999	1	P
L55	Lyon, France	Respiratory tract	1999	1	P
L52 ^b	Lyon, France	Respiratory tract	1999	2	T
L51	Lyon, France	Respiratory tract	1999	2	T
L32	Lyon, France	Respiratory tract	2000	1	J
L31	Lyon, France	Respiratory tract	2000	2	O
L57	Lyon, France	Respiratory tract	2000	2	O
L59	Lyon, France	Respiratory tract	2000	2	N
L62	Lyon, France	Respiratory tract	2000	2	M
L63	Lyon, France	Respiratory tract	2000	2	O
L61	Lyon, France	Respiratory tract	2000	2	T
L58	Lyon, France	Respiratory tract	2000	1	U
C60	Caen, France	Respiratory tract	2005	2	H
C66	Caen, France	Respiratory tract	2005	1	U
C69	Caen, France	Respiratory tract	2005	2	S
C62	Caen, France	Respiratory tract	2005	1	X
C71	Caen, France	Respiratory tract	2005	1	Z
C72	Caen, France	Respiratory tract	2005	1	Z
C77	Caen, France	Respiratory tract	2006	2	C
C91	Caen, France	Respiratory tract	2006	2	B
C84	Caen, France	Respiratory tract	2006	1	J
C89	Caen, France	Respiratory tract	2006	2	H
C78	Caen, France	Respiratory tract	2006	1	P
C87	Caen, France	Respiratory tract	2006	1	P
C75	Caen, France	Respiratory tract	2006	1	U
C83	Caen, France	Respiratory tract	2006	2	T
C76	Caen, France	Respiratory tract	2006	2	W
C90	Caen, France	Respiratory tract	2006	2	V
C82	Caen, France	Respiratory tract	2006	2	Y
C95	Caen, France	Respiratory tract	2007	2	H
C98	Caen, France	Respiratory tract	2007	2	H
C93	Caen, France	Respiratory tract	2007	1	P
C94	Caen, France	Respiratory tract	2007	1	P
C96	Caen, France	Respiratory tract	2007	1	P
C92	Caen, France	Respiratory tract	2007	1	Z
FG8	Saint-Etienne, France	Respiratory tract	1997	1	E
FG12	Saint-Etienne, France	Respiratory tract	1997	1	J
FG6	Saint-Etienne, France	Respiratory tract	1997	2	O
FG9	Saint-Etienne, France	Respiratory tract	1997	1	P
FG11	Saint-Etienne, France	Respiratory tract	1997	1	P
FG7	Saint-Etienne, France	Respiratory tract	1997	1	U
FG2	Saint-Etienne, France	Respiratory tract	1997	1	U
FG5	Saint-Etienne, France	Respiratory tract	1997	1	U
FG10	Saint-Etienne, France	Respiratory tract	1997	2	U
FG13	Saint-Etienne, France	Respiratory tract	1998	1	E
FG14	Saint-Etienne, France	Respiratory tract	1998	1	P
B4560	Bayonne, France	Respiratory tract	2007	1	E
B4602	Bayonne, France	Respiratory tract	2007	1	J
B4625	Bayonne, France	Respiratory tract	2007	1	P
B4561	Bayonne, France	Respiratory tract	2007	2	S
N35	Nantes, France	Respiratory tract	1986	2	V
N37	Nantes, France	Respiratory tract	1988	2	V
N41	Nantes, France	Respiratory tract	1989	1	P
B2362	Poitiers, France	Respiratory tract	1996	1	U
B2644	Poitiers, France	Respiratory tract	1998	2	B
B1145	Brest, France	Cerebrospinal fluid	1994	1	P
B3098	Argenteuil, France	Respiratory tract	2000	1	F
B4574	Grenoble, France	Respiratory tract	2007	2	G

^a For the French isolates, the town is specified before the country.^b Macrolide-resistant isolates (11, 14).^c NT, *M. pneumoniae* isolate not classified by the P1 gene PCR-RFLP typing method.

TABLE 2. Oligonucleotide primers used for MLVA

Primer name ^a	Dye sequence (5' → 3')
Mpn1-F	GTTGAAGTTATGCCGGTAGC
Mpn1-R	HEX-CGCGATAGAAGGCATACTGC
Mpn13-F	GACCAGCATTAGATTGCTATG
Mpn13-R	NED-AACAAATTAAGCAGCTCACG
Mpn14-F	CTCAGGGCGAAACCTTAAAG
Mpn14-R	6-FAM-GCAATGGCTTTCAGCACAAAC
Mpn15-F	HEX-CAACAGCACCACATCTTTAG
Mpn15-R	GCTAATCTTGCAAACGCTGC
Mpn16-F	NED-GACGCGTTCGCTAAAAGAG
Mpn16-R	CAGGCTCAACCAAATAATGG

^a F, forward primer; R, reverse primer.

The five VNTRs were very efficiently amplified from all 265 strains, and the size variations of the amplicons were exact multiples of the repeats. The results are shown in Table 4. Marker Mpn1 was the most discriminatory VNTR, displaying seven different alleles with repeat copy numbers ranging from 1 to 7, depending on the isolate. Markers Mpn13 and Mpn15 showed three different allele sizes and had repeat units that ranged in number from 2 to 4 and 6 to 8, respectively. Markers Mpn14 and Mpn16 gave two different-sized PCR products. Marker Mpn16 was the most homogeneous marker, with all except two isolates harboring 2 repeat units of 47 bp. This was also reflected by the diversity index of each VNTR, estimated from the HGDI, with a value of 0.784 for the most discriminatory marker (Mpn1) and a value of 0.015 for the less discriminatory one (Mpn16) (Table 3). The overall discriminatory index of the MLVA method was 0.915.

Analysis of the combination of the five VNTR loci for the 265 *M. pneumoniae* isolates revealed 26 MLVA types, types A to Z (Table 4), while analysis of only the 210 French strains showed 25 types. The 26th MLVA type was represented by only one Japanese strain, strain J381. Between one and eight MLVA profiles were found for the isolates that originated from countries other than France. Reference strains *M. pneumoniae* M129 and FH harbored two different MLVA profiles and belonged to types P and T, respectively. It should be noted that 59% of the 265 isolates were of five MLVA types and that each of these five types contained at least 20 strains.

As a complementary analysis, the MLVA profiles were imported into the Bionumerics software package (Applied Maths), and the genetic relationships of the 265 isolates were deduced by construction of an MST (Fig. 1). This population modeling highlighted the diversity among the isolates tested, but each type was closely related to each other, differing by no more than one locus and emphasizing the lack of distinct

TABLE 4. Number of repeat units of the VNTR loci in 265 isolates of *M. pneumoniae*

MLVA type	No. of isolates by MLVA type	No. of repeats at the following VNTR loci:					P1 gene PCR-RFLP type(s)
		Mpn1	Mpn13	Mpn14	Mpn15	Mpn16	
A	4	1	4	5	7	2	1
B	8	2	3	5	6	2	2
C	12	2	3	6	6	2	2
D	1	2	4	5	6	2	1
E	24	2	4	5	7	2	1
F	1	2	4	5	8	2	1
G	3	3	3	5	6	2	1 and 2
H	12	3	3	6	6	2	2
I	1	3	3	6	7	2	1
J	24	3	4	5	7	2	1
K	1	3	4	5	6	2	1
L	1	4	2	6	6	2	2
M	8	4	3	5	6	2	2
N	2	4	3	5	7	2	1 and 2
O	30	4	3	6	6	2	2
P	46	4	4	5	7	2	1
Q	2	4	4	5	7	1	1
R	1	5	3	5	7	2	1
S	7	5	3	5	6	2	2 and NT ^a
T	14	5	3	6	6	2	2
U	33	5	4	5	7	2	1 and 2
V	10	6	3	5	6	2	2
W	4	6	3	6	6	2	2
X	10	6	4	5	7	2	1
Y	1	7	3	5	6	2	2
Z	5	7	4	5	7	2	1

^a NT, *Mycoplasma pneumoniae* isolate not classified by PCR-RFLP analysis of P1 adhesin gene.

clusters. There was no obvious link between the MLVA type and the year when the strains were collected, the patient's age, or resistance to macrolides. Indeed, the 12 macrolide-resistant isolates were dispersed into nine MLVA types (Fig. 1). No association could be established between the 26 unique allele strings and the geographical origin, except for the Tunisian and Spanish isolates. The eight Tunisian isolates were obtained between 2006 and 2008 from different geographical areas and belonged to the same MLVA type, type P, the most important type. The two Spanish strains isolated from two different patients in 1995, both of which were from pericardial fluid or tissue, belonged to MLVA type E (Fig. 1). Furthermore, a clustering was observed on the basis of the P1 subtype, although there were a few exceptions (Fig. 1). P1 variant 1a (strain 4817) belonged to MLVA type J, which included only type 1 isolates, while the five 2a variants (strains F59, Ho, Sta,

TABLE 3. Characteristics of VNTR markers

Name	Genome position ^a (bp)	Locus (protein no. in the genome sequence)	Repeat size (bp)	% Identity between TRs	HGDI ^b (265 strains)
Mpn1	111920	HsdS (MPN 089)	12	100	0.784
Mpn13	596741	Intergenic	16	83	0.495
Mpn14	608651	Hypothetical protein (MPN 501)	21	84	0.404
Mpn15	645561	Hypothetical protein (MPN 524)	21	81	0.494
Mpn16	736123	Hypothetical protein (MPN 613)	47	100	0.015

^a Position (5' end) on the *M. pneumoniae* M129 genome sequence (6).

^b HGDI, Hunter Gaston diversity index.

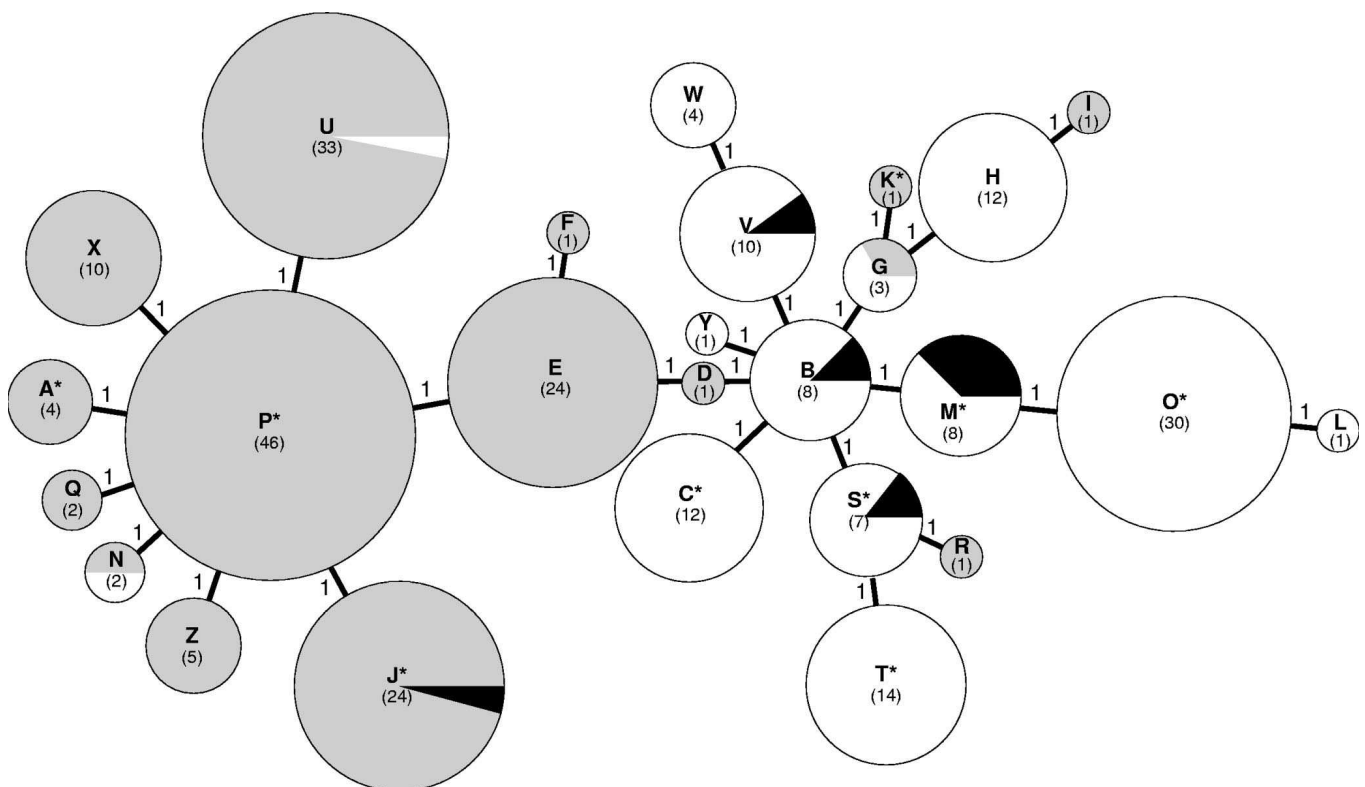


FIG. 1. MST of the MLVA profiles of the 265 *M. pneumoniae* isolates. Each circle denotes a particular MLVA type, as indicated by a letter and with the number of isolates corresponding to this genotype given in parentheses. The size of the circle is proportional to the number of isolates belonging to the indicated MLVA genotype. The distance between neighboring genotypes is expressed as the number of allelic changes and is outlined by short bold lines for one change. The color of the circles indicates the P1 adhesin type: gray for type 1, white for type 2, and black for characterized variants. Asterisks in the MLVA type indicate the presence of macrolide-resistant isolates.

79809, and 79692) belonged to MLVA types B, M, and V, which included only type 2 isolates.

DISCUSSION

MLVA has been used to genotype several species of bacteria, including recently two *Mycoplasma* species, *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC (12) and *M. genitalium* (10). In the study presented here, we evaluated the applicability of MLVA to the molecular typing of *M. pneumoniae*. We performed MLVA with a collection of isolates originating from European countries, Japan, and Tunisia. A collection of five VNTR markers which can be used to genotype *M. pneumoniae* isolates by simple PCR and agarose gel electrophoresis was identified. To improve the assay, two multiplex PCRs with fluorescently labeled primers were performed; one PCR amplified the Mpn1, Mpn14, and Mpn16 loci and one PCR amplified the Mpn13 and Mpn15 loci. The application of multiplex PCR and capillary electrophoresis on a gene analyzer enabled a high-throughput version of the analysis to be performed and allowed the easier interpretation of the results compared to that required for gel agarose electrophoresis, in particular, for VNTRs with small numbers of repeat units.

The stability of the VNTRs was evaluated in vitro and was confirmed before and after 10 repeated passages of five strains in broth medium. For one patient, two distinct respiratory tract specimens (one sputum specimen and one bronchoalveolar

lavage fluid specimen) that were positive for *M. pneumoniae* were available at the same time. Both isolates were genotyped and were found to harbor the same MLVA type, which also suggested the in vivo stability of the VNTRs chosen (data not shown).

The discriminatory power of this MLVA scheme with the five markers was 0.915 for the collection of 265 isolates. The discriminatory index should ideally be 1.00, but in practice, it should at least be on the order of 0.90 to 0.95 for a typing system to be considered more or less ideal (19). Thus, the global HGDI of this MLVA scheme in our study was very satisfactory. This value must be interpreted in comparison with the discriminatory powers of the other available typing methods. In comparison, the HGDI of the P1 PCR-RFLP typing method for the 265 isolates was only 0.511. The allelic diversity of the VNTR loci varied significantly at each locus, with the Mpn1, Mpn13, Mpn14, and Mpn15 loci being more discriminatory than the Mpn16 locus. The association of this set of markers with variable HGDI makes this MLVA, in theory, the optimal MLVA scheme for epidemiological studies. Of the five VNTRs tested, only one was located in an intergenic region. Interestingly, marker Mpn1 was located in a coding region containing the *hsdS* gene, which encodes the S subunit of a type I restriction-modification enzyme involved in protection against foreign DNA (15). The recognition sequence of this enzyme depends on the S subunit, which is known to be vari-

able (16) and which could explain the importance of the allelic variation of the Mpn1 marker.

No clustering was emphasized on the basis of geographical location or specimen origin for any of the isolates except the Spanish and Tunisian isolates. It is interesting to note that two clinical strains, isolated in Spain in 1995 from the pericardial site from two different patients, were of the same MLVA type (13), suggesting that these strains may have a particular virulence mechanism. However, 22 other strains belonged to the same MLVA type as the 2 clinical strains isolated in Spain in 1995. The eight isolates from Tunisia that were studied clustered in the main MLVA type, suggesting a very low level of genetic diversity and the diffusion of a homogeneous population of *M. pneumoniae* in that country. The 12 macrolide-resistant isolates of *M. pneumoniae*, which comprised 9 Japanese isolates, 2 French isolates, and 1 Danish isolate, were not related and clustered into nine MLVA types, suggesting the absence of a link between this typing method and macrolide resistance. Nevertheless, this observation could also be explained by the absence of a particular emerging macrolide-resistant clone.

Furthermore, our MLVA scheme was used to study the course of infection in a single patient. Indeed, two clinical isolates obtained 2 months apart from the same patient, isolates B2829 and B2892, showed two different MLVA profiles, as well as two different P1 PCR-RFLP subtypes, suggesting more a *M. pneumoniae* reinfection than a relapse in this case.

The P1 gene PCR-RFLP typing method (1, 17) divided the clinical isolates only into P1 types 1 and 2. One or the other of the two types tended to predominate among the clinical isolates over time. These changes in the P1 adhesin type may play a role in the development of outbreaks. However, in disagreement with this theory, clear shifts between the *M. pneumoniae* types did not appear to be correlated with *M. pneumoniae* epidemic cycles (17). In France, since 1998, both types were present in about the same proportion without a clear dominance of one type over the other one (14). Compared to the findings of the P1 gene PCR-RFLP typing method, which is usually performed to subtype *M. pneumoniae*, MLVA analysis showed a better power to discriminate among the different isolates, as shown by comparison of the HGDI between the two methods (see above). Furthermore, while P1 PCR-RFLP typing gave only three patterns (type 1, type 2, and not classified), 26 MLVA types were obtained for the 265 isolates tested. Interestingly, there was a correlation between the typing results obtained by MLVA and PCR-RFLP analysis of the P1 gene. As shown by the MST modeling, *M. pneumoniae* strains belonging to type 1 or 2 were well separated into two parts, with the exception of a few strains. Beside subtypes 1 and 2, one 1a variant (3) and five 2a variants characterized previously (5) belonged to MLVA types which included only type 1 and type 2 isolates, respectively. Furthermore, one isolate, isolate B3896, was previously found to be different and could not be classified into type 1, type 2, or one of the different subtype variants already described (3, 5, 8, 14). This isolate belonged to MLVA type S, in which only type 2 isolates clustered (Fig. 1), suggesting that isolate B3896 was more related to type 2 than to type 1. These data are in agreement with the sequence analysis of the P1 gene of this isolate, which was more homologous to that of type 2 than to that of type 1 (14).

MST modeling illustrates the relationship of subtypes on the basis of the number of VNTR loci that differ between two MLVA genotypes. Analysis of this population modeling revealed that the 26 MLVA types identified did not differ by more than one locus. Furthermore, no cluster could be individualized, highlighting the homogeneous character of the *M. pneumoniae* species, despite the high HGDI of the typing method developed in this study. As *M. pneumoniae* is a relatively homogeneous species, few typing methods have previously been able to detect significant differences between strains (2, 5). One attempt to subtype *M. pneumoniae* by MLST with housekeeping and structural genes was not sufficiently discriminatory to be used for epidemiological purposes (4).

Although we have studied an important set of clinical *M. pneumoniae* strains that originated from various countries and that were isolated in different years, unfortunately, no isolates were obtained from an epidemic outbreak of *M. pneumoniae* disease. Further community outbreaks of acute respiratory tract infections due to *M. pneumoniae* have been described worldwide (9, 22), and it would be very interesting to evaluate our MLVA scheme in such epidemic situations. The level of discrimination of this typing method should be confirmed by comparing outbreak-related strains to a set of control strains that were isolated from a similar time period and geographical area but that are not epidemiologically related.

In conclusion, this is, to our knowledge, the first attempt to perform the molecular typing of *M. pneumoniae* by the MLVA method with a consequential number of clinical isolates. Other markers could be identified to improve the MLVA scheme proposed in this study and to find a better correlation between strain information and typing by VNTR.

One of the advantages of MLVA typing is that it is PCR based and does not require the growth of bacteria. Therefore, another important issue will be to adapt the method directly for clinical specimens, since the value of *M. pneumoniae* culture is far from being satisfactory, is much more fastidious, and is less sensitive than detection by PCR. Furthermore, the data obtained by MLVA could be shared in a web-based database for *M. pneumoniae*, as has already been done for other bacterial species.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank M. P. Milon, F. Grattard, and J. Petitjean for providing *M. pneumoniae* clinical isolates from the Hospices Civils de Lyon, St. Etienne Hospital, and Caen Hospital, respectively. We are greatly indebted to J. S. Jensen for providing the Danish isolates, E. Jacobs and R. Dumke for the German isolates, T. Sasaki for the Japanese isolates, A. Ben Hassem and A. Touati for the Tunisian isolates, M. Messeguer for the Spanish isolates, and H. Goossens for the Belgian isolates.

REFERENCES

1. Cousin-Allery, A., A. Charron, B. de Barbeyrac, G. Fremy, J. Skov Jensen, H. Renaudin, and C. Bébér. 2000. Molecular typing of *Mycoplasma pneumoniae* strains by PCR-based methods and pulsed-field gel electrophoresis. Application to French and Danish isolates. *Epidemiol. Infect.* **124**:103–111.
2. Dorigo-Zetsma, J. W., J. Dankert, and S. A. Zaat. 2000. Genotyping of *Mycoplasma pneumoniae* clinical isolates reveals eight P1 subtypes within two genomic groups. *J. Clin. Microbiol.* **38**:965–970.
3. Dorigo-Zetsma, J. W., B. Wilbrink, J. Dankert, and S. A. Zaat. 2001. *Mycoplasma pneumoniae* P1 type 1- and type 2-specific sequences within the P1 cytoadhesin gene of individual strains. *Infect. Immun.* **69**:5612–5618.
4. Dumke, R., I. Catrein, E. Pirkil, R. Herrmann, and E. Jacobs. 2003. Subtyping of *Mycoplasma pneumoniae* isolates based on extended genome sequencing and on expression profiles. *Int. J. Med. Microbiol.* **292**:513–525.

5. Dumke, R., P. C. Luck, C. Noppen, C. Schaefer, H. von Baum, R. Marre, and E. Jacobs. 2006. Culture-independent molecular subtyping of *Mycoplasma pneumoniae* in clinical samples. *J. Clin. Microbiol.* **44**:2567–2570.
6. Himmelreich, R., H. Hilbert, H. Plagens, E. Pirkel, B. C. Li, and R. Herrmann. 1996. Complete sequence analysis of the genome of the bacterium *Mycoplasma pneumoniae*. *Nucleic Acids Res.* **24**:4420–4449.
7. Hunter, P. R., and M. A. Gaston. 1988. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *J. Clin. Microbiol.* **26**:2465–2466.
8. Kenri, T., R. Taniguchi, Y. Sasaki, N. Okazaki, M. Narita, K. Izumikawa, M. Umetsu, and T. Sasaki. 1999. Identification of a new variable sequence in the P1 cytoadhesin gene of *Mycoplasma pneumoniae*: evidence for the generation of antigenic variation by DNA recombination between repetitive sequences. *Infect. Immun.* **67**:4557–4562.
9. Klement, E., D. F. Talkington, O. Wasserzug, R. Kayouf, N. Davidovitch, R. Dumke, Y. Bar-Zeev, M. Ron, J. Boxman, W. Lanier Thacker, D. Wolf, T. Lazarovich, Y. Shemer-Avni, D. Glikman, E. Jacobs, I. Grotto, C. Block, and R. Nir-Paz. 2006. Identification of risk factors for infection in an outbreak of *Mycoplasma pneumoniae* respiratory tract disease. *Clin. Infect. Dis.* **43**:1239–1245.
10. Ma, L., S. Taylor, J. S. Jensen, L. Myers, R. Lillis, and D. H. Martin. 2008. Short tandem repeat sequences in the *Mycoplasma genitalium* genome and their use in a multilocus genotyping system. *BMC Microbiol.* **8**:130.
11. Matsuoka, M., M. Narita, N. Okazaki, H. Ohya, T. Yamazaki, K. Ouchi, I. Suzuki, T. Andoh, T. Kenri, Y. Sasaki, A. Horino, M. Shintani, Y. Arakawa, and T. Sasaki. 2004. Characterization and molecular analysis of macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae* clinical isolates obtained in Japan. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**:4624–4630.
12. McAuliffe, L., R. D. Ayling, and R. A. Nicholas. 2007. Identification and characterization of variable-number tandem-repeat markers for the molecular epidemiological analysis of *Mycoplasma mycoides* subspecies *mycoides* SC. *FEMS Microbiol. Lett.* **276**:181–188.
13. Meseguer, M. A., S. Garcia-Rull, J. Picher, J. Ortiz-Saracho, L. Maiz, and F. Baquero. 1995. Isolation of *Mycoplasma pneumoniae* from pericardial tissue. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **14**:825–826.
14. Pereyre, S., A. Charron, H. Renaudin, C. Bébér, and C. M. Bébér. 2007. First report of macrolide-resistant strains and description of a novel nucleotide sequence variation in the P1 adhesin gene in *Mycoplasma pneumoniae* clinical strains isolated in France over 12 years. *J. Clin. Microbiol.* **45**:3534–3539.
15. Razin, S., D. Yogev, and Y. Naot. 1998. Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**:1094–1156.
16. Rocha, E. P., and A. Blanchard. 2002. Genomic repeats, genome plasticity and the dynamics of *Mycoplasma* evolution. *Nucleic Acids Res.* **30**:2031–2042.
17. Sasaki, T., T. Kenri, N. Okazaki, M. Iseki, R. Yamashita, M. Shintani, Y. Sasaki, and M. Yayoshi. 1996. Epidemiological study of *Mycoplasma pneumoniae* infections in Japan based on PCR-restriction fragment length polymorphism of the P1 cytoadhesin gene. *J. Clin. Microbiol.* **34**:447–449.
18. Schouls, L. M., H. G. van der Heide, L. Vauterin, P. Vauterin, and F. R. Mooi. 2004. Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis of Dutch *Bordetella pertussis* strains reveals rapid genetic changes with clonal expansion during the late 1990s. *J. Bacteriol.* **186**:5496–5505.
19. van Belkum, A., P. T. Tassios, L. Dijkshoorn, S. Haeggman, B. Cookson, N. K. Fry, V. Fussing, J. Green, E. Feil, P. Gerner-Smidt, S. Brisse, and M. Struelens. 2007. Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. *Clin. Microbiol. Infect.* **13**(Suppl. 3):1–46.
20. Vergnaud, G., and C. Pourcel. 2006. Multiple locus VNTR (variable number of tandem repeat) analysis (MLVA), p. 83–104. In E. Stackebrandt (ed.), *Molecular identification, systematics and population structure of prokaryotes*. Springer-Verlag, Berlin, Germany.
21. Waites, K. B., C. M. Bébér, J. A. Roberston, D. F. Talkington, and G. E. Kenny (ed.). 2001. Cumitech 34, Laboratory diagnosis of mycoplasmal infections. Coordinating ed., F. S. Nolte. American Society for Microbiology, Washington, DC.
22. Waites, K. B., and D. F. Talkington. 2004. *Mycoplasma pneumoniae* and its role as a human pathogen. *Clin. Microbiol. Rev.* **17**:697–728.

DISCUSSION - PERSPECTIVES

DISCUSSION - PERSPECTIVES

Les mycoplasmes humains peuvent être commensaux ou pathogènes. Au sein des mycoplasmes pathogènes, il existe des mycoplasmes à tropisme respiratoire, parmi lesquels *M. pneumoniae*, et d'autres dont le tropisme est la sphère urogénitale, comme *M. genitalium*. *M. pneumoniae* est responsable d'infections respiratoires et de pneumopathies atypiques. *M. genitalium* est un agent émergent, responsable d'IST, urétrites chez l'homme et cervicites chez la femme. Ces deux espèces de mycoplasmes sont principalement responsables d'infections aiguës, mais pour un certain nombre de patients ils peuvent être à l'origine d'infections chroniques, aux complications respiratoires pour l'une et génitales pour l'autre qui restent encore à préciser.

La maîtrise des infections humaines à mycoplasmes passe par une connaissance approfondie de leur épidémiologie, l'amélioration des moyens de dépistage, de prévention et de traitement. Si le développement de schémas antibiotiques efficaces reste un challenge avec notamment l'émergence de résistances acquises pour ces deux espèces, des progrès significatifs ont été réalisés ces dernières années grâce à l'acquisition de connaissances moléculaires des mycoplasmes sur le plan antigénique et génomique (436). D'un point de vue pratique, ces connaissances ont permis des avancées, comme l'amélioration du diagnostic, notamment par le développement de diverses méthodes d'amplification d'acides nucléiques. D'un point de vue plus fondamental, ces avancées ont aussi apporté un éclairage nouveau sur la biologie de ces microorganismes. Plus particulièrement, elles ont fait évoluer les connaissances en mettant en évidence une grande plasticité et de nombreux échanges génétiques entre mycoplasmes (437).

La MLVA est une méthode génotypique récente qui présente de nombreux avantages, comme un pouvoir discriminant élevé, une utilisation facile, un coût modéré, une reproductibilité élevée, une facilité d'analyse et de partage des données et la possibilité d'être réalisée directement à partir des prélèvements. Elle a été appliquée avec succès à bon nombre d'espèces bactériennes pathogènes humaines et son développement chez les *Mollicutes* était confidentiel au début de ce travail. Nous avons souhaité l'adapter aux deux espèces humaines, *M. genitalium* et *M. pneumoniae*. Nous discuterons de façon synthétique les résultats obtenus pour les deux espèces en les groupant, une discussion détaillée ayant été rédigée dans chacun des deux articles relatifs à la MLVA *M. genitalium* et la MLVA *M. pneumoniae*.

Le premier objectif de ce travail de thèse, dans le but d'enrichir notre collection de prélèvements positifs pour *M. genitalium*, a été de mettre en place **un protocole de recherche clinique**, appelé **FeminIST**, proposant un dépistage systématique du portage de *M. genitalium* chez les femmes VIH+ de la cohorte Aquitaine. Ce protocole permettra également de préciser la prévalence de cette infection dans cette population.

Concernant les premiers résultats, trois patientes sur les 85 testées avaient une PCR positive pour *M. genitalium*, soit 3,5 %. Une seule était symptomatique à l'inclusion. Aucune des patientes n'avait une PCR positive pour *C. trachomatis*. Les

inclusions se poursuivent toujours afin d'arriver aux 250 inclusions prévues initialement. Le nombre d'inclusions doit être suffisamment important afin de pouvoir tirer des conclusions fiables en terme de prévalence.

Cette prévalence d'infection à *M. genitalium* de 3,5 % est en accord avec les données de prévalence d'études récentes, réalisées chez des patientes asymptomatiques issues de pays développés, majoritairement séronégatives, variant de 0,8 % (485) à 6,4 % (410). Chez les femmes françaises VIH+ il ne semble pas exister une prévalence supérieure de cette infection par rapport aux femmes séronégatives, à la différence des populations féminines à risque d'IST des pays en voie de développement. La nécessité de rapports sexuels protégés chez ces femmes et l'éducation réalisée lors des consultations de suivi de leur infection VIH pourrait expliquer cette faible prévalence. L'étude des auto-questionnaires qui suivra permettra de préciser ces hypothèses.

L'absence de patiente infectée à *C. trachomatis* peut s'expliquer par l'âge des patientes incluses. En effet, l'infection à *C. trachomatis* touche préférentiellement les jeunes femmes de moins de 25 ans, or la moyenne d'âges des patientes de cette étude était de 39,5 ans et seulement trois patientes avaient moins de 25 ans.

Le lien entre l'infection VIH et l'infection à *M. genitalium* a été évoqué dans diverses études et des études supplémentaires sont nécessaires afin de mieux comprendre l'association entre ces deux infections. Soit l'infection par le VIH constitue un facteur de risque d'acquisition de *M. genitalium* par le biais des rapports non protégés plus fréquents dans cette population, ou bien par le biais de l'immunodépression induite par le VIH pérennisant l'infection à *M. genitalium*. Soit l'infection à *M. genitalium* constitue un facteur de risque d'acquisition du VIH, par le biais d'une inflammation génitale chronique sans ulcération, comme cela a déjà été évoqué dans le passé pour d'autres mycoplasmes humains (20, 40, 334). De plus, les IST augmentent l'infectiosité des personnes séropositives pour le VIH (293). La question de rechercher systématiquement *M. genitalium* dans les populations à haut risque d'IST peut se poser. Les patients infectés pourraient être traités, ce qui pourrait représenter une stratégie de prévention de l'infection VIH.

Les méthodes de génotypage de *M. genitalium* et *M. pneumoniae* étaient limitées au début de ce travail. L'une des principales méthodes pour *M. genitalium* repose sur le séquençage d'un fragment de 281 pb du gène *mgpB*, codant pour la principale cytoadhésine de cette espèce bactérienne, à la recherche de SNP. Certes elle présente un pouvoir discriminant élevé, mais l'étape de séquençage, fastidieuse, surtout lorsqu'elle est réalisée à partir des prélèvements cliniques, rend cette méthode lourde à réaliser en routine. Plus récemment une méthode génotypique multilocus a été proposée, combinant l'analyse d'un VNTR et la recherche de SNP dans le gène *mgpB*. Elle est plus discriminante que la seule analyse des SNP de *mgpB*, mais elle nécessite deux étapes de séquençage, la première pour l'analyse du VNTR et la seconde pour l'analyse du gène *mgpB*. La principale méthode de typage pour *M. pneumoniae* est la PCR-RFLP du gène de l'adhésine P1, certes applicable directement à partir des prélèvements positifs pour *M. pneumoniae*, mais très peu discriminante, avec seulement deux types principaux 1 et 2 et quelques variants des deux types. Il était donc nécessaire pour ces deux espèces de mettre au point une méthode génotypique plus simple et si possible automatisée et applicable

directement à partir des prélèvements. La **MLVA** répondait à tous ces critères et sa mise au point pour *M. genitalium* et *M. pneumoniae* a fait l'objet des deuxième et troisième objectifs de notre travail. Nous avons ensuite comparé la MLVA aux méthodes de typage déjà utilisées pour chaque espèce, la recherche de SNP dans le gène *mgpB* et la méthode combinant l'analyse du VNTR MG309-STR et le SNP *mgpB* pour *M. genitalium*, et la PCR-RFLP de l'adhésine P1 pour *M. pneumoniae*.

Nous avons d'abord **mis au point la méthode MLVA** sur les quelques souches de *M. genitalium* disponibles au laboratoire et l'avons ensuite appliquée à une collection de 123 prélèvements d'année et d'origine géographiques différentes. Pour *M. pneumoniae*, la MLVA a été mise au point sur quelques souches, puis appliquée à une collection de 265 souches issues de pays différents (Europe, Japon et Tunisie). Six et cinq VNTR ont été identifiés comme discriminants pour *M. genitalium* et *M. pneumoniae*, respectivement. La stabilité des marqueurs a été vérifiée après 10 passages sur cinq souches de *M. genitalium* et *M. pneumoniae*, ainsi que sur des prélèvements concomitants chez un même patient provenant de sites anatomiques différents. L'analyse de ces différents loci a été réalisée grâce à des PCR multiplexes avec des amorces marquées permettant une analyse automatisée par électrophorèse capillaire. Deux PCR triplexes pour *M. genitalium*, ainsi qu'une PCR triplexe et une PCR duplexe pour *M. pneumoniae* ont été mises au point. Pour certains prélèvements positifs pour *M. genitalium*, notamment ceux dont la charge bactérienne était faible, il a été nécessaire de mettre au point des semi-nested ou des nested PCR, permettant au final d'amplifier correctement 89,4 % des échantillons cliniques. Nous n'avons pas eu ce genre de problème avec *M. pneumoniae* puisque la MLVA a été appliquée à des souches et non à des prélèvements. Au total, toutes les souches de *M. pneumoniae* ont été correctement typées. Les PCR multiplexes et l'automatisation de la méthode ont permis une analyse plus simple et plus rapide des résultats, comparée à l'électrophorèse sur gel d'agarose. L'automatisation était surtout intéressante pour l'analyse des VNTR dont le motif répété était de petite taille.

Un inconvénient de la MLVA pour *M. genitalium* est la **présence d'allèles multiples** pour certains loci. La moitié des prélèvements présentait des allèles multiples sur au moins un locus, ceci pouvant compliquer l'analyse des résultats. Cependant, ces allèles multiples pouvaient sans problème être séparés par l'électrophorèse capillaire, à la différence des méthodes par séquençage où la présence de doubles pics, liées à ces allèles multiples, est toujours d'interprétation délicate. La présence des allèles multiples a été vérifiée par le clonage et le séquençage des produits de PCR de certains prélèvements et ne correspondait pas un artefact de la méthode. De plus, des allèles multiples avaient déjà été décrits dans la littérature pour trois des VNTR utilisés dans notre set (MG307-STR, MG309-STR et MG338-STR) et les résultats étaient identiques pour des couples de patients concomitamment infectés, confirmant la stabilité de ces marqueurs. Pour chacun des prélèvements contenant des allèles multiples, les allèles variaient seulement d'une à deux répétitions d'unités, alors qu'il n'y avait pas d'ambiguïté sur l'analyse SNP de *mgpB*. Ainsi, la présence d'allèles multiples pour les VNTR ne semble pas être due à une co-infection par plusieurs souches de *M. genitalium*. Seule exception deux prélèvements concomitants d'un même patient (B14607 et B14608) différaient à la fois sur l'analyse MLVA et également sur l'analyse SNP de *mgpB*, suggérant la présence de deux souches différentes de *M. genitalium* chez ce patient. Ces allèles

multiples sur les éléments répétés sont connus de longue date et sont probablement la conséquence d'un dérapage de la polymérase durant la réplication de l'ADN, ceci est d'autant plus vrai pour les motifs répétés de petite taille, ce qui est vérifié dans notre étude.

Les index de diversité de nos schémas MLVA sont respectivement de 1 et de 0,91 pour *M. genitalium* et *M. pneumoniae*. Idéalement un index de diversité doit être de 1, mais en pratique il doit être au moins compris entre 0,90 et 0,95 pour que la méthode génotypique soit validée. Nos méthodes atteignent parfaitement cet objectif. Cependant, l'index de diversité doit être interprété par rapport au pouvoir discriminant des autres méthodes de génotypage utilisées dans ce travail. L'index de diversité de l'analyse SNP de *mgpB* est de 0,87 et celui de la combinaison d'un VNTR et de l'analyse SNP de *mgpB* est de 0,99. La MLVA de *M. genitalium* possède un pouvoir discriminant légèrement supérieur à celui de l'analyse SNP seule, mais équivalent à celui de la méthode multilocus. Pour *M. pneumoniae*, la MLVA est plus discriminante que la PCR-RFLP dont l'index de diversité est beaucoup plus bas à 0,51. De plus, la PCR-RFLP classe les souches en seulement trois catégories, type 1, 2 et inclassable, alors que la MLVA permet la détermination de 26 types différents.

La diversité allélique de chaque VNTR varie significativement. Les quatre trinuécléotides utilisés pour *M. genitalium* (MG307-STR, MG309-STR, MG338-STR et Mge1) sont plus discriminants que les deux autres VNTR, dont la taille du motif répété est plus grande. Pour *M. pneumoniae*, les marqueurs Mpn1, Mpn13, Mpn14 et Mpn15 sont plus discriminants que le marqueur Mpn16 dont le motif répété a la taille la plus grande. En théorie, cette association de marqueurs avec des index de diversité variables est aussi un point fort de ces méthodes MLVA pour les appliquer aux études épidémiologiques.

Les six VNTR de la MLVA *M. genitalium* sont **localisés dans des gènes**, trois dans des gènes de lipoprotéines (MG307-STR, MG309-STR et MG338-STR), connus pour présenter des variations sur les souches cliniques, ce qui peut expliquer la diversité allélique particulièrement marquée de ces VNTR. Mge1 est localisé dans le gène *mgpB*. Des études préliminaires montraient que des TR dans ce locus pouvaient présenter d'importantes variations au sein même d'une souche, dues à des phénomènes de recombinaison. Mge1 est localisé en dehors des régions EF et G de *mgpB*, partageant des homologies de séquence avec les neuf éléments répétés dans le génome de *M. genitalium* appelés MgPar, à l'origine de recombinaisons. Ainsi, Mge1 est localisé dans une région, non connue pour présenter des phénomènes de recombinaison chez *M. genitalium* G37. De plus, une analyse antérieure de ce même trinuécléotide sur divers clones de la souche *M. genitalium* G37 a montré la stabilité *in vitro* de ce VNTR (183). Dans ce travail, Mge1 est stable *in vitro* sur les cinq souches analysées. La stabilité *in vivo* a été aussi vérifiée sur les prélèvements concomitants de sites différents chez un même patient, avec un même nombre de copies chez 10 des 12 patients analysés. Enfin, ce VNTR était stable sur des souches isolées à différentes dates chez un même patient. Pour toutes ces raisons ce VNTR a été retenu. Mge2 est localisé dans un gène d'adhésine, connue pour présenter des variations chez les mycoplasmes. Enfin, Mge3 est localisé sur une protéine impliquée dans le phénomène de « gliding » et non connue pour présenter des variations, ce qui peut expliquer le faible pouvoir discriminant de ce marqueur.

Des cinq VNTR de la MLVA de *M. pneumoniae*, seulement un est situé dans une région intergénique (Mpn13). Mpn1 est localisé dans le gène *hsdS*, codant pour la sous-unité S d'une enzyme de restriction-modification de type I, impliquée dans la protection contre les ADN étrangers. La sous-unité S de cette enzyme est connue pour être très variable, ceci pouvant expliquer l'importante variation allélique de ce marqueur.

A l'aide du logiciel BioNumerics, **des représentations hiérarchiques des résultats des MLVA** ont été réalisées sous la forme d'un dendrogramme pour *M. genitalium* et d'un « minimal spanning tree » (MST) pour *M. pneumoniae*. Comme il a été rappelé dans l'étude bibliographique, ces deux types de représentations offrent des visions différentes des relations génotypiques entre des bactéries d'une même espèce. Le MST offre une représentation plus visuelle des relations, notamment en mettant en évidence des clusters de génotypes. Le MST est particulièrement utile pour représenter des données de MLST et de MLVA.

Pour *M. genitalium*, nous avons analysé les profils de 110 prélèvements correctement typés par MLVA, issus de 98 patients non reliés sur le plan épidémiologique. La construction d'un MST n'était pas satisfaisante à cause de la présence des allèles multiples augmentant artificiellement la distance génétique entre les types MLVA ; le MST ainsi construit montrait des cercles très éloignés les uns des autres. Un dendrogramme a été construit à partir des données de la MLVA de *M. genitalium*. Il ne met pas en évidence de cluster de prélèvements selon l'origine géographique, l'année, le sexe du patient ou le tableau clinique. Parmi ces prélèvements, seulement sept sets de deux prélèvements non concomitants ont des profils équivalents. Concernant l'ensemble des prélèvements concomitants pour un même patient, il existe un important degré de similarité, suggérant une concordance épidémiologique suffisante de la méthode. L'hétérogénéité génétique, révélée par le nombre important de génotypes MLVA, confirme le caractère endémique de *M. genitalium* en France et en Tunisie, les infections n'étant pas la conséquence d'une dissémination clonale, ce qui avait été déjà évoqué dans une étude précédente (169). A noter qu'il n'existe pas de corrélation entre les résultats de la MLVA et ceux des deux autres méthodes de typage dans notre étude. Enfin, il serait bien évidemment intéressant de tester cette méthode sur des couples infectés, afin de renforcer la reproductibilité et la stabilité de la méthode. Seulement, à cause de la gestion anonyme des IST en France dans les centres de dépistage, il nous est très difficile d'identifier des prélèvements issus de couples de patients infectés simultanément.

Après construction d'un MST **pour *M. pneumoniae***, comme pour *M. genitalium* il n'existe pas de cluster de souches selon l'année, le sexe du patient, le tableau clinique, le site anatomique du prélèvement ou la résistance aux macrolides. En revanche, des souches ont pu être regroupées en fonction de leur origine géographique. Ainsi, les huit souches tunisiennes et les deux souches espagnoles sont regroupées dans un même type MLVA, P et E, respectivement. Les huit souches tunisiennes appartiennent au type MLVA P, regroupant 46 souches, suggérant un niveau très bas de diversité génétique et la diffusion d'une population génétiquement homogène dans ce pays. Les 12 souches résistantes aux macrolides (neuf japonaises, deux françaises et une danoise) ne sont pas regroupées dans un même cluster, mais séparées dans neuf types MLVA différents, suggérant d'une part

une absence de lien entre cette méthode génotypique et la résistance aux macrolides, et, d'autre part, l'absence d'émergence d'une population clonale résistante aux macrolides. A la différence de *M. genitalium*, il existe une corrélation entre les deux méthodes de typage de *M. pneumoniae* qui est visible sur le MST, les souches *M. pneumoniae* de type 1 et 2 étant bien séparées avec seulement quelques exceptions. De même, le variant du type 1 et les variants du type 2 inclus dans cette étude appartiennent respectivement à des types MLVA regroupant des souches de type 1 et 2. Le MST illustre la relation entre les types MLVA sur la base du nombre de loci VNTR qui diffèrent entre deux types. L'analyse des 265 souches révèle 26 types MLVA différant sur un locus au plus, ce qui ne permet pas de définir des clusters de souches. Ceci confirme le caractère très homogène de cette espèce de mycoplasme, et ce malgré l'indice de diversité élevé de la méthode. L'homogénéité génétique de *M. pneumoniae* permet d'expliquer la difficulté des précédentes méthodes génotypiques, comme la MLST (91), pour différencier les souches entre elles. Depuis sa publication la méthode MLVA de *M. pneumoniae* a été appliquée par une autre équipe dont les résultats ont été récemment présentés, confirmant nos premières données (index de diversité de 0,92, similaire au nôtre, et souches résistantes aux macrolides réparties dans plusieurs types MLVA), (264).

Notre méthode a permis de **différencier rechute et réinfection** pour les deux espèces. Ainsi, pour *M. genitalium*, l'analyse des trois prélèvements séquentiels (M6151, M6090 et M6312) d'un même patient montre qu'il s'est réinfecté avec une souche différente puis a fait une rechute avec la souche de départ. Pour *M. pneumoniae*, deux souches d'un même patient isolées à deux mois d'intervalle (B2829 et B2892) présentaient deux types MLVA différents suggérant une réinfection par une nouvelle souche plutôt qu'une rechute.

La technique MLVA de *M. genitalium* étant validée et en cours de publication, une des principales **perspectives** est de l'appliquer à des couples infectés simultanément. Nous essaierons d'établir une collaboration plus étroite avec les centres de dépistage anonyme afin de mieux identifier les couples de patients, ainsi qu'avec les infectiologues, dermatologues et gynécologues, amenés à voir lors de leur consultation des IST possiblement en lien avec *M. genitalium*. Il est également possible de solliciter nos collègues scandinaves, où la gestion différente des IST leur permet d'identifier plus facilement des couples de patients, afin qu'ils nous transmettent des prélèvements à analyser.

Cette méthode de typage permettra de mieux suivre l'évolution des infections à *M. genitalium*, espèce émergente et peu connue des médecins cliniciens. Sa dissémination sera peut-être accélérée par le relâchement des mesures de protection sexuelle récemment constaté, à l'origine actuellement d'une augmentation de l'incidence des principales IST (*C. trachomatis*, syphilis, *N. gonorrhoeae*).

Malgré la diversité géographique de notre collection de souches de *M. pneumoniae* analysées, aucune n'a été isolée lors d'une épidémie d'infections à *M. pneumoniae*. Il serait très intéressant d'étudier à présent des souches issues d'une épidémie, ce qui renforcerait la concordance épidémiologique et la stabilité de la méthode. Le niveau de discrimination de la MLVA serait aussi évalué en comparant les souches issues d'une épidémie à des souches isolées dans une

même zone géographique et sur une période similaire, mais non reliées sur un plan épidémiologique.

A la différence de *M. genitalium*, la MLVA de *M. pneumoniae* est actuellement appliquée aux souches, obtenues après culture de prélèvements ayant une PCR positive pour *M. pneumoniae*. La difficulté d'obtention des souches de *M. pneumoniae* et le manque de sensibilité de la culture par rapport aux méthodes diagnostiques avec amplification d'acides nucléiques rendent indispensable dans un premier temps d'adapter la méthode directement à partir de prélèvements de patients infectés. A ce jour, les premiers essais de typage MLVA réalisés sur des prélèvements positifs pour *M. pneumoniae*, en utilisant les conditions décrites pour *M. genitalium*, s'avèrent encourageants avec des résultats concordants avec ceux obtenus sur les souches.

Il serait également intéressant de créer deux bases de données dédiées au typage de *M. genitalium* et *M. pneumoniae*, accessible sur internet, comme cela est déjà fait pour d'autres espèces bactériennes ou pour d'autres méthodes (MLST). Ainsi, l'ensemble de la communauté scientifique pourrait plus facilement partager les données de typage de ces deux espèces.

Enfin, le séquençage de plusieurs génomes de *M. genitalium* (314) permettra de déterminer d'autres zones variables d'intérêt pour le génotypage et notamment la recherche de SNP sur l'ensemble du génome bactérien. Notre laboratoire a initié le séquençage de huit génomes de *M. pneumoniae* isolées dans des situations pathologiques différentes, de type MLVA et PCR-RFLP différents. L'obtention de plusieurs génomes de *M. pneumoniae* devrait nous permettre de déterminer d'autres VNTR afin d'augmenter le pouvoir discriminant de la méthode et de mieux appréhender le lien entre génotype et pathogénicité. La recherche de SNP sur l'ensemble de ces génomes pourrait également permettre de relancer les essais de MLST jusque là infructueux avec cette bactérie.

En conclusion, la MLVA a été appliquée avec succès à une large collection de prélèvements ou de souches cliniques des deux espèces de mycoplasmes envisagées, *M. genitalium* et *M. pneumoniae*. Pour les deux mycoplasmes, la MLVA a soit un pouvoir discriminant équivalent soit supérieur à ceux des méthodes génotypiques précédemment décrites, sans nécessiter une étape fastidieuse de séquençage. La méthode a une bonne concordance épidémiologique. De plus, les résultats de la MLVA pouvant être exprimés en valeur numérique de répétitions, ils peuvent être facilement échangeables entre laboratoires. Les premiers résultats confirment l'hétérogénéité de *M. genitalium*, présent à l'état endémique en France et en Tunisie, sans dissémination clonale. A l'inverse en ce qui concerne *M. pneumoniae*, les résultats de la MLVA confirment le caractère homogène de cette espèce.

Enfin, la prévalence de l'infection à *M. genitalium* chez les femmes françaises VIH+ est en cours d'analyse grâce au protocole de recherche clinique mis en place durant cette thèse.

De façon plus générale, l'utilisation de la MLVA est actuellement en pleine expansion chez les mycoplasmes et elle est appliquée à un nombre croissant d'espèces comme cela a été présenté au dernier congrès de l'International Organization for Mycoplasmaology (138, 139). Ceci conforte notre choix de méthode génotypique qui s'avère être particulièrement intéressante pour plusieurs genres bactériens pathogènes humains dont les mycoplasmes.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. **Abe, S., H. Nakamura, S. Inoue, H. Takeda, H. Saito, S. Kato, N. Mukaida, K. Matsushima, and H. Tomoike.** 2000. Interleukin-8 gene repression by clarithromycin is mediated by the activator protein-1 binding site in human bronchial epithelial cells. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* **22**:51-60.
2. **Abele-Horn, M., U. Busch, H. Nitschko, E. Jacobs, R. Bax, F. Pfaff, B. Schaffer, and J. Heesemann.** 1998. Molecular approaches to diagnosis of pulmonary diseases due to *Mycoplasma pneumoniae*. *J. Clin. Microbiol.* **36**:548-551.
3. **Adair, D. M., P. L. Worsham, K. K. Hill, A. M. Klevytska, P. J. Jackson, A. M. Friedlander, and P. Keim.** 2000. Diversity in a variable-number tandem repeat from *Yersinia pestis*. *J. Clin. Microbiol.* **38**:1516-1519.
4. **AFSSAPS** (Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé). 2008. Traitement probabiliste des urétrites et cervicites non compliquées.
5. **Anagrus, C., B. Lore, and J. S. Jensen.** 2005. *Mycoplasma genitalium*: prevalence, clinical significance, and transmission. *Sex. Transm. Infect.* **81**:458-462.
6. **Andersen, B., I. Sokolowski, L. Ostergaard, J. Kjolseth Moller, F. Olesen, and J. S. Jensen.** 2007. *Mycoplasma genitalium*: prevalence and behavioural risk factors in the general population. *Sex. Transm. Infect.* **83**:237-241.
7. **Andersen, M. T., R. D. Newcomb, L. W. Liefing, and R. E. Beever.** 2006. Phylogenetic analysis of "*Candidatus* Phytoplasma australiense" reveals distinct populations in New Zealand. *Phytopathology* **96**:838-845.
8. **Apfalter, P., B. Stoiser, W. Barousch, M. Nehr, L. Kramer, and H. Burgmann.** 2005. Community-acquired bacteria frequently detected by means of quantitative polymerase chain reaction in nosocomial early-onset ventilator-associated pneumonia. *Crit. Care Med.* **33**:1492-1498.
9. **Arber, W.** 2000. Genetic variation: molecular mechanisms and impact on microbial evolution. *FEMS Microbiol. Rev.* **24**:1-7.
10. **Arnaud, G., S. Malembic-Maher, P. Salar, P. Bonnet, M. Maixner, C. Marcone, E. Boudon-Padieu, and X. Foissac.** 2007. Multilocus sequence typing confirms the close genetic interrelatedness of three distinct flavescence dorée phytoplasma strain clusters and group 16SrV phytoplasmas infecting grapevine and alder in Europe. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**:4001-4010.
11. **Atkinson, T. P., M. F. Balish, and K. B. Waites.** 2008. Epidemiology, clinical manifestations, pathogenesis and laboratory detection of *Mycoplasma pneumoniae* infections. *FEMS Microbiol. Rev.* **32**:956-973.
12. **Baczynska, A., M. Hvid, P. Lamy, S. Birkelund, G. Christiansen, and J. Fedder.** 2008. Prevalence of *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis* and *Chlamydia trachomatis* among Danish patients requesting abortion. *Syst. Biol. Reprod. Med.* **54**:127-134.
13. **Balish, M. F., and D. C. Krause.** 2006. Mycoplasmas: a distinct cytoskeleton for wall-less bacteria. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **11**:244-255.
14. **Ban, N., P. Nissen, J. Hansen, P. B. Moore, and T. A. Steitz.** 2000. The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 Å resolution. *Science*. **289**:905-920.
15. **Barré, A., A. de Daruvar, and A. Blanchard.** 2004. MolliGen, a database dedicated to the comparative genomics of *Mollicutes*. *Nucleic Acids Res.* **32**:D307-310.
16. **Barré, A., C. Lemaitre, P. Thébault, A. de Daruvar, A. Blanchard, and P. Sirand-Pugnet.** 2010. MolliGen 3.0, evolution of a database dedicated to the comparative genomics of *Mollicutes*. Presented at the 18th Congress of the International Organization for Mycoplasmaology. Abstract 194, Chianciano, Italy, 11-16 July.
17. **Baseman, J. B., S. F. Dallo, J. G. Tully, and D. L. Rose.** 1988. Isolation and characterization of *Mycoplasma genitalium* strains from the human respiratory tract. *J. Clin. Microbiol.* **26**:2266-2269.
18. **Bébéar, C., and C. M. Bébéar.** 2007. Infections humaines à mycoplasmes. *Revue Française des Laboratoires* **391**:63-69.
19. **Bébéar, C., C. Cazanave, S. Pereyre, and C. M. Bébéar.** 2009. Mycoplasmes urogénitaux, p. 57-61. In M. Janier (ed.), *Les maladies sexuellement transmissibles*. MASSON, Paris.
20. **Bébéar, C., B. de Barbeyrac, M. T. Clerc, H. Renaudin, H. J. Fleury, M. Dupon, J. M. Ragnaud, and P. Morlat.** 1993. Mycoplasmas in HIV-1 seropositive patients. *Lancet* **341**:758-759.

21. **Bébéar, C. M.** 2009. *Mycoplasma, Ureaplasma*, p. 519-529. In P. Courvalin, R. Leclercq, and L. B. Rice (ed.), *Antibiogram*. A. P. ESKA Publishing, Portland.
22. **Bébéar, C. M.** 2008. Pathogenesis and laboratory diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* infections. *Arch. Pediatr.* **15**:1253-1256.
23. **Bébéar, C. M.** 2007. Physiopathologie et diagnostic des infections à *Mycoplasma pneumoniae*. *Revue française d'allergologie et d'immunologie clinique* **47**:438-441.
24. **Bébéar, C. M., B. de Barbeyrac, G. Carcenac, S. Pereyre, and C. Bébéar.** 2006. *Mycoplasma genitalium*, a cause of urethritis and other sexually transmitted diseases. *Med. Mal. Infect.* **36**:S25-S27.
25. **Bébéar, C. M., B. de Barbeyrac, S. Pereyre, and C. Bébéar.** 2007. Mycoplasmes et chlamydiae : sensibilité et résistance aux antibiotiques. *Revue Française des laboratoires* **392**:77-85.
26. **Bébéar, C. M., B. de Barbeyrac, S. Pereyre, H. Renaudin, M. Clerc, and 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.
27. **Bébéar, C. M., and I. Kempf.** 2005. Antimicrobial therapy and antimicrobial resistance, p. 535-568. In A. Blanchard and G. F. Browning (ed.), *Mycoplasmas: pathogenesis, molecular biology, and emerging strategies for control*. Horizon Bioscience, Wymondham.
28. **Bébéar, C. M., and S. Pereyre.** 2005. Mechanisms of drug resistance in *Mycoplasma pneumoniae*. *Curr. Drug Targets Infect. Disord.* **5**:263-271.
29. **Belloy, L., M. Janovsky, E. M. Vilei, P. Pilo, M. Giacometti, and J. Frey.** 2003. Molecular epidemiology of *Mycoplasma conjunctivae* in Caprinae: transmission across species in natural outbreaks. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:1913-1919.
30. **Benson, G.** 1999. Tandem repeats finder: a program to analyze DNA sequences. *Nucleic Acids Res.* **27**:573-580.
31. **Bernet, C., M. Garret, B. de Barbeyrac, C. Bébéar, and J. Bonnet.** 1989. Detection of *Mycoplasma pneumoniae* by using the polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* **27**:2492-2496.
32. **Bertaccini, A., S. Kakizawa, S. Paltrinieri, B. Duduk, J. Mitrovic, J. F. Mejia, E. Alvarez, N. Contaldo, and K. Oshima.** 2010. Molecular comparison of *amp* gene from several "*Candidatus Phytoplasma asteris*" strains. Presented at the 18th Congress of the International Organization for Mycoplasmaology. Abstract 132, Chianciano, Italy, 11-16 July.
33. **Bhugra, B., and K. Dybvig.** 1993. Identification and characterization of IS1138, a transposable element from *Mycoplasma pulmonis* that belongs to the IS3 family. *Mol. Microbiol.* **7**:577-584.
34. **Biscardi, S., M. Lorrot, E. Marc, F. Moulin, B. Boutonnat-Faucher, C. Heilbronner, J. L. Iniguez, M. Chaussain, E. Nicand, J. Raymond, and D. Gendrel.** 2004. *Mycoplasma pneumoniae* and asthma in children. *Clin. Infect. Dis.* **38**:1341-1346.
35. **Bjartling, C., S. Osser, and K. Persson.** 2010. The association between *Mycoplasma genitalium* and pelvic inflammatory disease after termination of pregnancy. *BJOG* **117**:361-364.
36. **Bjornelius, E., C. Anagrus, G. Bojs, H. Carlberg, G. Johannisson, E. Johansson, H. Moi, J. S. Jensen, and P. Lidbrink.** 2008. Antibiotic treatment of symptomatic *Mycoplasma genitalium* infection in Scandinavia: a controlled clinical trial. *Sex. Transm. Infect.* **84**:72-76.
37. **Bjornelius, E., P. Lidbrink, and J. S. Jensen.** 2000. *Mycoplasma genitalium* in non-gonococcal urethritis—a study in Swedish male STD patients. *Int. J. STD AIDS* **11**:292-296.
38. **Black, V., P. Magooa, F. Radebe, M. Myers, C. Pillay, and D. A. Lewis.** 2008. The detection of urethritis pathogens among patients with the male urethritis syndrome, genital ulcer syndrome and HIV voluntary counselling and testing clients: should South Africa's syndromic management approach be revised? *Sex. Transm. Infect.* **84**:254-258.
39. **Blanchard, A., and C. M. Bébéar.** 2002. Mycoplasmas of humans, p. 45-71. In S. Razin and R. Herrmann (ed.), *Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas*. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.
40. **Blanchard, A., and L. Montagnier.** 1994. AIDS-associated mycoplasmas. *Annu. Rev. Microbiol.* **48**:687-712.
41. **Boguslavsky, S., D. Menaker, I. Lysnyansky, T. Liu, S. Levisohn, R. Rosengarten, M. Garcia, and D. Yogeve.** 2000. Molecular characterization of the *Mycoplasma gallisepticum* *pvpA* gene which encodes a putative variable cytoadhesin protein. *Infect. Immun.* **68**:3956-3964.

42. **Bradshaw, C. S., M. Y. Chen, and C. K. Fairley.** 2008. Persistence of *Mycoplasma genitalium* following azithromycin therapy. *PLoS One* **3**:e3618.
43. **Bradshaw, C. S., C. K. Fairley, N. A. Lister, S. J. Chen, S. M. Garland, and S. N. Tabrizi.** 2009. *Mycoplasma genitalium* in men who have sex with men at male-only saunas. *Sex. Transm. Infect.* **85**:432-435.
44. **Bradshaw, C. S., J. S. Jensen, S. N. Tabrizi, T. R. Read, S. M. Garland, C. A. Hopkins, L. M. Moss, and C. K. Fairley.** 2006. Azithromycin failure in *Mycoplasma genitalium* urethritis. *Emerg. Infect. Dis.* **12**:1149-1152.
45. **Bradshaw, C. S., S. N. Tabrizi, T. R. Read, S. M. Garland, C. A. Hopkins, L. M. Moss, and C. K. Fairley.** 2006. Etiologies of nongonococcal urethritis: bacteria, viruses, and the association with orogenital exposure. *J. Infect. Dis.* **193**:336-345.
46. **Breton, M., S. Duret, N. Arricau-Bouvery, L. Beven, and J. Renaudin.** 2008. Characterizing the replication and stability regions of *Spiroplasma citri* plasmids identifies a novel replication protein and expands the genetic toolbox for plant-pathogenic spiroplasmas. *Microbiology* **154**:3232-3244.
47. **Brochet, M., C. Rusniok, E. Couve, S. Dramsi, C. Poyart, P. Trieu-Cuot, F. Kunst, and P. Glaser.** 2008. Shaping a bacterial genome by large chromosomal replacements, the evolutionary history of *Streptococcus agalactiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**:15961-15966.
48. **Buck, G. E., L. C. O'Hara, and J. T. Summersgill.** 1992. Rapid, sensitive detection of *Mycoplasma pneumoniae* in simulated clinical specimens by DNA amplification. *J. Clin. Microbiol.* **30**:3280-3283.
49. **Burgos, R., O. Q. Pich, M. Ferrer-Navarro, J. B. Baseman, E. Querol, and J. Pinol.** 2006. *Mycoplasma genitalium* P140 and P110 cytoadhesins are reciprocally stabilized and required for cell adhesion and terminal-organelle development. *J. Bacteriol.* **188**:8627-8637.
50. **Busolo, F., D. Camposampiero, G. Bordignon, and G. Bertollo.** 1997. Detection of *Mycoplasma genitalium* and *Chlamydia trachomatis* DNAs in male patients with urethritis using the polymerase chain reaction. *New Microbiol.* **20**:325-332.
51. **Cadieux, N., P. Lebel, and R. Brousseau.** 1993. Use of a triplex polymerase chain reaction for the detection and differentiation of *Mycoplasma pneumoniae* and *Mycoplasma genitalium* in the presence of human DNA. *J. Gen. Microbiol.* **139**:2431-2437.
52. **Caetano-Anolles, G., B. J. Bassam, and P. M. Gresshoff.** 1992. Primer-template interactions during DNA amplification fingerprinting with single arbitrary oligonucleotides. *Mol. Gen. Genet.* **235**:157-165.
53. **Cao, B., C. J. Zhao, Y. D. Yin, F. Zhao, S. F. Song, L. Bai, J. Z. Zhang, Y. M. Liu, Y. Y. Zhang, H. Wang, and C. Wang.** 2010. High prevalence of macrolide resistance in *Mycoplasma pneumoniae* isolates from adult and adolescent patients with respiratory tract infection in China. *Clin. Infect. Dis.* **51**:189-194.
54. **Carbon, C., S. Moola, I. Velancsics, B. Leroy, M. Rangaraju, and P. Decosta.** 2003. Telithromycin 800 mg once daily for seven to ten days is an effective and well-tolerated treatment for community-acquired pneumonia. *Clin. Microbiol. Infect.* **9**:691-703.
55. **Casin, I., D. Vexiau-Robert, P. De La Salmoniere, A. Eche, B. Grandry, and M. Janier.** 2002. High prevalence of *Mycoplasma genitalium* in the lower genitourinary tract of women attending a sexually transmitted disease clinic in Paris, France. *Sex. Transm. Dis.* **29**:353-359.
56. **Cassell, G. H., and B. C. Cole.** 1981. Mycoplasmas as agents of human disease. *N. Engl. J. Med.* **304**:80-89.
57. **Chanock, R. M.** 1963. *Mycoplasma pneumoniae*: proposed nomenclature for atypical pneumonia organism (Eaton agent). *Science* **140**:662.
58. **Chanock, R. M., L. Hayflick, and 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. USA* **48**:41-49.
59. **Cheng, X., J. Nicolet, F. Poumarat, J. Regalla, F. Thiaucourt, and J. Frey.** 1995. Insertion element IS1296 in *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* small colony identifies a European clonal line distinct from African and Australian strains. *Microbiology* **141 (Pt 12)**:3221-3228.
60. **Cherry, J. D.** 1993. Anemia and mucocutaneous lesions due to *Mycoplasma pneumoniae* infections. *Clin. Infect. Dis.* **17 (Suppl 1)**:S47-S51.
61. **Christie, L. J., S. Honarmand, D. F. Talkington, S. S. Gavali, C. Preas, C. Y. Pan, S. Yagi, and C. A. Glaser.** 2007. Pediatric encephalitis: what is the role of *Mycoplasma pneumoniae*? *Pediatrics* **120**:305-313.

62. **Cimolai, N., D. Wensley, M. Seear, and E. T. Thomas.** 1995. *Mycoplasma pneumoniae* as a cofactor in severe respiratory infections. Clin. Infect. Dis. **21**:1182-1185.
63. **Clarke, S. C.** 2002. Nucleotide sequence-based typing of bacteria and the impact of automation. Bioessays **24**:858-862.
64. **Clausen, H. F., J. Fedder, M. Drasbek, P. K. Nielsen, B. Toft, H. J. Ingerslev, S. Birkelund, and G. Christiansen.** 2001. Serological investigation of *Mycoplasma genitalium* in infertile women. Hum. Reprod. **16**:1866-1874.
65. **CMIT.** 2010. Infections à mycoplasmes, p. 299-300. In CMIT (Collège des Universitaires de Maladies Infectieuses et Tropicales) (ed.), E. PILLY. Vivactis plus, Paris.
66. **Cohen, C. R., L. E. Manhart, E. A. Bukusi, S. Astete, R. C. Brunham, K. K. Holmes, S. K. Sinei, J. J. Bwayo, and P. A. Totten.** 2002. Association between *Mycoplasma genitalium* and acute endometritis. Lancet **359**:765-766.
67. **Cohen, C. R., N. R. Mugo, S. G. Astete, R. Odondo, L. E. Manhart, J. A. Kiehlbauch, W. E. Stamm, P. G. Waiyaki, and P. A. Totten.** 2005. Detection of *Mycoplasma genitalium* in women with laparoscopically diagnosed acute salpingitis. Sex. Transm. Infect. **81**:463-466.
68. **Cohen, C. R., M. Nosek, A. Meier, S. G. Astete, S. Iverson-Cabral, N. R. Mugo, and P. A. Totten.** 2007. *Mycoplasma genitalium* infection and persistence in a cohort of female sex workers in Nairobi, Kenya. Sex. Transm. Dis. **34**:274-279.
69. **Corsaro, D., M. Valassina, D. Venditti, V. Venard, A. Le Faou, and P. E. Valensin.** 1999. Multiplex PCR for rapid and differential diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* and *Chlamydia pneumoniae* in respiratory infections. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. **35**:105-108.
70. **Cosentini, R., P. Tarsia, C. Canetta, G. Graziadei, A. M. Brambilla, S. Aliberti, M. Pappalettera, F. Tantardini, and F. Blasi.** 2008. Severe asthma exacerbation: role of acute *Chlamydophila pneumoniae* and *Mycoplasma pneumoniae* infection. Respir. Res. **9**:48.
71. **Cousin-Allery, A., A. Charron, B. de Barbeyrac, G. Fremy, J. S. Jensen, H. Renaudin, and C. Bébéar.** 2000. Molecular typing of *Mycoplasma pneumoniae* strains by PCR-based methods and pulsed-field gel electrophoresis. Application to French and Danish isolates. Epidemiol. Infect. **124**:103-111.
72. **Dallo, S. F., and J. B. Baseman.** 2000. Intracellular DNA replication and long-term survival of pathogenic mycoplasmas. Microb. Pathogen. **29**:301-309.
73. **Dallo, S. F., A. Chavoya, C. J. Su, and J. B. Baseman.** 1989. DNA and protein sequence homologies between the adhesins of *Mycoplasma genitalium* and *Mycoplasma pneumoniae*. Infect. Immun. **57**:1059-1065.
74. **Daxboeck, F.** 2006. *Mycoplasma pneumoniae* central nervous system infections. Curr. Opin. Neurol. **19**:374-378.
75. **Daxboeck, F., G. Khanakah, C. Bauer, M. Stadler, H. Hofmann, and G. Stanek.** 2005. Detection of *Mycoplasma pneumoniae* in serum specimens from patients with mycoplasma pneumonia by PCR. Int. J. Med. Microbiol. **295**:279-285.
76. **de Barbeyrac, B., C. Bernet-Poggi, F. Febrer, H. Renaudin, M. Dupon, and C. Bébéar.** 1993. Detection of *Mycoplasma pneumoniae* and *Mycoplasma genitalium* in clinical samples by polymerase chain reaction. Clin. Infect. Dis. **17** (Suppl 1):S83-S89.
77. **Dégrange, S., C. Cazanave, A. Charron, H. Renaudin, C. Bébéar, and C. M. Bébéar.** 2009. Development of multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis for molecular typing of *Mycoplasma pneumoniae*. J. Clin. Microbiol. **47**:914-923.
78. **Dégrange, S., H. Renaudin, A. Charron, S. Pereyre, C. Bébéar, and C. M. Bébéar.** 2008. Reduced susceptibility to tetracyclines is associated *in vitro* with the presence of 16S rRNA mutations in *Mycoplasma hominis* and *Mycoplasma pneumoniae*. J. Antimicrob. Chemother. **61**:1390-1392.
79. **Deguchi, T., H. Komeda, M. Yasuda, K. Tada, H. Iwata, M. Asano, T. Ezaki, and Y. Kawada.** 1995. *Mycoplasma genitalium* in non-gonococcal urethritis. Int. J. STD AIDS **6**:144-145.
80. **Deguchi, T., S. Maeda, M. Tamaki, T. Yoshida, H. Ishiko, M. Ito, S. Yokoi, Y. Takahashi, and S. Ishihara.** 2001. Analysis of the *gyrA* and *parC* genes of *Mycoplasma genitalium* detected in first-pass urine of men with non-gonococcal urethritis before and after fluoroquinolone treatment. J. Antimicrob. Chemother. **48**:742-744.
81. **Deguchi, T., M. Yasuda, S. Yokoi, M. Nakano, S. Ito, K. Ohkusu, T. Ezaki, and S. Hoshina.** 2009. Failure to detect *Mycoplasma genitalium* in the pharynges of female sex workers in Japan. J. Infect. Chemother. **15**:410-413.

82. **Deguchi, T., T. Yoshida, S. Yokoi, M. Ito, M. Tamaki, H. Ishiko, and S. Maeda.** 2002. Longitudinal quantitative detection by real-time PCR of *Mycoplasma genitalium* in first-pass urine of men with recurrent non-gonococcal urethritis. *J. Clin. Microbiol.* **40**:3854-3856.
83. **Dhandayuthapani, S., W. G. Rasmussen, and J. B. Baseman.** 2002. Stability of cytoadherence-related proteins P140/P110 in *Mycoplasma genitalium* requires MG218 and unidentified factors. *Arch. Med. Res.* **33**:1-5.
84. **Dionisio, D., M. Valassina, S. Mata, R. Rossetti, A. Vivarelli, F. C. Esperti, M. Benvenuti, C. Catalani, and M. Uberti.** 1999. Encephalitis caused directly by *Mycoplasma pneumoniae*. *Scand. J. Infect. Dis.* **31**:506-509.
85. **Djordjevic, S. R., W. A. Forbes, J. Forbes-Faulkner, P. Kuhnert, S. Hum, M. A. Hornitzky, E. M. Vilei, and J. Frey.** 2001. Genetic diversity among *Mycoplasma* species bovine group 7: clonal isolates from an outbreak of polyarthritis, mastitis, and abortion in dairy cattle. *Electrophoresis* **22**:3551-3561.
86. **Domenech, C., N. Leveque, B. Lina, F. Najioullah, and D. Floret.** 2009. Role of *Mycoplasma pneumoniae* in pediatric encephalitis. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **28**:91-94.
87. **Dorigo-Zetsma, J. W., B. Wilbrink, J. Dankert, and S. A. Zaat.** 2001. *Mycoplasma pneumoniae* P1 type 1- and type 2-specific sequences within the P1 cytoadhesin gene of individual strains. *Infect. Immun.* **69**:5612-5618.
88. **Dorigo-Zetsma, J. W., B. Wilbrink, H. Vandernat, A. I. M. Bartelds, M. L. A. Heijnen, and J. Dankert.** 2001. Results of molecular detection of *Mycoplasma pneumoniae* among patients with acute respiratory infection and in their household contacts reveals children as human reservoirs. *J. Infect. Dis.* **183**:675-678.
89. **Dorigo-Zetsma, J. W., S. A. J. Zaat, A. J. M. Vriesema, and J. Dankert.** 1999. Demonstration by a nested PCR for *Mycoplasma pneumoniae* that *M. pneumoniae* load in the throat is higher in patients hospitalised for *M. pneumoniae* infection than in non-hospitalised subjects. *J. Med. Microbiol.* **48**:1115-1122.
90. **Drancourt, M., V. Roux, L. V. Dang, L. Tran-Hung, D. Castex, V. Chenal-Francisque, H. Ogata, P. E. Fournier, E. Crubezy, and D. Raoult.** 2004. Genotyping, Orientalis-like *Yersinia pestis*, and plague pandemics. *Emerg. Infect. Dis.* **10**:1585-1592.
91. **Dumke, R., I. Catrein, E. Pirkil, R. Herrmann, and E. Jacobs.** 2003. Subtyping of *Mycoplasma pneumoniae* isolates based on extended genome sequencing and on expression profiles. *Int. J. Med. Microbiol.* **292**:513-525.
92. **Dumke, R., H. von Baum, P. C. Luck, and E. Jacobs.** 2010. Occurrence of macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae* strains in Germany. *Clin. Microbiol. Infect.* **16**:613-616.
93. **Dumke, R., P. C. Luck, C. Noppen, C. Schaefer, H. von Baum, R. Marre, and E. Jacobs.** 2006. Culture-independent molecular subtyping of *Mycoplasma pneumoniae* in clinical samples. *J. Clin. Microbiol.* **44**:2567-2570.
94. **Dumke, R., N. Schurwanz, and E. Jacobs.** 2008. Characterisation of subtype- and variant-specific antigen regions of the P1 adhesin of *Mycoplasma pneumoniae*. *Int. J. Med. Microbiol.* **298**:483-491.
95. **Dumke, R., N. Schurwanz, M. Lenz, M. Schuppler, C. Luck, and E. Jacobs.** 2007. Sensitive detection of *Mycoplasma pneumoniae* in human respiratory tract samples by optimized real-time PCR approach. *J. Clin. Microbiol.* **45**:2726-2730.
96. **Dupin, N., G. Bijaoui, M. Schwarzinger, P. Ernault, P. Gerhardt, R. Jdid, S. Hilab, C. Pantoja, M. Buffet, J. P. Escande, and J. M. Costa.** 2003. Detection and quantification of *Mycoplasma genitalium* in male patients with urethritis. *Clin. Infect. Dis.* **37**:602-605.
97. **Eaton, M. D., G. Meiklejohn, and 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.
98. **Edwards, R. K., R. J. Ferguson, L. Reyes, M. Brown, D. W. Theriaque, and P. Duff.** 2006. Assessing the relationship between preterm delivery and various microorganisms recovered from the lower genital tract. *J. Matern. Fetal Neonatal Med.* **19**:357-363.
99. **Ekiel, A. M., B. Pietrzak, P. Kaminski, H. Dolezych, J. Jozwiak, and G. Martirosian.** 2009. Prevalence of urogenital mycoplasmas and ureaplasmas in women after kidney transplantation. *Transplantation* **87**:848-851.
100. **Ellison, J. S., L. D. Olson, and M. F. Barile.** 1992. Immunity and vaccine development, p. 491-504. *In* J. Maniloff, R. N. McElhaney, L. R. Finch, and J. B. Baseman (ed.), *Mycoplasmas: molecular biology and pathogenesis*. American Society for Microbiology, Washington D.C.

101. **Ercolini, D.** 2004. PCR-DGGE fingerprinting: novel strategies for detection of microbes in food. *J. Microbiol. Methods* **56**:297-314.
102. **Esposito, S., R. Cavagna, S. Bosis, R. Droghetti, N. Faelli, and N. Principi.** 2002. Emerging role of *Mycoplasma pneumoniae* in children with acute pharyngitis. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **21**:607-610.
103. **Falk, L., H. Fredlund, and J. S. Jensen.** 2005. Signs and symptoms of urethritis and cervicitis among women with or without *Mycoplasma genitalium* or *Chlamydia trachomatis* infection. *Sex. Transm. Infect.* **81**:73-78.
104. **Falk, L., H. Fredlund, and J. S. Jensen.** 2004. Symptomatic urethritis is more prevalent in men infected with *Mycoplasma genitalium* than with *Chlamydia trachomatis*. *Sex. Transm. Infect.* **80**:289-293.
105. **Falk, L., H. Fredlund, and J. S. Jensen.** 2003. Tetracycline treatment does not eradicate *Mycoplasma genitalium*. *Sex. Transm. Infect.* **79**:318-319.
106. **Feberwee, A., J. R. Dijkstra, T. E. von Banniseht-Wysmuller, A. L. Gielkens, and J. A. Wagenaar.** 2005. Genotyping of *Mycoplasma gallisepticum* and *M. synoviae* by amplified fragment length polymorphism (AFLP) analysis and digitalized random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. *Vet. Microbiol.* **111**:125-131.
107. **Feil, E. J., B. C. Li, D. M. Aanensen, W. P. Hanage, and B. G. Spratt.** 2004. eBURST: inferring patterns of evolutionary descent among clusters of related bacterial genotypes from multilocus sequence typing data. *J. Bacteriol.* **186**:1518-1530.
108. **Feil, E. J., and B. G. Spratt.** 2001. Recombination and the population structures of bacterial pathogens. *Annu. Rev. Microbiol.* **55**:561-590.
109. **Ferguson, N. M., D. Hepp, S. Sun, N. Ikuta, S. Levisohn, S. H. Kleven, and M. Garcia.** 2005. Use of molecular diversity of *Mycoplasma gallisepticum* by gene-targeted sequencing (GTS) and random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis for epidemiological studies. *Microbiology* **151**:1883-1893.
110. **Ferwerda, A., H. A. Moll, and R. Degroot.** 2001. Respiratory tract infections by *Mycoplasma pneumoniae* in children: a review of diagnostic and therapeutic measures. *Eur. J. Pediatr.* **160**:483-491.
111. **Fields, P. I., K. Blom, H. J. Hughes, L. O. Helsel, P. Feng, and B. Swaminathan.** 1997. Molecular characterization of the gene encoding H antigen in *Escherichia coli* and development of a PCR-restriction fragment length polymorphism test for identification of *E. coli* O157:H7 and O157:NM. *J. Clin. Microbiol.* **35**:1066-1070.
112. **File, T. M., Jr., J. Segreti, L. Dunbar, R. Player, R. Kohler, R. R. Williams, C. Kojak, and A. Rubin.** 1997. A multicenter, randomized study comparing the efficacy and safety of intravenous and/or oral levofloxacin versus ceftriaxone and/or cefuroxime axetil in treatment of adults with community-acquired pneumonia. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**:1965-1972.
113. **Filliol, I., A. S. Motiwala, M. Cavatore, W. Qi, M. H. Hazbon, M. Bobadilla del Valle, J. Fyfe, L. Garcia-Garcia, N. Rastogi, C. Sola, T. Zozio, M. I. Guerrero, C. I. Leon, J. Crabtree, S. Angiuoli, K. D. Eisenach, R. Durmaz, M. L. Joloba, A. Rendon, J. Sifuentes-Osornio, A. Ponce de Leon, M. D. Cave, R. Fleischmann, T. S. Whittam, and D. Alland.** 2006. Global phylogeny of *Mycobacterium tuberculosis* based on single nucleotide polymorphism (SNP) analysis: insights into tuberculosis evolution, phylogenetic accuracy of other DNA fingerprinting systems, and recommendations for a minimal standard SNP set. *J. Bacteriol.* **188**:759-772.
114. **Finch, R., D. Schurmann, O. Collins, R. Kubin, J. McGivern, H. Bobbaers, J. L. Izquierdo, P. Nikolaides, F. Ogundare, R. Raz, P. Zuck, and G. Hoeffken.** 2002. Randomized controlled trial of sequential intravenous (i.v.) and oral moxifloxacin compared with sequential i.v. and oral co-amoxiclav with or without clarithromycin in patients with community-acquired pneumonia requiring initial parenteral treatment. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**:1746-1754.
115. **Fink, C. G., S. J. Read, and M. Sillis.** 1995. Direct sample polymerase chain reaction for the detection of *Mycoplasma pneumoniae*: a simple system for clinical application. *Br. J. Biomed. Sci.* **52**:9-13.
116. **FitzGerald, M., and C. Bedford.** 1996. National standards for the management of gonorrhoea. *Int. J. STD AIDS* **7**:298-300.
117. **Fleischmann, R. D., M. D. Adams, O. White, R. A. Clayton, E. F. Kirkness, A. R. Kerlavage, C. J. Bult, J. F. Tomb, B. A. Dougherty, J. M. Merrick, and et al.** 1995. Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science* **269**:496-512.

118. **Fournier, P. E., M. Drancourt, and D. Raoult.** 2007. Bacterial genome sequencing and its use in infectious diseases. *Lancet Infect. Dis.* **7**:711-723.
119. **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, R. D. Fritchman, J. F. Weidman, K. V. Small, M. Sandusky, J. Fuhrmann, D. Nguyen, T. R. Utterback, D. M. Saudek, C. A. Phillips, J. M. Merrick, J. F. Tomb, B. A. Dougherty, K. F. Bott, P. C. Hu, T. S. Lucier, S. N. Peterson, H. O. Smith, C. A. Hutchison, 3rd, and J. C. Venter.** 1995. The minimal gene complement of *Mycoplasma genitalium*. *Science* **270**:397-403.
120. **Frey, J.** 2002. Mycoplasmas of animals, p. 73-90. *In* S. Razin and R. Herrmann (ed.), *Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas*. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.
121. **Frey, J., A. Haldimann, and J. Nicolet.** 1992. Chromosomal heterogeneity of various *Mycoplasma hyopneumoniae* field strains. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **42**:275-280.
122. **Frothingham, R., and W. A. Meeker-O'Connell.** 1998. Genetic diversity in the *Mycobacterium tuberculosis* complex based on variable numbers of tandem DNA repeats. *Microbiology* **144 (Pt 5)**:1189-1196.
123. **Gaillat, J.** 2002. Infections respiratoires à *Mycoplasma pneumoniae* et *Chlamydia pneumoniae*, p. 21-36. *In* C. Bébéar (ed.), *Mycoplasmes et Chlamydiae*. Elsevier, Paris.
124. **Gaillat, J., A. Flahault, B. deBarbeyrac, J. Orfila, H. Portier, J. P. Ducroix, C. Bébéar, and C. Mayaud.** 2005. Community epidemiology of *Chlamydia* and *Mycoplasma pneumoniae* in LRTI in France over 29 months. *Eur. J. Epidemiol.* **20**:643-651.
125. **Gambini, D., I. Decleva, L. Lupica, M. Ghislanzoni, M. Cusini, and E. Alessi.** 2000. *Mycoplasma genitalium* in males with non-gonococcal urethritis: prevalence and clinical efficacy of eradication. *Sex. Transm. Dis.* **27**:226-229.
126. **Gaydos, C., N. E. Maldeis, A. Hardick, J. Hardick, and T. C. Quinn.** 2009. *Mycoplasma genitalium* as a contributor to the multiple etiologies of cervicitis in women attending sexually transmitted disease clinics. *Sex. Transm. Dis.* **36**:598-606.
127. **Gaydos, C., N. E. Maldeis, A. Hardick, J. Hardick, and T. C. Quinn.** 2009. *Mycoplasma genitalium* compared to chlamydia, gonorrhoea and trichomonas as an aetiological agent of urethritis in men attending STD clinics. *Sex. Transm. Infect.* **85**:438-440.
128. **Geertsens, R., F. Kaeppli, N. Sterk-Kuzmanovic, S. Andrasevic, T. Anic-Milic, and M. Dobec.** 2007. A multiplex PCR assay for the detection of respiratory bacteria in nasopharyngeal smears from children with acute respiratory disease. *Scand. J. Infect. Dis.* **39**:769-774.
129. **Gendrel, D., S. Biscardi, E. Marc, F. Moulin, J. L. Iniguez, and J. Raymond.** 2005. *Mycoplasma pneumoniae*, community-acquired pneumonia and asthma. *Arch. Pediatr.* **12 (Suppl 1)**:S7-S11.
130. **Ghorashi, S. A., A. H. Noormohammadi, and P. F. Markham.** 2009. Differentiation of *Mycoplasma gallisepticum* strains using PCR and high-resolution melting curve analysis. *Microbiology* **156**:1019-1029.
131. **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, and H. O. Smith.** 2008. Complete chemical synthesis, assembly, and cloning of a *Mycoplasma genitalium* genome. *Science* **319**:1215-1220.
132. **Gibson, D. G., J. I. Glass, C. Lartigue, V. N. Noskov, R. Y. Chuang, M. A. Algire, G. A. Benders, M. G. Montague, L. Ma, M. M. Moodie, C. Merryman, S. Vashee, R. Krishnakumar, N. Assad-Garcia, C. Andrews-Pfannkoch, E. A. Denisova, L. Young, Z. Q. Qi, T. H. Segall-Shapiro, C. H. Calvey, P. P. Parmar, C. A. Hutchison, 3rd, H. O. Smith, and J. C. Venter.** 2010. Creation of a bacterial cell controlled by a chemically synthesized genome. *Science* **329**:52-56.
133. **Ginevra, C., M. Lopez, F. Forey, M. Reyrolle, H. Meugnier, F. Vandenesch, J. Etienne, S. Jarraud, and M. Molmeret.** 2009. Evaluation of a nested-PCR-derived sequence-based typing method applied directly to respiratory samples from patients with Legionnaires' disease. *J. Clin. Microbiol.* **47**:981-987.
134. **Glaser, C. A., S. Gilliam, D. Schnurr, B. Forghani, S. Honarmand, N. Khetsuriani, M. Fischer, C. K. Cossen, and L. J. Anderson.** 2003. In search of encephalitis etiologies: diagnostic challenges in the California Encephalitis Project, 1998-2000. *Clin. Infect. Dis.* **36**:731-742.

135. **Glass, J. I., N. Assad-Garcia, N. Alperovich, S. Yooseph, M. R. Lewis, M. Maruf, C. A. Hutchison, 3rd, H. O. Smith, and J. C. Venter.** 2006. Essential genes of a minimal bacterium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**:425-430.
136. **Glass, J. I., C. A. Hutchison, 3rd, H. O. Smith, and J. C. Venter.** 2009. A systems biology tour de force for a near-minimal bacterium. *Mol. Syst. Biol.* **5**:330.
137. **Glass, J. I., E. J. Lefkowitz, J. S. Glass, C. R. Heiner, E. Y. Chen, and G. H. Cassell.** 2000. The complete sequence of the mucosal pathogen *Ureaplasma urealyticum*. *Nature* **407**:757-762.
138. **Gosney, F. L., R. D. Ayling, R. A. J. Nicholas, and L. McAuliffe.** 2010. VNTR analysis as an epidemiological tool for *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri*. Presented at the 18th Congress of the International Organization for Mycoplasmaology. Abstract 239, Chianciano, Italy, 11-16 July.
139. **Gosney, F. L., M. Kargl, J. Spergser, U. Tsedev, R. Rosengarten, R. A. J. Nicholas, and L. McAuliffe.** 2010. Molecular epidemiological analysis of *Mycoplasma agalactiae* strains from Mongolia using VNTR typing. Presented at the 18th Congress of the International Organization for Mycoplasmaology. Abstract 213, Chianciano, Italy, 11-16 July.
140. **Gouriet, F., P. Y. Levy, L. Samson, M. Drancourt, and D. Raoult.** 2008. Comparison of the new InoDiag automated fluorescence multiplexed antigen microarray to the reference technique in the serodiagnosis of atypical bacterial pneumonia. *Clin. Microbiol. Infect.* **14**:1119-1127.
141. **Grattard, F.** 2007. Electrophorèse en champ pulsé, p. 291-302. In J. Freney, F. Renaud, R. Leclercq, and P. Riegel (ed.), *Précis de bactériologie clinique*. ESKA, Paris.
142. **Grimont, F., and P. A. Grimont.** 1986. Ribosomal ribonucleic acid gene restriction patterns as potential taxonomic tools. *Ann. Inst. Pasteur Microbiol.* **137B**:165-175.
143. **Grondahl, B., W. Puppe, A. Hoppe, I. Kuhne, J. A. Weigl, and H. J. Schmitt.** 1999. Rapid identification of nine microorganisms causing acute respiratory tract infections by single-tube multiplex reverse transcription-PCR: feasibility study. *J. Clin. Microbiol.* **37**:1-7.
144. **Gruson, D., S. Pereyre, H. Renaudin, A. Charron, C. Bébéar, and C. M. Bébéar.** 2005. In vitro development of resistance to six and four fluoroquinolones in *Mycoplasma pneumoniae* and *Mycoplasma hominis*, respectively. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**:1190-1193.
145. **Grzesko, J., M. Elias, B. Maczynska, U. Kasprzykowska, M. Tlaczala, and M. Goluda.** 2009. Occurrence of *Mycoplasma genitalium* in fertile and infertile women. *Fertil. Steril.* **91**:2376-2380.
146. **Gucuyener, K., F. Simsek, O. Yilmaz, and A. Serdaroglu.** 2000. Methyl-prednisolone in neurologic complications of *Mycoplasma pneumoniae*. *Indian J. Pediatr.* **67**:467-469.
147. **Guell, M., V. van Noort, E. Yus, W. H. Chen, J. Leigh-Bell, K. Michalodimitrakis, T. Yamada, M. Arumugam, T. Doerks, S. Kuhner, M. Rode, M. Suyama, S. Schmidt, A. C. Gavin, P. Bork, and L. Serrano.** 2009. Transcriptome complexity in a genome-reduced bacterium. *Science* **326**:1268-1271.
148. **Gullsby, K., M. Storm, and K. Bondeson.** 2008. Simultaneous detection of *Chlamydia pneumoniae* and *Mycoplasma pneumoniae* by use of molecular beacons in a duplex real-time PCR. *J. Clin. Microbiol.* **46**:727-731.
149. **Gundry, C. N., J. G. Vandersteen, G. H. Reed, R. J. Pryor, J. Chen, and C. T. Wittwer.** 2003. Amplicon melting analysis with labeled primers: a closed-tube method for differentiating homozygotes and heterozygotes. *Clin. Chem.* **49**:396-406.
150. **Gutacker, M. M., J. C. Smoot, C. A. Migliaccio, S. M. Ricklefs, S. Hua, D. V. Cousins, E. A. Graviss, E. Shashkina, B. N. Kreiswirth, and J. M. Musser.** 2002. Genome-wide analysis of synonymous single nucleotide polymorphisms in *Mycobacterium tuberculosis* complex organisms: resolution of genetic relationships among closely related microbial strains. *Genetics* **162**:1533-1543.
151. **Haggerty, C. L.** 2008. Evidence for a role of *Mycoplasma genitalium* in pelvic inflammatory disease. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **21**:65-69.
152. **Haggerty, C. L., P. A. Totten, S. G. Astete, S. Lee, S. L. Hoferka, S. F. Kelsey, and R. B. Ness.** 2008. Failure of cefoxitin and doxycycline to eradicate endometrial *Mycoplasma genitalium* and the consequence for clinical cure of pelvic inflammatory disease. *Sex. Transm. Infect.* **84**:338-342.
153. **Haggerty, C. L., P. A. Totten, S. G. Astete, and R. B. Ness.** 2006. *Mycoplasma genitalium* among women with non-gonococcal, non-chlamydial pelvic inflammatory disease. *Infect. Dis. Obstet. Gynecol.* **2006**:30184.

154. **Hamasuna, R., H. Imai, H. Tsukino, J. S. Jensen, and Y. Osada.** 2008. Prevalence of *Mycoplasma genitalium* among female students in vocational schools in Japan. *Sex. Transm. Infect.* **84**:303-305.
155. **Hamasuna, R., J. S. Jensen, and Y. Osada.** 2009. Antimicrobial susceptibilities of *Mycoplasma genitalium* strains examined by broth dilution and quantitative PCR. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**:4938-4939.
156. **Hamasuna, R., Y. Osada, and J. S. Jensen.** 2005. Antibiotic susceptibility testing of *Mycoplasma genitalium* by TaqMan 5' nuclease real-time PCR. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**:4993-4998.
157. **Hamasuna, R., Y. Osada, and J. S. Jensen.** 2007. Isolation of *Mycoplasma genitalium* from first-void urine specimens by coculture with Vero cells. *J. Clin. Microbiol.* **45**:847-850.
158. **Hao, K., E. E. Schadt, and J. D. Storey.** 2008. Calibrating the performance of SNP arrays for whole-genome association studies. *PLoS Genet.* **4**:e1000109.
159. **Harada, K., M. Kijima-Tanaka, M. Uchiyama, T. Yamamoto, K. Oishi, M. Arao, and T. Takahashi.** 2009. Molecular typing of Japanese field isolates and live commercial vaccine strain of *Mycoplasma synoviae* using improved pulsed-field gel electrophoresis and *vlhA* gene sequencing. *Avian Dis.* **53**:538-543.
160. **Hardegger, D., D. Nadal, W. Bossart, M. Altwegg, and F. Dutly.** 2000. Rapid detection of *Mycoplasma pneumoniae* in clinical samples by real-time PCR. *J. Microbiol. Methods* **41**:45-51.
161. **Hardick, J., J. Giles, A. Hardick, Y. H. Hsieh, T. Quinn, and C. Gaydos.** 2006. Performance of the gen-probe transcription-mediated amplification research assay compared to that of a multitarget real-time PCR for *Mycoplasma genitalium* detection. *J. Clin. Microbiol.* **44**:1236-1240.
162. **Hardy, R. D., J. J. Coalson, J. Peters, A. Chaparro, C. Techasaensiri, A. M. Cantwell, T. R. Kannan, J. B. Baseman, and 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.
163. **Hashimoto, O., T. Yoshida, H. Ishiko, M. Ido, and T. Deguchi.** 2006. Quantitative detection and phylogeny-based identification of mycoplasmas and ureaplasmas from human immunodeficiency virus type 1-positive patients. *J. Infect. Chemother.* **12**:25-30.
164. **He, J., X. You, Y. Zeng, M. Yu, L. Zuo, and 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.
165. **Heldtander, M., H. Wesonga, G. Bolske, B. Pettersson, and K. E. Johansson.** 2001. Genetic diversity and evolution of *Mycoplasma capricolum* subsp. *capripneumoniae* strains from eastern Africa assessed by 16S rDNA sequence analysis. *Vet. Microbiol.* **78**:13-28.
166. **Henderson, I. R., P. Owen, and J. P. Nataro.** 1999. Molecular switches--the ON and OFF of bacterial phase variation. *Mol. Microbiol.* **33**:919-932.
167. **Himmelreich, R., H. Hilbert, H. Plagens, E. Pirkel, B. C. Li, and R. Herrmann.** 1996. Complete sequence analysis of the genome of the bacterium *Mycoplasma pneumoniae*. *Nucleic Acids Res.* **24**:4420-4449.
168. **Hitti, J., P. Garcia, P. Totten, K. Paul, S. Astete, and K. K. Holmes.** 2010. Correlates of cervical *Mycoplasma genitalium* and risk of preterm birth among Peruvian women. *Sex. Transm. Dis.* **37**:81-85.
169. **Hjorth, S. V., E. Bjornelius, P. Lidbrink, L. Falk, B. Dohn, L. Berthelsen, L. Ma, D. H. Martin, and J. S. Jensen.** 2006. Sequence-based typing of *Mycoplasma genitalium* reveals sexual transmission. *J. Clin. Microbiol.* **44**:2078-2083.
170. **Hoek, K. L., L. B. Duffy, G. H. Cassell, Y. Dai, and T. P. Atkinson.** 2005. A role for the *Mycoplasma pneumoniae* adhesin P1 in interleukin (IL)-4 synthesis and release from rodent mast cells. *Microb. Pathog.* **39**:149-158.
171. **Hogdahl, M., and E. Kihlstrom.** 2007. Leucocyte esterase testing of first-voided urine and urethral and cervical smears to identify *Mycoplasma genitalium*-infected men and women. *Int. J. STD AIDS* **18**:835-838.
172. **Hommais, F., S. Pereira, C. Acquaviva, P. Escobar-Paramo, and E. Denamur.** 2005. Single-nucleotide polymorphism phylotyping of *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**:4784-4792.
173. **Honda, C., T. Yano, M. Kusaba, J. Yonemitsu, H. Kitajima, M. Masuoka, K. Hamada, and K. Oizumi.** 2000. Clinical use of capillary PCR to diagnose *Mycoplasma pneumoniae*. *J. Clin. Microbiol.* **38**:1382-1384.

174. **Hooton, T. M., M. C. Roberts, P. L. Roberts, K. K. Holmes, W. E. Stamm, and G. E. Kenny.** 1988. Prevalence of *Mycoplasma genitalium* determined by DNA probe in men with urethritis. *Lancet* **1**:266-268.
175. **Horner, P., B. Thomas, C. B. Gilroy, M. Egger, and D. Taylor-Robinson.** 2001. Role of *Mycoplasma genitalium* and *Ureaplasma urealyticum* in acute and chronic non-gonococcal urethritis. *Clin. Infect. Dis.* **32**:995-1003.
176. **Horner, P. J., C. B. Gilroy, B. J. Thomas, R. O. Naidoo, and D. Taylor-Robinson.** 1993. Association of *Mycoplasma genitalium* with acute non-gonococcal urethritis. *Lancet* **342**:582-585.
177. **Horner, P. J., and D. Taylor-Robinson.** 1994. *Mycoplasma genitalium* and non-gonococcal urethritis. *Lancet* **343**:790-791.
178. **Hunter, P. R., and M. A. Gaston.** 1988. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *J. Clin. Microbiol.* **26**:2465-2466.
179. **Huppert, J. S., J. E. Mortensen, J. L. Reed, J. A. Kahn, K. D. Rich, and M. M. Hobbs.** 2008. *Mycoplasma genitalium* detected by transcription-mediated amplification is associated with *Chlamydia trachomatis* in adolescent women. *Sex. Transm. Dis.* **35**:250-254.
180. **Ieven, M.** 2007. Currently used nucleic acid amplification tests for the detection of viruses and atypicals in acute respiratory infections. *J. Clin. Virol.* **40**:259-276.
181. **Iser, P., T. H. Read, S. Tabrizi, C. Bradshaw, D. Lee, L. Horvarth, S. Garland, I. Denham, and C. K. Fairley.** 2005. Symptoms of non-gonococcal urethritis in heterosexual men: a case control study. *Sex. Transm. Infect.* **81**:163-165.
182. **Ishihara, S., M. Yasuda, S. Ito, S. Maeda, and T. Deguchi.** 2004. *Mycoplasma genitalium* urethritis in men. *Int. J. Antimicrob. Agents* **24 (Suppl 1)**:S23-S27.
183. **Iverson-Cabral, S. L., S. G. Astete, C. R. Cohen, E. P. Rocha, and 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.
184. **Iverson-Cabral, S. L., S. G. Astete, C. R. Cohen, and 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.
185. **Jang, H., H. Kim, B. Kang, C. Kim, and H. Park.** 2009. Oligonucleotide array-based detection and genotyping of mollicutes (*Acholeplasma*, *Mycoplasma*, and *Ureaplasma*). *J. Microbiol. Biotechnol.* **19**:265-270.
186. **Janier, M., F. Lassau, I. Casin, P. Grillot, C. Scieux, A. Zavaro, C. Chastang, A. Bianchi, and P. Morel.** 1995. Male urethritis with and without discharge: a clinical and microbiological study. *Sex. Transm. Dis.* **22**:244-252.
187. **Janssen, P., R. Coopman, G. Huys, J. Swings, M. Bleeker, P. Vos, M. Zabeau, and K. Kersters.** 1996. Evaluation of the DNA fingerprinting method AFLP as a new tool in bacterial taxonomy. *Microbiology* **142 (Pt 7)**:1881-1893.
188. **Jeffery, N., R. B. Gasser, P. A. Steer, and A. H. Noormohammadi.** 2007. Classification of *Mycoplasma synoviae* strains using single-strand conformation polymorphism and high-resolution melting-curve analysis of the *vlhA* gene single-copy region. *Microbiology* **153**:2679-2688.
189. **Jeffreys, A. J., V. Wilson, and S. L. Thein.** 1985. Hypervariable "minisatellite" regions in human DNA. *Nature* **314**:67-73.
190. **Jeffreys, A. J., V. Wilson, and S. L. Thein.** 1985. Individual-specific "fingerprints" of human DNA. *Nature* **316**:76-79.
191. **Jensen, J. S.** 2004. *Mycoplasma genitalium*: the aetiological agent of urethritis and other sexually transmitted diseases. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* **18**:1-11.
192. **Jensen, J. S.** 2009. Single-dose azithromycin treatment for *Mycoplasma genitalium*-positive urethritis: best but not good enough. *Clin. Infect. Dis.* **48**:1655-1656.
193. **Jensen, J. S., E. Bjornelius, B. Dohn, and P. Lidbrink.** 2004. Comparison of first void urine and urogenital swab specimens for detection of *Mycoplasma genitalium* and *Chlamydia trachomatis* by polymerase chain reaction in patients attending a sexually transmitted disease clinic. *Sex. Transm. Dis.* **31**:499-507.
194. **Jensen, J. S., E. Bjornelius, B. Dohn, and P. Lidbrink.** 2004. Use of TaqMan 5' nuclease real-time PCR for quantitative detection of *Mycoplasma genitalium* DNA in males with and without urethritis who were attendees at a sexually transmitted disease clinic. *J. Clin. Microbiol.* **42**:683-692.

195. **Jensen, J. S., M. B. Borre, and B. Dohn.** 2003. Detection of *Mycoplasma genitalium* by PCR amplification of the 16S rRNA gene. *J. Clin. Microbiol.* **41**:261-266.
196. **Jensen, J. S., C. S. Bradshaw, S. N. Tabrizi, C. K. Fairley, and R. Hamasuna.** 2008. Azithromycin treatment failure in *Mycoplasma genitalium*-positive patients with non-gonococcal urethritis is associated with induced macrolide resistance. *Clin. Infect. Dis.* **47**:1546-1553.
197. **Jensen, J. S., H. T. Hansen, and K. Lind.** 1996. Isolation of *Mycoplasma genitalium* strains from the male urethra. *J. Clin. Microbiol.* **34**:286-291.
198. **Jensen, J. S., L. Hein-Kristensen, and R. Hamasuna.** 2006. Analysis of the *Mycoplasma genitalium* *mgpB* gene of 21 isolates. Presented at the 16th Congress of the International Organization for Mycoplasmaology. Abstract 161, Cambridge, United Kingdom, 9-14 July.
199. **Jensen, J. S., R. Orsum, B. Dohn, S. Uldum, A. M. Worm, and K. Lind.** 1993. *Mycoplasma genitalium*: a cause of male urethritis? *Genitourin. Med.* **69**:265-269.
200. **Jensen, J. S., J. Sondergard-Andersen, S. A. Uldum, and K. Lind.** 1989. Detection of *Mycoplasma pneumoniae* in simulated clinical samples by polymerase chain reaction. Brief report. *Apmis* **97**:1046-1048.
201. **Jensen, J. S., S. A. Uldum, J. Sondergard-Andersen, J. Vuust, and K. Lind.** 1991. Polymerase chain reaction for detection of *Mycoplasma genitalium* in clinical samples. *J. Clin. Microbiol.* **29**:46-50.
202. **Jernberg, E., A. Moghaddam, and H. Moi.** 2008. Azithromycin and moxifloxacin for microbiological cure of *Mycoplasma genitalium* infection: an open study. *Int. J. STD AIDS* **19**:676-679.
203. **Johannisson, G., Y. Enstrom, G. B. Lowhagen, V. Nagy, K. Ryberg, S. Seeberg, and C. Welinder-Olsson.** 2000. Occurrence and treatment of *Mycoplasma genitalium* in patients visiting STD clinics in Sweden. *Int. J. STD AIDS* **11**:324-326.
204. **Johansson, K. E., M. Heldtander, and B. Pettersson.** 1998. Characterization of mycoplasmas by PCR and sequence analysis with universal 16S rDNA primers, p. 145-165. *In* R. J. Miles and R. A. J. Nicholas (ed.), *Methods in molecular biology, Mycoplasma protocols*, vol. 104. Humana press, Totowa.
205. **Johansson, K. E., and B. Pettersson.** 2002. Taxonomy of *Mollicutes*, p. 1-29. *In* S. Razin and R. Herrmann (ed.), *Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas*. Kluwer Academic/Plenum Publishers, London.
206. **Johansson, N., M. Kalin, A. Tiveljung-Lindell, C. G. Giske, and J. Hedlund.** 2010. Etiology of community-acquired pneumonia: increased microbiological yield with new diagnostic methods. *Clin. Infect. Dis.* **50**:202-209.
207. **Johnston, S. L., F. Blasi, P. N. Black, R. J. Martin, D. J. Farrell, and R. B. Nieman.** 2006. The effect of telithromycin in acute exacerbations of asthma. *N. Engl. J. Med.* **354**:1589-1600.
208. **Jordan, J. L., H. Y. Chang, M. F. Balish, L. S. Holt, S. R. Bose, B. M. Hasselbring, R. H. Waldo, 3rd, T. M. Krunkosky, and D. C. Krause.** 2007. Protein P200 is dispensable for *Mycoplasma pneumoniae* hemadsorption but not gliding motility or colonization of differentiated bronchial epithelium. *Infect. Immun.* **75**:518-522.
209. **Judlin, P.** 2009. Current concepts in managing pelvic inflammatory disease. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **23**:83-87.
210. **Jurstrand, M., J. S. Jensen, A. Magnuson, F. Kamwendo, and H. Fredlund.** 2007. A serological study of the role of *Mycoplasma genitalium* in pelvic inflammatory disease and ectopic pregnancy. *Sex. Transm. Infect.* **83**:319-323.
211. **Kai, M., S. Kamiya, H. Yabe, I. Takakura, K. Shiozawa, and A. Ozawa.** 1993. Rapid detection of *Mycoplasma pneumoniae* in clinical samples by the polymerase chain reaction. *J. Med. Microbiol.* **38**:166-170.
212. **Kannan, T. R., and J. B. Baseman.** 2006. ADP-ribosylating and vacuolating cytotoxin of *Mycoplasma pneumoniae* represents unique virulence determinant among bacterial pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**:6724-6729.
213. **Kannan, T. R., O. Musatovova, S. Balasubramanian, M. Cagle, J. L. Jordan, T. M. Krunkosky, A. Davis, R. D. Hardy, and J. B. Baseman.** 2010. *Mycoplasma pneumoniae* community acquired respiratory distress syndrome toxin expression reveals growth phase and infection-dependent regulation. *Mol. Microbiol.* **76**:1127-1141.
214. **Kannan, T. R., D. Provenzano, J. R. Wright, and J. B. Baseman.** 2005. Identification and characterization of human surfactant protein A binding protein of *Mycoplasma pneumoniae*. *Infect. Immun.* **73**:2828-2834.

215. **Kataoka, S., T. Yamada, K. Chou, R. Nishida, M. Morikawa, M. Minami, H. Yamada, N. Sakuragi, and H. Minakami.** 2006. Association between preterm birth and vaginal colonization by mycoplasmas in early pregnancy. *J. Clin. Microbiol.* **44**:51-55.
216. **Keane, F. E., B. J. Thomas, C. B. Gilroy, A. Renton, and D. Taylor-Robinson.** 2000. The association of *Chlamydia trachomatis* and *Mycoplasma genitalium* with non-gonococcal urethritis: observations on heterosexual men and their female partners. *Int. J. STD AIDS* **11**:435-439.
217. **Keane, F. E., B. J. Thomas, C. B. Gilroy, A. Renton, and D. Taylor-Robinson.** 2000. The association of *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma genitalium* with bacterial vaginosis: observations on heterosexual women and their male partners. *Int. J. STD AIDS* **11**:356-360.
218. **Keegan, B. M., N. J. Lowry, and J. Y. Yager.** 1999. *Mycoplasma pneumoniae*: a cause of coma in the absence of meningoencephalitis. *Pediatr. Neurol.* **21**:822-825.
219. **Keim, P., L. B. Price, A. M. Klevytska, K. L. Smith, J. M. Schupp, R. Okinaka, P. J. Jackson, and M. E. Hugh-Jones.** 2000. Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis reveals genetic relationships within *Bacillus anthracis*. *J. Bacteriol.* **182**:2928-2936.
220. **Keim, P., M. N. Van Ert, T. Pearson, A. J. Vogler, L. Y. Huynh, and D. M. Wagner.** 2004. Anthrax molecular epidemiology and forensics: using the appropriate marker for different evolutionary scales. *Infect. Genet. Evol.* **4**:205-213.
221. **Kenny, G. E., G. G. Kaiser, M. K. Cooney, and H. M. Foy.** 1990. Diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia: sensitivities and specificities of serology with lipid antigen and isolation of the organism on soy peptone medium for identification of infections. *J. Clin. Microbiol.* **28**:2087-2093.
222. **Kenri, T., N. Okazaki, T. Yamazaki, M. Narita, K. Izumikawa, M. Matsuoka, S. Suzuki, A. Horino, and T. Sasaki.** 2008. Genotyping analysis of *Mycoplasma pneumoniae* clinical strains in Japan between 1995 and 2005: type shift phenomenon of *M. pneumoniae* clinical strains. *J. Med. Microbiol.* **57**:469-475.
223. **Kenri, T., R. Taniguchi, Y. Sasaki, N. Okazaki, M. Narita, K. Izumikawa, M. Umetsu, and T. Sasaki.** 1999. Identification of a new variable sequence in the P1 cytoadhesin gene of *Mycoplasma pneumoniae*: evidence for the generation of antigenic variation by DNA recombination between repetitive sequences. *Infect. Immun.* **67**:4557-4562.
224. **Kessler, H. H., D. E. Dodge, K. Pierer, K. K. Young, Y. Liao, B. I. Santner, E. Eber, M. G. Roeger, D. Stuenkel, B. Sixl-Voigt, and E. Marth.** 1997. Rapid detection of *Mycoplasma pneumoniae* by an assay based on PCR and probe hybridization in a nonradioactive microwell plate format. *J. Clin. Microbiol.* **35**:1592-1594.
225. **Klement, E., D. F. Talkington, O. Wasserzug, R. Kayouf, N. Davidovitch, R. Dumke, Y. Bar-Zeev, M. Ron, J. Boxman, W. Lanier Thacker, D. Wolf, T. Lazarovich, Y. Shemer-Avni, D. Glikman, E. Jacobs, I. Grotto, C. Block, and R. Nir-Paz.** 2006. Identification of risk factors for infection in an outbreak of *Mycoplasma pneumoniae* respiratory tract disease. *Clin. Infect. Dis.* **43**:1239-1245.
226. **Kleven, S. H., R. M. Fulton, M. Garcia, V. N. Ikuta, V. A. Leiting, T. Liu, D. H. Ley, K. N. Opengart, G. N. Rowland, and E. Wallner-Pendleton.** 2004. Molecular characterization of *Mycoplasma gallisepticum* isolates from turkeys. *Avian Dis.* **48**:562-569.
227. **Koeck, J. L., B. M. Njanpop-Lafourcade, S. Cade, E. Varon, L. Sangare, S. Valjevac, G. Vergnaud, and C. Pourcel.** 2005. Evaluation and selection of tandem repeat loci for *Streptococcus pneumoniae* MLVA strain typing. *BMC Microbiol.* **5**:66.
228. **Kokotovic, B., G. Bolske, P. Ahrens, and K. Johansson.** 2000. Genomic variations of *Mycoplasma capricolum* subsp. *capripneumoniae* detected by amplified fragment length polymorphism (AFLP) analysis. *FEMS Microbiol. Lett.* **184**:63-68.
229. **Kokotovic, B., N. F. Friis, J. S. Jensen, and P. Ahrens.** 1999. Amplified-fragment length polymorphism fingerprinting of *Mycoplasma* species. *J. Clin. Microbiol.* **37**:3300-3307.
230. **Kokotovic, B., N. F. Friis, E. O. Nielsen, and P. Ahrens.** 2002. Genomic diversity among Danish field strains of *Mycoplasma hyosynoviae* assessed by amplified fragment length polymorphism analysis. *Vet. Microbiol.* **85**:221-231.
231. **Kong, F. R., S. Gordon, and G. L. Gilbert.** 2000. Rapid-cycle PCR for detection and typing of *Mycoplasma pneumoniae* in clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.* **38**:4256-4259.
232. **Kong, F. R., C. James, Z. F. Ma, S. Gordon, W. Bin, and G. L. Gilbert.** 1999. Phylogenetic analysis of *Ureaplasma urealyticum* - support for the establishment of a new species, *Ureaplasma parvum*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **49**:1879-1889.

233. **Korte, J. E., J. B. Baseman, M. P. Cagle, C. Herrera, J. M. Piper, A. E. Holden, S. T. Perdue, J. D. Champion, and R. N. Shain.** 2006. Cervicitis and genitourinary symptoms in women culture positive for *Mycoplasma genitalium*. *Am. J. Reprod. Immunol.* **55**:265-275.
234. **Kraft, M., G. H. Cassell, J. Pak, and R. J. Martin.** 2002. *Mycoplasma pneumoniae* and *Chlamydia pneumoniae* in asthma: effect of clarithromycin. *Chest* **121**:1782-1788.
235. **Krause, D. C.** 1996. *Mycoplasma pneumoniae* cytoadherence: unravelling the tie that binds. *Mol. Microbiol.* **20**:247-253.
236. **Krause, D. C., and M. F. Balish.** 2004. Cellular engineering in a minimal microbe: structure and assembly of the terminal organelle of *Mycoplasma pneumoniae*. *Mol. Microbiol.* **51**:917-924.
237. **Krause, D. C., and M. F. Balish.** 2001. Structure, function, and assembly of the terminal organelle of *Mycoplasma pneumoniae*. *FEMS Microbiol. Lett.* **198**:1-7.
238. **Kuhner, S., V. van Noort, M. J. Betts, A. Leo-Macias, C. Batisse, M. Rode, T. Yamada, T. Maier, S. Bader, P. Beltran-Alvarez, D. Castano-Diez, W. H. Chen, D. Devos, M. Guell, T. Norambuena, I. Racke, V. Rybin, A. Schmidt, E. Yus, R. Aebersold, R. Herrmann, B. Bottcher, A. S. Frangakis, R. B. Russell, L. Serrano, P. Bork, and A. C. Gavin.** 2009. Proteome organization in a genome-reduced bacterium. *Science* **326**:1235-1240.
239. **Kusiluka, L. J., B. Kokotovic, B. Ojeniyi, N. F. Friis, and P. Ahrens.** 2000. Genetic variations among *Mycoplasma bovis* strains isolated from Danish cattle. *FEMS Microbiol. Lett.* **192**:113-118.
240. **Kusiluka, L. J., B. Ojeniyi, N. F. Friis, B. Kokotovic, and P. Ahrens.** 2001. Molecular analysis of field strains of *Mycoplasma capricolum* subspecies *capripneumoniae* and *Mycoplasma mycoides* subspecies *mycoides*, small colony type isolated from goats in Tanzania. *Vet. Microbiol.* **82**:27-37.
241. **La Scola, B., G. Michel, and D. Raoult.** 1997. Use of amplification and sequencing of the 16S rRNA gene to diagnose *Mycoplasma pneumoniae* osteomyelitis in a patient with hypogammaglobulinemia. *Clin. Infect. Dis.* **24**:1161-1163.
242. **Labbe, A. C., E. Frost, S. Deslandes, A. P. Mendonca, A. C. Alves, and J. Pepin.** 2002. *Mycoplasma genitalium* is not associated with adverse outcomes of pregnancy in Guinea-Bissau. *Sex. Transm. Infect.* **78**:289-291.
243. **Ladefoged, S. A., and 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.
244. **Lam, W. Y., A. C. Yeung, J. W. Tang, M. Ip, E. W. Chan, M. Hui, and P. K. Chan.** 2007. Rapid multiplex nested PCR for detection of respiratory viruses. *J. Clin. Microbiol.* **45**:3631-3640.
245. **Lartigue, C., J. I. Glass, N. Alperovich, R. Pieper, P. P. Parmar, C. A. Hutchison, 3rd, H. O. Smith, and J. C. Venter.** 2007. Genome transplantation in bacteria: changing one species to another. *Science* **317**:632-638.
246. **Lartigue, C., S. Vashee, M. A. Algire, R. Y. Chuang, G. A. Benders, L. Ma, V. N. Noskov, E. A. Denisova, D. G. Gibson, N. Assad-Garcia, N. Alperovich, D. W. Thomas, C. Merryman, C. A. Hutchison, 3rd, H. O. Smith, J. C. Venter, and J. I. Glass.** 2009. Creating bacterial strains from genomes that have been cloned and engineered in yeast. *Science* **325**:1693-1696.
247. **Lawton, B. A., S. B. Rose, C. Bromhead, L. A. Gaitanos, E. J. MacDonald, and K. A. Lund.** 2008. High prevalence of *Mycoplasma genitalium* in women presenting for termination of pregnancy. *Contraception* **77**:294-298.
248. **Layani-Milon, M. P., I. Gras, M. Valette, J. Luciani, J. Stagnara, M. Aymard, and B. Lina.** 1999. Incidence of upper respiratory tract *Mycoplasma pneumoniae* infections among outpatients in Rhône-Alpes, France, during five successive winter periods. *J. Clin. Microbiol.* **37**:1721-1726.
249. **Leng, Z., G. E. Kenny, and M. C. Roberts.** 1994. Evaluation of the detection limits of PCR for identification of *Mycoplasma pneumoniae* in clinical samples. *Mol. Cell. Probes* **8**:125-130.
250. **Leung, A., K. Eastick, L. E. Haddon, C. K. Horn, D. Ahuja, and P. J. Horner.** 2006. *Mycoplasma genitalium* is associated with symptomatic urethritis. *Int. J. STD AIDS* **17**:285-288.

251. **Leutscher, P., J. S. Jensen, S. Hoffmann, L. Berthelsen, C. E. Ramarakoto, V. Ramaniraka, B. Randrianasolo, C. Raharisolo, B. Bottiger, D. Rousset, P. Grosjean, M. M. McGrath, N. Christensen, and R. Migliani.** 2005. Sexually transmitted infections in rural Madagascar at an early stage of the HIV epidemic: a 6-month community-based follow-up study. *Sex. Transm. Dis.* **32**:150-155.
252. **Levinson, G., and G. A. Gutman.** 1987. Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution. *Mol. Biol. Evol.* **4**:203-221.
253. **Ley, D. H., J. E. Berkhoff, and S. Levisohn.** 1997. Molecular epidemiologic investigations of *Mycoplasma gallisepticum* conjunctivitis in songbirds by random amplified polymorphic DNA analyses. *Emerg. Infect. Dis.* **3**:375-380.
254. **Li, W., D. Raoult, and P. E. Fournier.** 2009. Bacterial strain typing in the genomic era. *FEMS Microbiol. Rev.* **33**:892-916.
255. **Li, W., D. Raoult, and P. E. Fournier.** 2007. Genetic diversity of *Bartonella henselae* in human infection detected with multispacer typing. *Emerg. Infect. Dis.* **13**:1178-1183.
256. **Li, X., T. P. Atkinson, J. Hagood, C. Makris, L. B. Duffy, and K. B. Waites.** 2009. Emerging macrolide resistance in *Mycoplasma pneumoniae* in children: detection and characterization of resistant isolates. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **28**:693-696.
257. **Lieberman, D., S. Printz, M. Ben-Yaakov, Z. Lazarovich, B. Ohana, M. G. Friedman, B. Dvoskin, M. Leinonen, and I. Boldur.** 2003. Atypical pathogen infection in adults with acute exacerbation of bronchial asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **167**:406-410.
258. **Linchevski, I., E. Klement, and R. Nir-Paz.** 2009. *Mycoplasma pneumoniae* vaccine protective efficacy and adverse reactions--Systematic review and meta-analysis. *Vaccine* **27**:2437-2446.
259. **Lind, K.** 1982. Serological cross-reactions between *Mycoplasma genitalium* and *M. pneumoniae*. *Lancet* **2**:1158-1159.
260. **Lind, K., and G. B. Kristensen.** 1987. Significance of antibodies to *Mycoplasma genitalium* in salpingitis. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **6**:205-207.
261. **Lind, K., B. O. Lindhardt, H. J. Schutten, J. Blom, and C. Christiansen.** 1984. Serological cross-reactions between *Mycoplasma genitalium* and *Mycoplasma pneumoniae*. *J. Clin. Microbiol.* **20**:1036-1043.
262. **Liu, T., M. Garcia, S. Levisohn, D. Yogev, and S. H. Kleven.** 2001. Molecular variability of the adhesin-encoding gene *pvpA* among *Mycoplasma gallisepticum* strains and its application in diagnosis. *J. Clin. Microbiol.* **39**:1882-1888.
263. **Liu, Y., X. Ye, H. Zhang, X. Xu, W. Li, D. Zhu, and M. Wang.** 2009. Antimicrobial susceptibility of *Mycoplasma pneumoniae* isolates and molecular analysis of macrolide-resistant strains from Shanghai, China. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**:2160-2162.
264. **Liu, Y., X. Y. Ye, H. Zhang, X. G. Xu, W. Li, D. M. Zhu, and M. G. Wang.** 2010. Preliminary genotyping of *Mycoplasma pneumoniae* isolated from Shanghai by multiple-locus variable number tandem repeat analysis. Presented at the 18th Congress of the International Organization for Mycoplasma. Abstract 103, Chianciano, Italy, 11-16 July.
265. **Lobo, E., C. G. Poveda, A. Suarez-Perez, Y. Hernandez, A. S. Ramirez, and J. B. Poveda.** 2010. 16S rDNA PCR-denaturing gradient gel electrophoresis (DDGE) in study of Cuban isolates of *Mycoplasma hyopneumoniae*. Presented at the 18th Congress of the International Organization for Mycoplasma. Abstract 156, Chianciano, Italy, 11-16 July.
266. **Loens, K., T. Beck, D. Ursi, M. Overdijk, P. Sillekens, H. Goossens, and M. Ieven.** 2008. Development of real-time multiplex nucleic acid sequence-based amplification for detection of *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae*, and *Legionella* spp. in respiratory specimens. *J. Clin. Microbiol.* **46**:185-191.
267. **Loens, K., H. Goossens, and M. Ieven.** 2010. Acute respiratory infection due to *Mycoplasma pneumoniae*: current status of diagnostic methods. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **29**:1055-1069.
268. **Loens, K., D. Ursi, H. Goossens, and M. Ieven.** 2003. Molecular diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* respiratory tract infections. *J. Clin. Microbiol.* **41**:4915-4923.
269. **Loens, K., D. Ursi, M. Ieven, P. van Aarle, P. Sillekens, P. Oudshoorn, and H. Goossens.** 2002. Detection of *Mycoplasma pneumoniae* in spiked clinical samples by nucleic acid sequence-based amplification. *J. Clin. Microbiol.* **40**:1339-1345.
270. **Loens, K., L. Van Heirstraeten, S. Malhotra-Kumar, H. Goossens, and M. Ieven.** 2009. Optimal sampling sites and methods for detection of pathogens possibly causing community-acquired lower respiratory tract infections. *J. Clin. Microbiol.* **47**:21-31.

271. **Lorenzon, S., H. Wesonga, L. Ygesu, T. Tekleghiorgis, Y. Maikano, M. Angaya, P. Hendriks, and F. Thiaucourt.** 2002. Genetic evolution of *Mycoplasma capricolum* subsp. *capripneumoniae* strains and molecular epidemiology of contagious caprine pleuropneumonia by sequencing of locus H2. *Vet. Microbiol.* **85**:111-123.
272. **Lu, G. C., J. R. Schwebke, L. B. Duffy, G. H. Cassell, J. C. Hauth, W. W. Andrews, and R. L. Goldenberg.** 2001. Midtrimester vaginal *Mycoplasma genitalium* in women with subsequent spontaneous preterm birth. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **185**:163-165.
273. **Lucier, T. S., K. Heitzman, S. K. Liu, and P. C. Hu.** 1995. Transition mutations in the 23S rRNA of erythromycin-resistant isolates of *Mycoplasma pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**:2770-2773.
274. **Ludwig, W., O. Strunk, S. Klugbauer, N. Klugbauer, M. Weizenegger, J. Neumaier, M. Bachleitner, and K. H. Schleifer.** 1998. Bacterial phylogeny based on comparative sequence analysis. *Electrophoresis* **19**:554-568.
275. **Luki, N., P. Lebel, M. Boucher, B. Doray, J. Turgeon, and R. Brousseau.** 1998. Comparison of polymerase chain reaction assay with culture for detection of genital mycoplasmas in perinatal infections. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **17**:255-263.
276. **Luneberg, E., J. S. Jensen, and M. Frosch.** 1993. Detection of *Mycoplasma pneumoniae* by polymerase chain reaction and nonradioactive hybridization in microtiter plates. *J. Clin. Microbiol.* **31**:1088-1094.
277. **Luo, D., W. Zhu, X. Zhang, X. Chen, S. Wang, Z. Wang, G. Liang, H. Sun, and W. Xu.** 2000. Molecular epidemiologic study of *Mycoplasma genitalium* infection in high risk populations of sexually transmitted diseases in China. *Chin. Med. J.* **113**:1015-8.
278. **Lysnyansky, I., M. Garcia, and S. Levisohn.** 2005. Use of *mgc2*-polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism for rapid differentiation between field isolates and vaccine strains of *Mycoplasma gallisepticum* in Israel. *Avian Dis.* **49**:238-245.
279. **Ma, L., J. S. Jensen, L. Myers, J. Burnett, M. Welch, Q. Jia, and D. H. Martin.** 2007. *Mycoplasma genitalium*: an efficient strategy to generate genetic variation from a minimal genome. *Mol. Microbiol.* **66**:220-236.
280. **Ma, L., and D. H. Martin.** 2004. Single-nucleotide polymorphisms in the rRNA operon and variable numbers of tandem repeats in the lipoprotein gene among *Mycoplasma genitalium* strains from clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.* **42**:4876-4878.
281. **Ma, L., S. Taylor, J. S. Jensen, L. Myers, R. Lillis, and D. H. Martin.** 2008. Short tandem repeat sequences in the *Mycoplasma genitalium* genome and their use in a multilocus genotyping system. *BMC Microbiol.* **8**:130.
282. **Madsen, M. L., D. Nettleton, E. L. Thacker, R. Edwards, and F. C. Minion.** 2006. Transcriptional profiling of *Mycoplasma hyopneumoniae* during heat shock using microarrays. *Infect. Immun.* **74**:160-166.
283. **Maeda, S., M. Tamaki, M. Nakano, M. Uno, T. Deguchi, and Y. Kawada.** 1998. Detection of *Mycoplasma genitalium* in patients with urethritis. *J. Urol.* **159**:405-407.
284. **Maeda, S. I., M. Tamaki, K. Kojima, T. Yoshida, H. Ishiko, M. Yasuda, and T. Deguchi.** 2001. Association of *Mycoplasma genitalium* persistence in the urethra with recurrence of non-gonococcal urethritis. *Sex. Transm. Dis.* **28**:472-476.
285. **Maiden, M. C.** 2006. Multilocus sequence typing of bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **60**:561-588.
286. **Maiden, M. C., J. A. Bygraves, E. Feil, G. Morelli, J. E. Russell, R. Urwin, Q. Zhang, J. Zhou, K. Zurth, D. A. Caugant, I. M. Feavers, M. Achtman, and B. G. Spratt.** 1998. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**:3140-3145.
287. **Mailles, A., J. P. Stahl, and on behalf of the Steering Committee and the Investigators Group.** 2009. Infectious encephalitis in France in 2007: a national prospective study. *Clin. Infect. Dis.* **49**:1838-1847.
288. **Maltezou, H. C., B. La-Scola, H. Astra, I. Constantopoulou, V. Vlahou, D. A. Kafetzis, A. G. Constantopoulos, and D. Raoult.** 2004. *Mycoplasma pneumoniae* and *Legionella pneumophila* in community-acquired lower respiratory tract infections among hospitalized children: diagnosis by real time PCR. *Scand. J. Infect. Dis.* **36**:639-642.
289. **Manhart, L. E.** 2009. Has the time come to systematically test for *Mycoplasma genitalium*? *Sex. Transm. Dis.* **36**:607-608.
290. **Manhart, L. E., J. M. Broad, and M. R. Golden.** *Mycoplasma genitalium*: should we treat and how? *Clin. Infect. Dis.* **In press**.

291. **Manhart, L. E., C. W. Critchlow, K. K. Holmes, S. M. Dutro, D. A. Eschenbach, C. E. Stevens, and P. A. Totten.** 2003. Mucopurulent cervicitis and *Mycoplasma genitalium*. *J. Infect. Dis.* **187**:650-657.
292. **Manhart, L. E., K. K. Holmes, J. P. Hughes, L. S. Houston, and P. A. Totten.** 2007. *Mycoplasma genitalium* among young adults in the United States: an emerging sexually transmitted infection. *Am. J. Public Health* **97**:1118-1125.
293. **Manhart, L. E., S. B. Mostad, J. M. Baeten, S. G. Astete, K. Mandalia, and P. A. Totten.** 2008. High *Mycoplasma genitalium* organism burden is associated with shedding of HIV-1 DNA from the cervix. *J. Infect. Dis.* **197**:733-736.
294. **Mannering, S. A., L. McAuliffe, J. R. Lawes, K. Erles, and J. Brownlie.** 2009. Strain typing of *Mycoplasma cynos* isolates from dogs with respiratory disease. *Vet. Microbiol.* **135**:292-296.
295. **Manso-Silvan, L., V. Dupuy, I. Lysnyanski, U. Ozdemir, M. A. Turkyilmaz, A. Peyraud, and F. Thiaucourt.** 2010. Multi-locus sequence typing for phylogeny and fine typing of *Mycoplasma agalactiae* strains. Presented at the 18th Congress of the International Organization for Mycoplasmaology. Abstract 237, Chianciano, Italy, 11-16 July.
296. **Manso-Silvan, L., V. Dupuy, and F. Thiaucourt.** 2010. Multi-locus sequence analysis of *Mycoplasma capricolum* subsp. *capripneumoniae* for the molecular epidemiology of contagious caprine pleuropneumonia. Presented at the 18th Congress of the International Organization for Mycoplasmaology. Abstract 235, Chianciano, Italy, 11-16 July.
297. **Manso-Silvan, L., X. Perrier, and F. Thiaucourt.** 2007. Phylogeny of the *Mycoplasma mycoides* cluster based on analysis of five conserved protein-coding sequences and possible implications for the taxonomy of the group. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **57**:2247-2258.
298. **Mardassi, B. B., H. Ayari, A. Bejaoui-Khiari, B. Mlik, I. Moalla, and F. Amouna.** 2007. Genetic variability of the P120' surface protein gene of *Mycoplasma hominis* isolates recovered from Tunisian patients with uro-genital and infertility disorders. *BMC Infect. Dis.* **7**:142.
299. **Margulies, M., M. Egholm, W. E. Altman, S. Attiya, J. S. Bader, L. A. Bembien, J. Berka, M. S. Braverman, Y. J. Chen, Z. Chen, S. B. Dewell, L. Du, J. M. Fierro, X. V. Gomes, B. C. Godwin, W. He, S. Helgesen, C. H. Ho, G. P. Irzyk, S. C. Jando, M. L. Alenquer, T. P. Jarvie, K. B. Jirage, J. B. Kim, J. R. Knight, J. R. Lanza, J. H. Leamon, S. M. Lefkowitz, M. Lei, J. Li, K. L. Lohman, H. Lu, V. B. Makhijani, K. E. McDade, M. P. McKenna, E. W. Myers, E. Nickerson, J. R. Nobile, R. Plant, B. P. Puc, M. T. Ronan, G. T. Roth, G. J. Sarkis, J. F. Simons, J. W. Simpson, M. Srinivasan, K. R. Tartaro, A. Tomasz, K. A. Vogt, G. A. Volkmer, S. H. Wang, Y. Wang, M. P. Weiner, P. Yu, R. F. Begley, and J. M. Rothberg.** 2005. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature* **437**:376-380.
300. **Marois, C., F. Dufour-Gesbert, and I. Kempf.** 2001. Comparison of pulsed-field gel electrophoresis with random amplified polymorphic DNA for typing of *Mycoplasma synoviae*. *Vet. Microbiol.* **79**:1-9.
301. **Marois, C., F. Dufour-Gesbert, and I. Kempf.** 2001. Molecular differentiation of *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma imitans* strains by pulsed-field gel electrophoresis and random amplified polymorphic DNA. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health* **48**:695-703.
302. **Martin, R. J., M. Kraft, H. W. Chu, E. A. Berns, and G. H. Cassell.** 2001. A link between chronic asthma and chronic infection. *J. Allergy Clin. Immunol.* **107**:595-601.
303. **Martinelli, F., E. Garrafa, A. Turano, and A. Caruso.** 1999. Increased frequency of detection of *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma genitalium* in AIDS patients without urethral symptoms. *J. Clin. Microbiol.* **37**:2042-2044.
304. **Matsuoka, M., M. Narita, N. Okazaki, H. Ohya, T. Yamazaki, K. Ouchi, I. Suzuki, T. Andoh, T. Kenri, Y. Sasaki, A. Horino, M. Shintani, Y. Arakawa, and T. Sasaki.** 2004. Characterization and molecular analysis of macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae* clinical isolates obtained in Japan. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**:4624-4630.
305. **Mayor, D., J. Jores, B. M. Korczak, and P. Kuhnert.** 2008. Multilocus sequence typing (MLST) of *Mycoplasma hyopneumoniae*: a diverse pathogen with limited clonality. *Vet. Microbiol.* **127**:63-72.
306. **McAuliffe, L., R. D. Ayling, and R. A. Nicholas.** 2007. Identification and characterization of variable-number tandem-repeat markers for the molecular epidemiological analysis of *Mycoplasma mycoides* subspecies *mycoides* SC. *FEMS Microbiol. Lett.* **276**:181-188.

307. **McAuliffe, L., C. P. Churchward, J. R. Lawes, G. Loria, R. D. Ayling, and R. A. Nicholas.** 2008. VNTR analysis reveals unexpected genetic diversity within *Mycoplasma agalactiae*, the main causative agent of contagious agalactia. *BMC Microbiol.* **8**:193.
308. **McAuliffe, L., R. J. Ellis, R. Ayling, and R. A. J. Nicholas.** 2010. MLST analysis of *Mycoplasma agalactiae*. Presented at the 18th Congress of the International Organization for Mycoplasmaology. Abstract 42, Chianciano, Italy, 11-16 July.
309. **McAuliffe, L., R. J. Ellis, R. D. Ayling, and R. A. Nicholas.** 2003. Differentiation of *Mycoplasma* species by 16S ribosomal DNA PCR and denaturing gradient gel electrophoresis fingerprinting. *J. Clin. Microbiol.* **41**:4844-4847.
310. **McAuliffe, L., R. J. Ellis, J. R. Lawes, R. D. Ayling, and R. A. Nicholas.** 2005. 16S rDNA PCR and denaturing gradient gel electrophoresis; a single generic test for detecting and differentiating *Mycoplasma* species. *J. Med. Microbiol.* **54**:731-739.
311. **McAuliffe, L., B. Kokotovic, R. D. Ayling, and R. A. Nicholas.** 2004. Molecular epidemiological analysis of *Mycoplasma bovis* isolates from the United Kingdom shows two genetically distinct clusters. *J. Clin. Microbiol.* **42**:4556-4565.
312. **McAuliffe, L., J. Lawes, S. Bell, A. Barlow, R. Ayling, and R. Nicholas.** 2006. The detection of *Mycoplasma* (formerly *Eperythrozoon*) *wenyonii* by 16S rDNA PCR and denaturing gradient gel electrophoresis. *Vet. Microbiol.* **117**:292-296.
313. **McDonough, E. A., C. P. Barrozo, K. L. Russell, and D. Metzgar.** 2005. A multiplex PCR for detection of *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydophila pneumoniae*, *Legionella pneumophila*, and *Bordetella pertussis* in clinical specimens. *Mol. Cell. Probes* **19**:314-322.
314. **McGowin, C. L., L. Ma, M. Mancuso, R. Hamasuna, S. J. Jensen, and D. H. Martin.** 2010. Plasticity of the *Mycoplasma genitalium* genome: a comparative assessment of four geographically diverse strains. Presented at the 18th Congress of the International Organization for Mycoplasmaology. Abstract 66, Chianciano, Italy, 11-16 July.
315. **McGowin, C. L., V. L. Popov, and R. B. Pyles.** 2009. Intracellular *Mycoplasma genitalium* infection of human vaginal and cervical epithelial cells elicits distinct patterns of inflammatory cytokine secretion and provides a possible survival niche against macrophage-mediated killing. *BMC Microbiol.* **9**:139.
316. **McIver, C. J., N. Rismanto, C. Smith, Z. W. Naing, B. Rayner, M. J. Lusk, P. Konecny, P. A. White, and W. D. Rawlinson.** 2009. Multiplex PCR testing detection of higher-than-expected rates of cervical mycoplasma, ureaplasma, and trichomonas and viral agent infections in sexually active Australian women. *J. Clin. Microbiol.* **47**:1358-1363.
317. **McKechnie, M. L., R. Hillman, D. Couldwell, F. Kong, E. Freedman, H. Wang, and G. L. Gilbert.** 2009. Simultaneous identification of 14 genital microorganisms in urine by use of a multiplex PCR-based reverse line blot assay. *J. Clin. Microbiol.* **47**:1871-1877.
318. **Medini, D., D. Serruto, J. Parkhill, D. A. Relman, C. Donati, R. Moxon, S. Falkow, and R. Rappuoli.** 2008. Microbiology in the post-genomic era. *Nat. Rev. Microbiol.* **6**:419-430.
319. **Meens, J., V. Bolotin, R. Frank, J. Bohmer, and G. F. Gerlach.** 2009. Characterization of a highly immunogenic *Mycoplasma hyopneumoniae* lipoprotein Mhp366 identified by peptide-spot array. *Vet. Microbiol.* **142**:293-302.
320. **Mena, L., X. Wang, T. F. Mroczkowski, and D. H. Martin.** 2002. *Mycoplasma genitalium* infections in asymptomatic men and men with urethritis attending a sexually transmitted diseases clinic in New Orleans. *Clin. Infect. Dis.* **35**:1167-1173.
321. **Mena, L. A., T. F. Mroczkowski, M. Nsuami, and D. H. Martin.** 2009. A randomized comparison of azithromycin and doxycycline for the treatment of *Mycoplasma genitalium*-positive urethritis in men. *Clin. Infect. Dis.* **48**:1649-1654.
322. **Meseguer, M. A., A. Alvarez, M. T. Rejas, C. Sanchez, J. C. Perez-Diaz, and F. Baquero.** 2003. *Mycoplasma pneumoniae*: a reduced-genome intracellular bacterial pathogen. *Infect. Genet. Evol.* **3**:47-55.
323. **Meseguer, M. A., J. A. Perez-Molina, J. Fernandez-Bustamante, R. Gomez, I. Martos, and M. C. Quero.** 1996. *Mycoplasma pneumoniae* pericarditis and cardiac tamponade in a ten-year-old girl. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **15**:829-831.
324. **Mettifogo, E., M. Buzinhani, M. R. Buim, A. J. Piantino Ferreira, S. H. Kleven, and J. Timenetsky.** 2006. Molecular characterization of MG isolates using RAPD and PFGE isolated from chickens in Brazil. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health* **53**:445-450.
325. **Meunier, J. R., and P. A. Grimont.** 1993. Factors affecting reproducibility of random amplified polymorphic DNA fingerprinting. *Res. Microbiol.* **144**:373-379.

326. **Miles, K., C. P. Churchward, L. McAuliffe, R. D. Ayling, and R. A. Nicholas.** 2006. Identification and differentiation of European and African/Australian strains of *Mycoplasma mycoides* subspecies *mycoides* small-colony type using polymerase chain reaction analysis. *J. Vet. Diagn. Invest.* **18**:168-171.
327. **Miles, K., L. McAuliffe, A. Persson, R. D. Ayling, and R. A. Nicholas.** 2005. Insertion sequence profiling of UK *Mycoplasma bovis* field isolates. *Vet. Microbiol.* **107**:301-306.
328. **Minion, F. C., L. D. H. Elbourne, L. Bower, E. L. Strait, S. P. Djordjevic, and I. T. Paulson.** 2010. DNA sequence analysis of multiple field isolates of *Mycoplasma hyopneumoniae*. Presented at the 18th Congress of the International Organization for Mycoplasmaology. Abstract 35, Chianciano, Italy, 11-16 July.
329. **Miyashita, N., A. Saito, S. Kohno, K. Yamaguchi, A. Watanabe, H. Oda, Y. Kazuyama, and T. Matsushima.** 2004. Multiplex PCR for the simultaneous detection of *Chlamydia pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae* and *Legionella pneumophila* in community-acquired pneumonia. *Respir. Med.* **98**:542-550.
330. **Moi, H., N. Reinton, and A. Moghaddam.** 2009. *Mycoplasma genitalium* in women with lower genital tract inflammation. *Sex. Transm. Infect.* **85**:10-14.
331. **Moller, B. R., D. Taylor-Robinson, and P. M. Furr.** 1984. Serological evidence implicating *Mycoplasma genitalium* in pelvic inflammatory disease. *Lancet* **1**:1102-1103.
332. **Moller, B. R., D. Taylor-Robinson, P. M. Furr, B. Toft, and J. Allen.** 1985. Serological evidence that chlamydiae and mycoplasmas are involved in infertility of women. *J. Reprod. Fertil.* **73**:237-240.
333. **Monecke, S., B. Berger-Bachi, G. Coombs, A. Holmes, I. Kay, A. Kearns, H. J. Linde, F. O'Brien, P. Slickers, and R. Ehricht.** 2007. Comparative genomics and DNA array-based genotyping of pandemic *Staphylococcus aureus* strains encoding Pantone-Valentine leukocidin. *Clin. Microbiol. Infect.* **13**:236-249.
334. **Montagnier, L., and A. Blanchard.** 1993. Mycoplasmas as cofactors in infection due to the human immunodeficiency virus. *Clin. Infect. Dis.* **17 (Suppl 1)**:S309-S315.
335. **Morency, P., M. J. Dubois, G. Gresenguet, E. Frost, B. Masse, S. Deslandes, P. Somse, A. Samory, F. Mberyo-Yaah, and J. Pepin.** 2001. Aetiology of urethral discharge in Bangui, Central African Republic. *Sex. Transm. Infect.* **77**:125-129.
336. **Morozumi, M., K. Hasegawa, R. Kobayashi, N. Inoue, S. Iwata, H. Kuroki, N. Kawamura, E. Nakayama, T. Tajima, K. Shimizu, and K. Ubukata.** 2005. Emergence of macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae* with a 23S rRNA gene mutation. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**:2302-2306.
337. **Morozumi, M., S. Iwata, K. Hasegawa, N. Chiba, R. Takayanagi, K. Matsubara, E. Nakayama, K. Sunakawa, and K. Ubukata.** 2008. Increased macrolide resistance of *Mycoplasma pneumoniae* in pediatric patients with community-acquired pneumonia. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**:348-350.
338. **Morozumi, M., E. Nakayama, S. Iwata, Y. Aoki, K. Hasegawa, R. Kobayashi, N. Chiba, T. Tajima, and K. Ubukata.** 2006. Simultaneous detection of pathogens in clinical samples from patients with community-acquired pneumonia by real-time PCR with pathogen-specific molecular beacon probes. *J. Clin. Microbiol.* **44**:1440-1446.
339. **Morozumi, M., T. Takahashi, and K. Ubukata.** 2010. Macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae*: characteristics of isolates and clinical aspects of community-acquired pneumonia. *J. Infect. Chemother.* **16**:78-86.
340. **Morrison-Plummer, J., A. Lazzell, and J. B. Baseman.** 1987. Shared epitopes between *Mycoplasma pneumoniae* major adhesin protein P1 and a 140-kilodalton protein of *Mycoplasma genitalium*. *Infect. Immun.* **55**:49-56.
341. **Moser, S. A., C. A. Mayfield, L. B. Duffy, and K. B. Waites.** 2006. Genotypic characterization of *Ureaplasma* species by pulsed field gel electrophoresis. *J. Microbiol. Methods* **67**:606-610.
342. **Musatovova, O., and J. B. Baseman.** 2009. Analysis identifying common and distinct sequences among Texas clinical strains of *Mycoplasma genitalium*. *J. Clin. Microbiol.* **47**:1469-1475.
343. **Musatovova, O., S. Dhandayuthapani, and J. B. Baseman.** 2003. Transcriptional starts for cytoadherence-related operons of *Mycoplasma genitalium*. *FEMS Microbiol. Lett.* **229**:73-81.
344. **Musatovova, O., C. Herrera, and J. B. Baseman.** 2006. Proximal region of the gene encoding cytoadherence-related protein permits molecular typing of *Mycoplasma genitalium* clinical strains by PCR-restriction fragment length polymorphism. *J. Clin. Microbiol.* **44**:598-603.

345. **Muyzer, G., E. C. de Waal, and A. G. Uitterlinden.** 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**:695-700.
346. **Mygind, T., S. Birkelund, and G. Christiansen.** 2000. Characterization of the variability of a 75-kDa membrane protein in *Mycoplasma hominis*. *FEMS Microbiol. Lett.* **190**:167-176.
347. **Nagai, S., S. Kazama, and T. Yagihashi.** 1995. Ribotyping of *Mycoplasma gallisepticum* strains with a 16S ribosomal RNA gene probe. *Avian Pathol.* **24**:633-642.
348. **Namiki, K., S. Goodison, S. Porvasnik, R. W. Allan, K. A. Iczkowski, C. Urbanek, L. Reyes, N. Sakamoto, and C. J. Rosser.** 2009. Persistent exposure to *Mycoplasma* induces malignant transformation of human prostate cells. *PLoS One* **4**:e6872.
349. **Napierala Mavedzenge, S., and H. A. Weiss.** 2009. Association of *Mycoplasma genitalium* and HIV infection: a systematic review and meta-analysis. *AIDS* **23**:611-620.
350. **Narita, M.** 2010. Pathogenesis of extrapulmonary manifestations of *Mycoplasma pneumoniae* infection with special reference to pneumonia. *J. Infect. Chemother.* **16**:162-169.
351. **Narita, M.** 2009. Pathogenesis of neurologic manifestations of *Mycoplasma pneumoniae* infection. *Pediatr. Neurol.* **41**:159-166.
352. **Narita, M., H. Tanaka, T. Togashi, and S. Abe.** 2005. Cytokines involved in CNS manifestations caused by *Mycoplasma pneumoniae*. *Pediatr. Neurol.* **33**:105-109.
353. **Neau, D., H. Voinchet, B. de Barbeyrac, S. Lawson-Ayayi, M. E. Lafon, C. Bébéar, H. J. Fleury, and J. M. Ragnaud.** 2006. Screening of sexually transmitted infections among HIV-positive men who have sex with men. Presented at the 13th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, Denver, USA, 5-8 February.
354. **Neimark, H. C., and S. C. Lange.** 1990. Pulse-field electrophoresis indicates full-length mycoplasma chromosomes range widely in size. *Nucleic Acids Res.* **18**:5443-5448.
355. **Ness, R. B., D. E. Soper, R. L. Holley, J. Peipert, H. Randall, R. L. Sweet, S. J. Sondheimer, S. L. Hendrix, A. Amortegui, G. Trucco, T. Songer, J. R. Lave, S. L. Hillier, D. C. Bass, and S. F. Kelsey.** 2002. Effectiveness of inpatient and outpatient treatment strategies for women with pelvic inflammatory disease: results from the Pelvic Inflammatory Disease Evaluation and Clinical Health (PEACH) Randomized Trial. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **186**:929-937.
356. **Newcomb, D. C., and R. S. Peebles, Jr.** 2009. Bugs and asthma: a different disease? *Proc. Am. Thorac. Soc.* **6**:266-271.
357. **Newcombe, J., S. Dyer, L. Blackman, K. Cartwright, W. H. Palmer, and J. McFadden.** 1997. PCR-single-stranded confirmational polymorphism analysis for non-culture-based subtyping of meningococcal strains in clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.* **35**:1809-1812.
358. **Nilsson, A. C., P. Bjorkman, and K. Persson.** 2008. Polymerase chain reaction is superior to serology for the diagnosis of acute *Mycoplasma pneumoniae* infection and reveals a high rate of persistent infection. *BMC Microbiol.* **8**:93.
359. **Nishimura, M., T. Saida, S. Kuroki, T. Kawabata, H. Obayashi, K. Saida, and T. Uchiyama.** 1996. Post-infectious encephalitis with anti-galactocerebroside antibody subsequent to *Mycoplasma pneumoniae* infection. *J. Neurol. Sci.* **140**:91-95.
360. **Nwankpa, N. D., L. Manso-Silvan, S. Lorenzon, A. Yaya, L. H. Lombin, and F. Thiaucourt.** 2010. Variable Number Tandem Repeat (VNTR) analysis reveals genetic diversity within *Mycoplasma mycoides mycoides* Small Colony isolates from Nigeria. *Vet. Microbiol.* [Epub ahead of print].
361. **Oakeshott, P., P. Hay, D. Taylor-Robinson, S. Hay, B. Dohn, S. Kerry, and J. S. Jensen.** 2004. Prevalence of *Mycoplasma genitalium* in early pregnancy and relationship between its presence and pregnancy outcome. *BJOG* **111**:1464-1467.
362. **Okazaki, N., M. Narita, S. Yamada, K. Izumikawa, M. Umetsu, T. Kenri, Y. Sasaki, Y. Arakawa, and T. Sasaki.** 2001. Characteristics of macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae* strains isolated from patients and induced with erythromycin in vitro. *Microbiol. Immunol.* **45**:617-620.
363. **Olsen, B., P. T. Lan, C. Stalsby Lundborg, T. H. Khang, and M. Unemo.** 2009. Population-based assessment of *Mycoplasma genitalium* in Vietnam--low prevalence among married women of reproductive age in a rural area. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* **23**:533-537.
364. **Onteniente, L., S. Brisse, P. T. Tassios, and G. Vergnaud.** 2003. Evaluation of the polymorphisms associated with tandem repeats for *Pseudomonas aeruginosa* strain typing. *J. Clin. Microbiol.* **41**:4991-4997.

365. **Ovyn, C., D. van Strijp, M. Ieven, D. Ursi, B. van Gemen, and H. Goossens.** 1996. Typing of *Mycoplasma pneumoniae* by nucleic acid sequence-based amplification, NASBA. *Mol. Cell. Probes* **10**:319-324.
366. **Ozaki, T., N. Nishimura, J. Ahn, N. Watanabe, T. Muto, A. Saito, N. Koyama, K. Nakane, and K. Funahashi.** 2007. Utility of a rapid diagnosis kit for *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia in children, and the antimicrobial susceptibility of the isolates. *J. Infect. Chemother.* **13**:204-207.
367. **Pacifico, D., A. Alma, B. Bagnoli, X. Foissac, G. Pasquini, M. Tessitori, and C. Marzachi.** 2009. Characterization of Bois noir isolates by restriction fragment length polymorphism of a Stolbur-specific putative membrane protein gene. *Phytopathology* **99**:711-715.
368. **Palmer, H. M., C. B. Gilroy, E. J. Claydon, and D. Taylor-Robinson.** 1991. Detection of *Mycoplasma genitalium* in the genitourinary tract of women by the polymerase chain reaction. *Int. J. STD AIDS* **2**:261-263.
369. **Palmer, H. M., C. B. Gilroy, P. M. Furr, and D. Taylor-Robinson.** 1991. Development and evaluation of the polymerase chain reaction to detect *Mycoplasma genitalium*. *FEMS Microbiol. Lett.* **61**:199-203.
370. **Parham, K., C. P. Churchward, L. McAuliffe, R. A. Nicholas, and R. D. Ayling.** 2006. A high level of strain variation within the *Mycoplasma ovipneumoniae* population of the UK has implications for disease diagnosis and management. *Vet. Microbiol.* **118**:83-90.
371. **Patel, T., J. Pearl, J. Williams, D. Haverstock, and D. Church.** 2000. Efficacy and safety of ten day moxifloxacin 400 mg once daily in the treatment of patients with community-acquired pneumonia. Community Acquired Pneumonia Study Group. *Respir. Med.* **94**:97-105.
372. **Paz-Bailey, G., S. Morales-Miranda, J. O. Jacobson, S. K. Gupta, K. Sabin, S. Mendoza, M. Paredes, B. Alvarez, and E. Monterroso.** 2009. High rates of STD and sexual risk behaviors among Garifunas in Honduras. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* **51** (Suppl 1):S26-S34.
373. **Pearson, T., R. T. Okinaka, J. T. Foster, and P. Keim.** 2009. Phylogenetic understanding of clonal populations in an era of whole genome sequencing. *Infect. Genet. Evol.* **9**:1010-1019.
374. **Pépin, J., A. C. Labbe, N. Khonde, S. Deslandes, M. Alary, A. Dzokoto, C. Asamoah-Adu, H. Meda, and E. Frost.** 2005. *Mycoplasma genitalium*: an organism commonly associated with cervicitis among west African sex workers. *Sex. Transm. Infect.* **81**:67-72.
375. **Pépin, J., F. Sobela, S. Deslandes, M. Alary, K. Wegner, N. Khonde, F. Kintin, A. Kamuragiye, M. Sylla, P. J. Zerbo, E. Baganizi, A. Kone, F. Kane, B. Masse, P. Viens, and E. Frost.** 2001. Etiology of urethral discharge in West Africa: the role of *Mycoplasma genitalium* and *Trichomonas vaginalis*. *Bull. World Health Organ.* **79**:118-126.
376. **Pépin, J., F. Sobela, N. Khonde, T. Agyarko-Poku, S. Diakite, S. Deslandes, A. C. Labbé, M. Sylla, C. Asamoah-Adu, and E. Frost.** 2006. The syndromic management of vaginal discharge using single-dose treatments: a randomized controlled trial in West Africa. *Bull World Health Organ* **84**:729-38.
377. **Pereyre, S., A. Charron, H. Renaudin, C. Bébéar, and C. M. Bébéar.** 2007. First report of macrolide-resistant strains and description of a novel nucleotide sequence variation in the P1 adhesin gene in *Mycoplasma pneumoniae* clinical strains isolated in France over 12 years. *J. Clin. Microbiol.* **45**:3534-3539.
378. **Pereyre, S., P. Gonzalez, B. de Barbeyrac, A. Darnige, H. Renaudin, A. Charron, S. Raherison, C. Bébéar, and 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.
379. **Pereyre, S., C. Guyot, H. Renaudin, A. Charron, C. Bébéar, and C. M. Bébéar.** 2004. In vitro selection and characterization of resistance to macrolides and related antibiotics in *Mycoplasma pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**:460-465.
380. **Pereyre, S., H. Renaudin, A. Touati, A. Charron, O. Peuchant, A. B. Hassen, C. Bébéar, and C. M. Bébéar.** 2009. Detection and susceptibility testing of *Mycoplasma amphoriforme* isolates from patients with respiratory tract infections. *Clin. Microbiol. Infect.* **16**:1007-1009.
381. **Pereyre, S., P. Sirand-Pugnet, L. Beven, A. Charron, H. Renaudin, A. Barre, P. Avenaud, D. Jacob, A. Couloux, V. Barbe, A. de Daruvar, A. Blanchard, and C. Bébéar.** 2009. Life on arginine for *Mycoplasma hominis*: clues from its minimal genome and comparison with other human urogenital mycoplasmas. *PLoS Genet.* **5**:e1000677.

382. **Peterson, S. N., C. C. Bailey, J. S. Jensen, M. B. Borre, E. S. King, K. F. Bott, and C. A. Hutchison, 3rd.** 1995. Characterization of repetitive DNA in the *Mycoplasma genitalium* genome: possible role in the generation of antigenic variation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**:11829-11833.
383. **Peuchant, O., A. Menard, H. Renaudin, M. Morozumi, K. Ubukata, C. M. Bébéar, and S. Pereyre.** 2009. Increased macrolide resistance of *Mycoplasma pneumoniae* in France directly detected in clinical specimens by real-time PCR and melting curve analysis. *J. Antimicrob. Chemother.* **64**:52-58.
384. **Pfausler, B., K. Engelhardt, A. Kampfl, H. Spiss, E. Taferner, and E. Schmutzhard.** 2002. Post-infectious central and peripheral nervous system diseases complicating *Mycoplasma pneumoniae* infection. Report of three cases and review of the literature. *Eur. J. Neurol.* **9**:93-96.
385. **Pillai, S. R., H. L. Mays, Jr., D. H. Ley, P. Luttrell, V. S. Panangala, K. L. Farmer, and S. R. Roberts.** 2003. Molecular variability of house finch *Mycoplasma gallisepticum* isolates as revealed by sequencing and restriction fragment length polymorphism analysis of the *pvpA* gene. *Avian Dis.* **47**:640-648.
386. **Pilo, P., B. Fleury, M. Marenda, J. Frey, and E. M. Vilei.** 2003. Prevalence and distribution of the insertion element ISMag1 in *Mycoplasma agalactiae*. *Vet. Microbiol.* **92**:37-48.
387. **Pitcher, D., V. J. Chalker, C. Sheppard, R. C. George, and T. G. Harrison.** 2006. Real-time detection of *Mycoplasma pneumoniae* in respiratory samples with an internal processing control. *J. Med. Microbiol.* **55**:149-155.
388. **Pitcher, D., and J. Hilbocus.** 1998. Variability in the distribution and composition of insertion sequence-like elements in strains of *Mycoplasma fermentans*. *FEMS Microbiol. Lett.* **160**:101-109.
389. **Pitcher, D. G., D. Windsor, H. Windsor, J. M. Bradbury, C. Yavari, J. S. Jensen, C. Ling, and D. Webster.** 2005. *Mycoplasma amphoriforme* sp. nov., isolated from a patient with chronic bronchopneumonia. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **55**:2589-2594.
390. **Pourcel, C., F. Andre-Mazeaud, H. Neubauer, F. Ramisse, and G. Vergnaud.** 2004. Tandem repeats analysis for the high resolution phylogenetic analysis of *Yersinia pestis*. *BMC Microbiol.* **4**:22.
391. **Pourcel, C., P. Visca, B. Afshar, S. D'Arezzo, G. Vergnaud, and N. K. Fry.** 2007. Identification of variable-number tandem-repeat (VNTR) sequences in *Legionella pneumophila* and development of an optimized multiple-locus VNTR analysis typing scheme. *J. Clin. Microbiol.* **45**:1190-1199.
392. **Poveda, C., A. S. Ramirez, R. S. Rosales, A. Suarez-Perez, P. Assuncao, C. de la Fé, O. M. Vega-Orellana, L. E. Mederos, and J. B. Poveda.** 2010. Analysis of the 16S-23S rRNA intergenic spacer regions of *Mycoplasma hyopneumoniae* field strains. Presented at the 18th Congress of the International Organization for Mycoplasmaology. Abstract 72, Chianciano, Italy, 11-16 July.
393. **Principi, N., and S. Esposito.** 2001. Emerging role of *Mycoplasma pneumoniae* and *Chlamydia pneumoniae* in paediatric respiratory-tract infections. *Lancet Infect. Dis.* **1**:334-344.
394. **Pullman, J., J. Champlin, and P. S. Vrooman, Jr.** 2003. Efficacy and tolerability of once-daily oral therapy with telithromycin compared with trovafloxacin for the treatment of community-acquired pneumonia in adults. *Int. J. Clin. Pract.* **57**:377-384.
395. **Raggam, R. B., E. Leitner, J. Berg, G. Muhlbauer, E. Marth, and H. H. Kessler.** 2005. Single-run, parallel detection of DNA from three pneumonia-producing bacteria by real-time polymerase chain reaction. *J. Mol. Diagn.* **7**:133-138.
396. **Ramirez, J. A., S. Ahkee, A. Tolentino, R. D. Miller, and J. T. Summersgill.** 1996. Diagnosis of *Legionella pneumophila*, *Mycoplasma pneumoniae*, or *Chlamydia pneumoniae* lower respiratory infection using the polymerase chain reaction on a single throat swab specimen. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **24**:7-14.
397. **Razin, S.** 1985. Molecular biology and genetics of mycoplasmas (*Mollicutes*). *Microbiol. Rev.* **49**:419-455.
398. **Razin, S., D. Yogev, and Y. Naot.** 1998. Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**:1094-1156.
399. **Read, T. D., S. L. Salzberg, M. Pop, M. Shumway, L. Umayam, L. Jiang, E. Holtzapple, J. D. Busch, K. L. Smith, J. M. Schupp, D. Solomon, P. Keim, and C. M. Fraser.** 2002. Comparative genome sequencing for discovery of novel polymorphisms in *Bacillus anthracis*. *Science* **296**:2028-2033.

400. **Régli, A.** 2007. Amplification génique appliquée au marquage épidémiologique, p. 303-313. In J. Freney, F. Renaud, R. Leclercq, and P. Riegel (ed.), *Précis de bactériologie clinique*. ESKA, Paris.
401. **Robertson, G. A., V. Thiruvengadaswamy, H. Shilling, E. P. Price, F. Huygens, F. A. Henskens, and P. M. Giffard.** 2004. Identification and interrogation of highly informative single nucleotide polymorphism sets defined by bacterial multilocus sequence typing databases. *J. Med. Microbiol.* **53**:35-45.
402. **Robertson, J. A., L. E. Pyle, G. W. Stemke, and L. R. Finch.** 1990. Human ureaplasmas show diverse genome sizes by pulsed-field electrophoresis. *Nucleic Acids Res.* **18**:1451-1455.
403. **Robertson, J. A., and G. W. Stemke.** 1982. Expanded serotyping scheme for *Ureaplasma urealyticum* strains isolated from humans. *J. Clin. Microbiol.* **15**:873-878.
404. **Robertson, J. A., G. W. Stemke, J. W. Davis, Jr., R. Harasawa, D. Thirkell, F. Kong, M. C. Shepard, and D. K. Ford.** 2002. Proposal of *Ureaplasma parvum* sp. nov. and emended description of *Ureaplasma urealyticum*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **52**:587-597.
405. **Robertson, J. A., A. Vekris, C. Bébéar, and G. W. Stemke.** 1993. Polymerase chain reaction using 16S rRNA gene sequences distinguishes the two biovars of *Ureaplasma urealyticum*. *J. Clin. Microbiol.* **31**:824-830.
406. **Rocha, E. P., A. Danchin, and A. Viari.** 1999. Functional and evolutionary roles of long repeats in prokaryotes. *Res. Microbiol.* **150**:725-733.
407. **Rocha, E. P. C., and A. Blanchard.** 2002. Genomic repeats, genome plasticity and the dynamics of *Mycoplasma* evolution. *Nucleic Acids Res.* **30**:2031-2042.
408. **Rosales, R. S., C. P. Churchward, R. D. Ayling, A. Suarez-Perez, A. S. Ramirez, C. Poveda, J. B. Poveda, and R. A. J. Nicholas.** 2010. Molecular epidemiology analysis of *Mycoplasma hyorhinae* field strains using a Southern blotting approach. Presented at the 18th Congress of the International Organization for Mycoplasmaology. Abstract 217 Chianciano, Italy, 11-16 July.
409. **Rosenberg, S. M., S. Longerich, P. Gee, and R. S. Harris.** 1994. Adaptive mutation by deletions in small mononucleotide repeats. *Science* **265**:405-407.
410. **Ross, J. D., L. Brown, P. Saunders, and S. Alexander.** 2009. *Mycoplasma genitalium* in asymptomatic patients: implications for screening. *Sex. Transm. Infect.* **85**:436-437.
411. **Ross, J. D., H. S. Cronje, T. Paszkowski, I. Rakoczi, D. Vildaite, A. Kureishi, M. Alefelder, P. Arvis, and P. Reimnitz.** 2006. Moxifloxacin versus ofloxacin plus metronidazole in uncomplicated pelvic inflammatory disease: results of a multicentre, double blind, randomised trial. *Sex. Transm. Infect.* **82**:446-451.
412. **Ross, J. D., and J. S. Jensen.** 2006. *Mycoplasma genitalium* as a sexually transmitted infection: implications for screening, testing, and treatment. *Sex. Transm. Infect.* **82**:269-271.
413. **Rottem, S.** 2003. Interaction of mycoplasmas with host cells. *Physiol. Rev.* **83**:417-432.
414. **Sabat, A., J. Krzyszton-Russjan, W. Strzalka, R. Filipek, K. Kosowska, W. Hryniewicz, J. Travis, and J. Potempa.** 2003. New method for typing *Staphylococcus aureus* strains: multiple-locus variable-number tandem repeat analysis of polymorphism and genetic relationships of clinical isolates. *J. Clin. Microbiol.* **41**:1801-1804.
415. **Sakoulas, G.** 2001. Brainstem and striatal encephalitis complicating *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia: possible benefit of intravenous immunoglobulin. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **20**:543-545.
416. **Sasaki, T., T. Kenri, N. Okazaki, M. Iseki, R. Yamashita, M. Shintani, Y. Sasaki, and M. Yayoshi.** 1996. Epidemiological study of *Mycoplasma pneumoniae* infections in Japan based on PCR-restriction fragment length polymorphism of the P1 cytoadhesin gene. *J. Clin. Microbiol.* **34**:447-449.
417. **Sasaki, Y., J. Ishikawa, A. Yamashita, K. Oshima, T. Kenri, K. Furuya, C. Yoshino, A. Horino, T. Shiba, T. Sasaki, and M. Hattori.** 2002. The complete genomic sequence of *Mycoplasma penetrans*, an intracellular bacterial pathogen in humans. *Nucleic Acids Res.* **30**:5293-5300.
418. **Sasaki, Y., M. Shintani, T. Shimada, H. Watanabe, and T. Sasaki.** 1992. Detection and discrimination of *Mycoplasma pneumoniae* and *Mycoplasma genitalium* by the in vitro DNA amplification. *Microbiol. Immunol.* **36**:21-27.
419. **Schaefferbeke, T., M. Clerc, L. Lequen, A. Charron, C. Bébéar, B. de Barbeyrac, B. Bannwarth, and J. Dehais.** 1998. Genotypic characterization of seven strains of *Mycoplasma fermentans* isolated from synovial fluids of patients with arthritis. *J. Clin. Microbiol.* **36**:1226-1231.

420. **Schalock, P. C., and J. G. Dinulos.** 2009. *Mycoplasma pneumoniae*-induced cutaneous disease. *Int. J. Dermatol.* **48**:673-80.
421. **Schonwald, S., V. Skerk, I. Petricevic, V. Car, L. Majerus-Misic, and M. Gunjaca.** 1991. Comparison of three-day and five-day courses of azithromycin in the treatment of atypical pneumonia. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **10**:877-880.
422. **Schouls, L. M., A. van der Ende, M. Damen, and I. van de Pol.** 2006. Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis of *Neisseria meningitidis* yields groupings similar to those obtained by multilocus sequence typing. *J. Clin. Microbiol.* **44**:1509-1518.
423. **Schwartz, S. B., S. L. Mitchell, K. A. Thurman, B. J. Wolff, and J. M. Winchell.** 2009. Identification of P1 variants of *Mycoplasma pneumoniae* by use of high-resolution melt analysis. *J. Clin. Microbiol.* **47**:4117-4120.
424. **Schwartz, S. B., K. A. Thurman, S. L. Mitchell, B. J. Wolff, and J. M. Winchell.** 2009. Genotyping of *Mycoplasma pneumoniae* isolates using real-time PCR and high-resolution melt analysis. *Clin. Microbiol. Infect.* **15**:756-762.
425. **Seruga Music, M., M. Krajacic, and D. Skoric.** 2008. The use of SSCP analysis in the assessment of phytoplasma gene variability. *J. Microbiol. Methods* **73**:69-72.
426. **SFM.** 2007. Mycoplasmes, p. 159-162. *In* SFM (Société Française de Microbiologie) (ed.), Remic. Vivactis Plus, Paris.
427. **Shahmanesh, M., H. Moi, F. Lassau, and M. Janier.** 2009. 2009 European guideline on the management of male non-gonococcal urethritis. *Int. J. STD AIDS* **20**:458-464.
428. **Shimada, Y., T. Deguchi, K. Nakane, T. Masue, M. Yasuda, S. Yokoi, S. I. Ito, M. Nakano, S. Ito, and H. Ishiko.** 2010. Emergence of clinical strains of *Mycoplasma genitalium* harbouring alterations in ParC associated with fluoroquinolone resistance. *Int. J. Antimicrob. Agents* **36**:255-258.
429. **Shipitsyna, E., E. Zolotoverkhaya, B. Dohn, A. Benkovich, A. Savicheva, E. Sokolovsky, J. S. Jensen, M. Domeika, and M. Unemo.** 2009. First evaluation of polymerase chain reaction assays used for diagnosis of *Mycoplasma genitalium* in Russia. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* **23**:1164-1172.
430. **Shopsin, B., M. Gomez, M. Waddington, M. Riehman, and B. N. Kreiswirth.** 2000. Use of coagulase gene (coa) repeat region nucleotide sequences for typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *J. Clin. Microbiol.* **38**:3453-3456.
431. **Short, V. L., J. S. Jensen, D. B. Nelson, P. J. Murray, R. B. Ness, and C. L. Haggerty.** 2010. *Mycoplasma genitalium* among young, urban pregnant women. *Infect. Dis. Obstet. Gynecol.* **2010**:984760.
432. **Short, V. L., P. A. Totten, R. B. Ness, S. G. Astete, S. F. Kelsey, and C. L. Haggerty.** 2009. Clinical presentation of *Mycoplasma genitalium* infection versus *Neisseria gonorrhoeae* infection among women with pelvic inflammatory disease. *Clin. Infect. Dis.* **48**:41-47.
433. **Short, V. L., P. A. Totten, R. B. Ness, S. G. Astete, S. F. Kelsey, P. Murray, and C. L. Haggerty.** 2009. The demographic, sexual health and behavioural correlates of *Mycoplasma genitalium* infection among women with clinically suspected pelvic inflammatory disease. *Sex. Transm. Infect.* **86**:29-31.
434. **Simms, I., K. Eastick, H. Mallinson, K. Thomas, R. Gokhale, P. Hay, A. Herring, and P. A. Rogers.** 2003. Associations between *Mycoplasma genitalium*, *Chlamydia trachomatis*, and pelvic inflammatory disease. *Sex. Transm. Infect.* **79**:154-156.
435. **Simonian, N., and D. Janner.** 1998. Pleural effusion, hepatitis and hemolytic anemia in a twelve-year-old male child. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **17**:173-174, 176-177.
436. **Sirand-Pugnet, P., C. Citti, A. Barré, and A. Blanchard.** 2007. Evolution of mollicutes: down a bumpy road with twists and turns. *Res. Microbiol.* **158**:754-766.
437. **Sirand-Pugnet, P., C. Lartigue, M. Marenda, D. Jacob, A. Barré, V. Barbe, C. Schenowitz, S. Mangenot, A. Couloux, B. Segurens, A. de Daruvar, A. Blanchard, and C. Citti.** 2007. Being pathogenic, plastic, and sexual while living with a nearly minimal bacterial genome. *PLoS Genet.* **3**:e75.
438. **Skakni, L., A. Sardet, J. Just, J. Landman-Parker, J. Costil, N. Moniot-Ville, F. Bricout, and A. Garbarg-Chenon.** 1992. Detection of *Mycoplasma pneumoniae* in clinical samples from pediatric patients by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* **30**:2638-2643.
439. **Sliman, J. A., D. Metzgar, D. C. Asseff, R. G. Coon, D. J. Faix, and S. Lizewski.** 2009. Outbreak of acute respiratory disease caused by *Mycoplasma pneumoniae* on board a deployed U.S. navy ship. *J. Clin. Microbiol.* **47**:4121-4123.

440. **Sluijter, M., E. B. Spuesens, N. G. Hartwig, A. M. van Rossum, and C. Vink.** 2009. The *Mycoplasma pneumoniae* MPN490 and *Mycoplasma genitalium* MG339 genes encode reca homologs that promote homologous DNA strand exchange. *Infect. Immun.* **77**:4905-4911.
441. **Smith, J. M., N. H. Smith, M. O'Rourke, and B. G. Spratt.** 1993. How clonal are bacteria? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**:4384-4388.
442. **Smith, R., and L. Eviatar.** 2000. Neurologic manifestations of *Mycoplasma pneumoniae* infections: diverse spectrum of diseases. A report of six cases and review of the literature. *Clin. Pediatr. (Phila)* **39**:195-201.
443. **Soehnen, M. K., S. Kariyawasam, D. R. Wolfgang, and B. M. Jayarao.** 2010. Genetic and phenotypic characterization of *Mycoplasma bovis* strain isolates submitted to the Pennsylvania Animal Diagnostics Laboratory. Presented at the 18th Congress of the International Organization for Mycoplasmaology. Abstract 126, Chianciano, Italy, 11-16 July.
444. **Soni, S., S. Alexander, N. Verlander, P. Saunders, D. Richardson, M. Fisher, and C. Ison.** 2010. The prevalence of urethral and rectal *Mycoplasma genitalium* and its associations in men who have sex with men attending a genitourinary medicine clinic. *Sex. Transm. Infect.* **86**:21-24.
445. **Spergser, J., and R. Rosengarten.** 2007. Identification and differentiation of canine *Mycoplasma* isolates by 16S-23S rDNA PCR-RFLP. *Vet. Microbiol.* **125**:170-174.
446. **Spuesens, E. B., T. Hoogenboezem, M. Sluijter, N. G. Hartwig, A. M. van Rossum, and C. Vink.** 2010. Macrolide resistance determination and molecular typing of *Mycoplasma pneumoniae* by pyrosequencing. *J. Microbiol. Methods* **82**:214-222.
447. **Stakenborg, T., J. Vicca, P. Butaye, D. Maes, J. Peeters, A. de Kruif, and F. Haesebrouck.** 2005. The diversity of *Mycoplasma hyopneumoniae* within and between herds using pulsed-field gel electrophoresis. *Vet. Microbiol.* **109**:29-36.
448. **Stakenborg, T., J. Vicca, D. Maes, J. Peeters, A. de Kruif, F. Haesebrouck, and P. Butaye.** 2006. Comparison of molecular techniques for the typing of *Mycoplasma hyopneumoniae* isolates. *J. Microbiol. Methods* **66**:263-275.
449. **Stamm, W. E., B. E. Batteiger, W. M. McCormack, P. A. Totten, A. Sternlicht, and N. M. Kivel.** 2007. A randomized, double-blind study comparing single-dose rifalazil with single-dose azithromycin for the empirical treatment of non-gonococcal urethritis in men. *Sex. Transm. Dis.* **34**:545-552.
450. **Stellrecht, K. A., A. M. Woron, N. G. Mishrik, and R. A. Venezia.** 2004. Comparison of multiplex PCR assay with culture for detection of genital mycoplasmas. *J. Clin. Microbiol.* **42**:1528-1533.
451. **Stocki, T., and V. Chalker.** 2010. Prevalence of *Mycoplasma pneumoniae* CARDS toxin in isolates and clinical samples in England. Presented at the 18th Congress of the International Organization for Mycoplasmaology. Abstract 95, Chianciano, Italy, 11-16 July.
452. **Stormer, M., T. Vollmer, B. Henrich, K. Kleesiek, and J. Dreier.** 2009. Broad-range real-time PCR assay for the rapid identification of cell-line contaminants and clinically important mollicute species. *Int. J. Med. Microbiol.* **299**:291-300.
453. **Stralin, K., A. Backman, H. Holmberg, H. Fredlund, and P. Olcen.** 2005. Design of a multiplex PCR for *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Mycoplasma pneumoniae* and *Chlamydia pneumoniae* to be used on sputum samples. *Apmis* **113**:99-111.
454. **Struelens, M. J.** 1996. Consensus guidelines for appropriate use and evaluation of microbial epidemiologic typing systems. *Clin. Microbiol. Infect.* **2**:2-11.
455. **Sturm, P. D., P. Moodley, N. Khan, S. Ebrahim, K. Govender, C. Connolly, and A. W. Sturm.** 2004. Aetiology of male urethritis in patients recruited from a population with a high HIV prevalence. *Int. J. Antimicrob. Agents* **24** (Suppl 1):S8-S14.
456. **Stutman, H. R.** 1987. Stevens-Johnson syndrome and *Mycoplasma pneumoniae*: evidence for cutaneous infection. *J. Pediatr.* **111**:845-847.
457. **Sutherland, E. R., J. M. Brandorff, and R. J. Martin.** 2004. Atypical bacterial pneumonia and asthma risk. *J. Asthma* **41**:863-868.
458. **Suthers, P. F., M. S. Dasika, V. S. Kumar, G. Denisov, J. I. Glass, and C. D. Maranas.** 2009. A genome-scale metabolic reconstruction of *Mycoplasma genitalium*, iPS189. *PLoS Comput. Biol.* **5**:e1000285.
459. **Suzuki, S., T. Yamazaki, M. Narita, N. Okazaki, I. Suzuki, T. Andoh, M. Matsuoka, T. Kenri, Y. Arakawa, and T. Sasaki.** 2006. Clinical evaluation of macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**:709-712.

460. **Svenstrup, H. F., C. Carder, S. Morris-Jones, M. Kidd, and J. Stephenson.** 2010. Prevalence of *Mycoplasma genitalium* in young sexually active women of the National Chlamydia Screening Programme. Presented at the 18th Congress of the International Organization for Mycoplasmaology. Abstract 17, Chianciano, Italy, 11-16 July.
461. **Svenstrup, H. F., J. Fedder, S. E. Kristoffersen, B. Trolle, S. Birkelund, and G. Christiansen.** 2008. *Mycoplasma genitalium*, *Chlamydia trachomatis*, and tubal factor infertility--a prospective study. *Fertil. Steril.* **90**:513-520.
462. **Svenstrup, H. F., J. S. Jensen, E. Bjornelius, P. Lidbrink, S. Birkelund, and G. Christiansen.** 2005. Development of a quantitative real-time PCR assay for detection of *Mycoplasma genitalium*. *J. Clin. Microbiol.* **43**:3121-3128.
463. **Takahashi, S., M. Matsukawa, Y. Kurimura, K. Takeyama, Y. Kunishima, A. Iwasawa, M. Koroku, H. Tanda, N. Suzuki, Y. Takagi, T. Hirose, M. Nishimura, and T. Tsukamoto.** 2008. Clinical efficacy of azithromycin for male non-gonococcal urethritis. *J. Infect. Chemother.* **14**:409-412.
464. **Takahashi, S., K. Takeyama, S. Miyamoto, K. Ichihara, T. Maeda, Y. Kunishima, M. Matsukawa, and T. Tsukamoto.** 2006. Detection of *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum*, and *Ureaplasma parvum* DNAs in urine from asymptomatic healthy young Japanese men. *J. Infect. Chemother.* **12**:269-271.
465. **Talkington, D. F., S. Shott, M. T. Fallon, S. B. Schwartz, and W. L. Thacker.** 2004. Analysis of eight commercial enzyme immunoassay tests for detection of antibodies to *Mycoplasma pneumoniae* in human serum. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **11**:862-867.
466. **Tardy, F., P. Gaurivaud, A. Tricot, L. Maigre, and F. Poumarat.** 2009. Epidemiological surveillance of mycoplasmas belonging to the "*Mycoplasma mycoides*" cluster: is DGGE fingerprinting of 16S rRNA genes suitable? *Lett. Appl. Microbiol.* **48**:210-217.
467. **Tardy, F., P. Mercier, M. Solsona, E. Saras, and F. Poumarat.** 2007. *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* biotype large colony isolates from healthy and diseased goats: prevalence and typing. *Vet. Microbiol.* **121**:268-277.
468. **Taylor-Robinson, D.** 2008. Non-gonococcal urethritis and antibiotic-resistant *Mycoplasma genitalium* infection. *Clin. Infect. Dis.* **47**:1554-1555.
469. **Taylor-Robinson, D., C. B. Gilroy, and P. E. Hay.** 1993. Occurrence of *Mycoplasma genitalium* in different populations and its clinical significance. *Clin. Infect. Dis.* **17** (Suppl 1):S66-S68.
470. **Taylor-Robinson, D., C. B. Gilroy, S. Horowitz, and J. Horowitz.** 1994. *Mycoplasma genitalium* in the joints of two patients with arthritis. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **13**:1066-1069.
471. **Taylor-Robinson, D., C. B. Gilroy, B. J. Thomas, and P. E. Hay.** 2004. *Mycoplasma genitalium* in chronic non-gonococcal urethritis. *Int. J. STD AIDS* **15**:21-25.
472. **Taylor-Robinson, D., J. S. Jensen, G. Fehler, F. Radebe, and R. C. Ballard.** 2002. Observations on the microbiology of urethritis in black South African men. *Int. J. STD AIDS* **13**:323-325.
473. **Templeton, K. E., S. A. Scheltinga, A. W. Graffelman, J. M. Van Schie, J. W. Crielaard, P. Sillekens, P. J. Van Den Broek, H. Goossens, M. F. Beersma, and E. C. Claas.** 2003. Comparison and evaluation of real-time PCR, real-time nucleic acid sequence-based amplification, conventional PCR, and serology for diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae*. *J. Clin. Microbiol.* **41**:4366-4371.
474. **Tenover, F. C., R. D. Arbeit, and R. V. Goering.** 1997. How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: a review for healthcare epidemiologists. Molecular Typing Working Group of the Society for Healthcare Epidemiology of America. *Infect. Control. Hosp. Epidemiol.* **18**:426-439.
475. **Tenover, F. C., R. D. Arbeit, R. V. Goering, P. A. Mickelsen, B. E. Murray, D. H. Persing, and B. Swaminathan.** 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J. Clin. Microbiol.* **33**:2233-2239.

476. Tettelin, H., V. Massignani, M. J. Cieslewicz, C. Donati, D. Medini, N. L. Ward, S. V. Angiuoli, J. Crabtree, A. L. Jones, A. S. Durkin, R. T. Deboy, T. M. Davidsen, M. Mora, M. Scarselli, I. Margarit y Ros, J. D. Peterson, C. R. Hauser, J. P. Sundaram, W. C. Nelson, R. Madupu, L. M. Brinkac, R. J. Dodson, M. J. Rosovitz, S. A. Sullivan, S. C. Daugherty, D. H. Haft, J. Selengut, M. L. Gwinn, L. Zhou, N. Zafar, H. Khouri, D. Radune, G. Dimitrov, K. Watkins, K. J. O'Connor, S. Smith, T. R. Utterback, O. White, C. E. Rubens, G. Grandi, L. C. Madoff, D. L. Kasper, J. L. Telford, M. R. Wessels, R. Rappuoli, and C. M. Fraser. 2005. Genome analysis of multiple pathogenic isolates of *Streptococcus agalactiae*: implications for the microbial "pan-genome". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**:13950-13955.
477. Thiaucourt, F., S. Lorenzon, A. David, J. J. Tulasne, and J. Domenech. 1998. Vaccination against contagious bovine pleuropneumonia and the use of molecular tools in epidemiology. *Ann. N Y Acad. Sci.* **849**:146-151.
478. Thiaucourt, F., and F. Roger. 2005. Biodiversity of mycoplasmas and molecular epidemiology, p. 415-437. *In* A. Blanchard and G. F. Browning (ed.), *Mycoplasmas: pathogenesis, molecular biology, and emerging strategies for control*. Horizon Bioscience, Wymondham.
479. Thurman, A. R., O. Musatovova, S. Perdue, R. N. Shain, J. G. Baseman, and J. B. Baseman. 2010. *Mycoplasma genitalium* symptoms, concordance and treatment in high-risk sexual dyads. *Int. J. STD AIDS* **21**:177-183.
480. Thurman, K. A., N. D. Walter, S. B. Schwartz, S. L. Mitchell, M. T. Dillon, A. L. Baughman, M. Deutscher, J. P. Fulton, J. E. Tongren, L. A. Hicks, and J. M. Winchell. 2009. Comparison of laboratory diagnostic procedures for detection of *Mycoplasma pneumoniae* in community outbreaks. *Clin. Infect. Dis.* **48**:1244-1249.
481. Tibayrenc, M. 1998. Genetic epidemiology of parasitic protozoa and other infectious agents: the need for an integrated approach. *Int. J. Parasitol.* **28**:85-104.
482. Tjhie, J. H., F. J. van Kuppeveld, R. Roosendaal, W. J. Melchers, R. Gordijn, D. M. MacLaren, J. M. Walboomers, C. J. Meijer, and A. J. van den Brule. 1994. Direct PCR enables detection of *Mycoplasma pneumoniae* in patients with respiratory tract infections. *J. Clin. Microbiol.* **32**:11-16.
483. Tola, S., G. Idini, D. Manunta, I. Casciano, A. M. Rocchigiani, A. Angioi, and G. Leori. 1996. Comparison of *Mycoplasma agalactiae* isolates by pulsed field gel electrophoresis, SDS-PAGE and immunoblotting. *FEMS Microbiol. Lett.* **143**:259-265.
484. Tong, C. Y., C. Donnelly, G. Harvey, and M. Sillis. 1999. Multiplex polymerase chain reaction for the simultaneous detection of *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae*, and *Chlamydia psittaci* in respiratory samples. *J. Clin. Pathol.* **52**:257-263.
485. Tosh, A. K., B. Van Der Pol, J. D. Fortenberry, J. A. Williams, B. P. Katz, B. E. Batteiger, and D. P. Orr. 2007. *Mycoplasma genitalium* among adolescent women and their partners. *J. Adolesc. Health* **40**:412-417.
486. Totten, P. A., M. A. Schwartz, K. E. Sjostrom, G. E. Kenny, H. H. Handsfield, J. B. Weiss, and W. L. Whittington. 2001. Association of *Mycoplasma genitalium* with non-gonococcal urethritis in heterosexual men. *J. Infect. Dis.* **183**:269-276.
487. Touati, A., A. Benard, A. B. Hassen, C. M. Bébéar, and S. Pereyre. 2009. Evaluation of five commercial real-time PCR assays for detection of *Mycoplasma pneumoniae* in respiratory tract specimens. *J Clin Microbiol* **47**:2269-2271.
488. Tully, J. G., D. L. Rose, J. B. Baseman, S. F. Dallo, A. L. Lazzell, and C. P. Davis. 1995. *Mycoplasma pneumoniae* and *Mycoplasma genitalium* mixture in synovial fluid isolate. *J. Clin. Microbiol.* **33**:1851-1855.
489. Tully, J. G., D. Taylor-Robinson, R. M. Cole, and D. L. Rose. 1981. A newly discovered mycoplasma in the human urogenital tract. *Lancet* **1**:1288-1291.
490. Tully, J. G., D. Taylor-Robinson, D. L. Rose, P. M. Furr, C. E. Graham, and M. F. Barile. 1986. Urogenital challenge of primate species with *Mycoplasma genitalium* and characteristics of infection induced in chimpanzees. *J. Infect. Dis.* **153**:1046-1054.
491. Tully, J. G., D. Taylor Robinson, D. L. Rose, R. M. Cole, and J. M. Bov  . 1983. *Mycoplasma genitalium*, a new species from the human urogenital tract. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **33**:387-396.
492. Tuuminen, T., S. Varjo, H. Ingman, T. Weber, J. Oksi, and M. Viljanen. 2000. Prevalence of *Chlamydia pneumoniae* and *Mycoplasma pneumoniae* immunoglobulin G and A antibodies in a healthy Finnish population as analyzed by quantitative enzyme immunoassays. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **7**:734-738.

- Unno, M., T. Deguchi, H. Komeda, M. Hayasaki, M. Iida, M. Nagatani, and Y. Kawada. 1997. *Mycoplasma genitalium* in the cervixes of Japanese women. Sex. Transm. Dis. **24**:284-286.
- Ursi, D., M. Ieven, G. T. Noordhoek, M. Ritzler, H. Zandleven, and M. Altwegg. 2003. An interlaboratory comparison for the detection of *Mycoplasma pneumoniae* in respiratory samples by the polymerase chain reaction. J. Microbiol. Methods **53**:289-294.
- Ursi, D., M. Ieven, H. van Bever, W. Quint, H. G. Niesters, and H. Goossens. 1994. Typing of *Mycoplasma pneumoniae* by PCR-mediated DNA fingerprinting. J. Clin. Microbiol. **32**:2873-2875.
- Ursi, J. P., D. Ursi, M. Ieven, and S. R. Pattyn. 1992. Utility of an internal control for the polymerase chain reaction. Application to detection of *Mycoplasma pneumoniae* in clinical specimens. Apmis **100**:635-639.
- van Belkum, A. 1999. The role of short sequence repeats in epidemiologic typing. Curr. Opin. Microbiol. **2**:306-311.
- van Belkum, A. 1999. Short sequence repeats in microbial pathogenesis and evolution. Cell. Mol. Life Sci. **56**:729-34.
- van Belkum, A., S. Scherer, W. van Leeuwen, D. Willemse, L. van Alphen, and H. Verbrugh. 1997. Variable number of tandem repeats in clinical strains of *Haemophilus influenzae*. Infect. Immun. **65**:5017-5027.
- van Belkum, A., M. Struelens, A. de Visser, H. Verbrugh, and M. Tibayrenc. 2001. Role of genomic typing in taxonomy, evolutionary genetics, and microbial epidemiology. Clin. Microbiol. Rev. **14**:547-560.
- Van Ert, M. N., W. R. Easterday, T. S. Simonson, J. M. U'Ren, T. Pearson, L. J. Kenefic, J. D. Busch, L. Y. Huynh, M. Dukerich, C. B. Trim, J. Beaudry, A. Welty-Bernard, T. Read, C. M. Fraser, J. Ravel, and P. Keim. 2007. Strain-specific single-nucleotide polymorphism assays for the *Bacillus anthracis* Ames strain. J. Clin. Microbiol. **45**:47-53.
- 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, and W. J. Melchers. 1992. Genus- and species-specific identification of mycoplasmas by 16S rRNA amplification. Appl. Environ. Microbiol. **58**:2606-2615.
- Vergnaud, G. 1989. Polymers of random short oligonucleotides detect polymorphic loci in the human genome. Nucleic Acids Res. **17**:7623-7630.
- Vergnaud, G., and C. Pourcel. 2006. Multiple Locus VNTR analysis, p. 83-104. In E. Stackebrandt (ed.), Molecular identification, Systematics, and Population Structure of Prokaryotes. Springer-Verlag, Berlin.
- Vicca, J., T. Stakenborg, D. Maes, P. Butaye, J. Peeters, A. de Kruijff, and F. Haesebrouck. 2003. Evaluation of virulence of *Mycoplasma hyopneumoniae* field isolates. Vet. Microbiol. **97**:177-190.
- Vilei, E. M., and J. Frey. 2004. Differential clustering of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC strains by PCR-REA of the *bgl* locus. Vet. Microbiol. **100**:283-288.
- Vilei, E. M., J. Nicolet, and J. Frey. 1999. IS1634, a novel insertion element creating long, variable-length direct repeats which is specific for *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* small-colony type. J. Bacteriol. **181**:1319-1323.
- Vos, P., R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, T. van de Lee, M. Hornes, A. Frijters, J. Pot, J. Peleman, M. Kuiper, and et al. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Res. **23**:4407-4414.
- Waites, K. B., M. F. Balish, and T. P. Atkinson. 2008. New insights into the pathogenesis and detection of *Mycoplasma pneumoniae* infections. Future Microbiol. **3**:635-648.
- Waites, K. B., C. M. Bébéar, J. A. Roberston, D. F. Talkington, and G. E. Kenny (ed.). 2001. Cumitech 34, Laboratory diagnosis of mycoplasmal infections. American Society for Microbiology, Washington D. C.
- Waites, K. B., and D. Talkington. 2005. New developments in human diseases due to mycoplasmas, p. 289-354. In A. Blanchard and G. F. Browning (ed.), Mycoplasmas: pathogenesis, molecular biology, and emerging strategies for control. Horizon Bioscience, Wyomondham.
- Waites, K. B., and D. F. Talkington. 2004. *Mycoplasma pneumoniae* and its role as a human pathogen. Clin. Microbiol. Rev. **17**:697-728.

513. **Walter, N. D., G. B. Grant, U. Bandy, N. E. Alexander, J. M. Winchell, H. T. Jordan, J. J. Sejvar, L. A. Hicks, D. R. Gifford, N. T. Alexander, K. A. Thurman, S. B. Schwartz, P. H. Dennehy, N. Khetsuriani, B. S. Fields, M. T. Dillon, D. D. Erdman, C. G. Whitney, and M. R. Moore.** 2008. Community outbreak of *Mycoplasma pneumoniae* infection: school-based cluster of neurologic disease associated with household transmission of respiratory illness. *J. Infect. Dis.* **198**:1365-1374.
514. **Waring, A. L., T. A. Halse, C. K. Csiza, C. J. Carlyn, K. A. Musser, and R. J. Limberger.** 2001. Development of a genomics-based PCR assay for detection of *Mycoplasma pneumoniae* in a large outbreak in New York State. *J. Clin. Microbiol.* **39**:1385-1390.
515. **Wei, W., I. M. Lee, R. E. Davis, X. Suo, and Y. Zhao.** 2008. Automated RFLP pattern comparison and similarity coefficient calculation for rapid delineation of new and distinct phytoplasma 16Sr subgroup lineages. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **58**:2368-2377.
516. **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, and et al.** 1989. A phylogenetic analysis of the mycoplasmas: basis for their classification. *J. Bacteriol.* **171**:6455-6467.
517. **Weiser, J. N., J. M. Love, and E. R. Moxon.** 1989. The molecular mechanism of phase variation of *H. influenzae* lipopolysaccharide. *Cell* **59**:657-665.
518. **Welsh, J., and M. McClelland.** 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.* **18**:7213-7218.
519. **Welti, M., K. Jatton, M. Altwegg, R. Sahli, A. Wenger, and J. Bille.** 2003. Development of a multiplex real-time quantitative PCR assay to detect *Chlamydia pneumoniae*, *Legionella pneumophila* and *Mycoplasma pneumoniae* in respiratory tract secretions. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **45**:85-95.
520. **Westberg, J., A. Persson, B. Pettersson, M. Uhlen, and K. E. Johansson.** 2002. ISMmy1, a novel insertion sequence of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* small colony type. *FEMS Microbiol. Lett.* **208**:207-213.
521. **Westrom, L.** 1975. Effect of acute pelvic inflammatory disease on fertility. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **121**:707-713.
522. **Wetter, D. A., and M. J. Camilleri.** Clinical, etiologic, and histopathologic features of Stevens-Johnson syndrome during an 8-year period at Mayo Clinic. *Mayo Clin. Proc.* **85**:131-138.
523. **Wikstrom, A., and J. S. Jensen.** 2006. *Mycoplasma genitalium*: a common cause of persistent urethritis among men treated with doxycycline. *Sex. Transm. Infect.* **82**:276-279.
524. **Williams, J. G., A. R. Kubelik, K. J. Livak, J. A. Rafalski, and S. V. Tingey.** 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* **18**:6531-6535.
525. **Williamson, J., B. P. Marmion, D. A. Worswick, T. W. Kok, G. Tannock, R. Herd, and R. J. Harris.** 1992. Laboratory diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* infection. 4. Antigen capture and PCR-gene amplification for detection of the *Mycoplasma*: problems of clinical correlation. *Epidemiol. Infect.* **109**:519-537.
526. **Winchell, J. M., K. A. Thurman, S. L. Mitchell, W. L. Thacker, and B. S. Fields.** 2008. Evaluation of three real-time PCR assays for detection of *Mycoplasma pneumoniae* in an outbreak investigation. *J. Clin. Microbiol.* **46**:3116-3118.
527. **Woese, C. R.** 1987. Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* **51**:221-271.
528. **Wolff, B. J., W. L. Thacker, S. B. Schwartz, and J. M. Winchell.** 2008. Detection of macrolide resistance in *Mycoplasma pneumoniae* by real-time PCR and high-resolution melt analysis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**:3542-3549.
529. **Wu, Q., R. J. Martin, S. Lafasto, B. J. Efaw, J. G. Rino, R. J. Harbeck, and H. W. Chu.** 2008. Toll-like receptor 2 down-regulation in established mouse allergic lungs contributes to decreased mycoplasma clearance. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **177**:720-729.
530. **Wu, Q., R. J. Martin, J. G. Rino, R. Breed, R. M. Torres, and H. W. Chu.** 2007. IL-23-dependent IL-17 production is essential in neutrophil recruitment and activity in mouse lung defense against respiratory *Mycoplasma pneumoniae* infection. *Microbes Infect.* **9**:78-86.
531. **Xiao, L., D. M. Crabb, L. B. Duffy, J. I. Glass, and K. B. Waites.** 2010. Genotyping characterization of *Ureaplasma urealyticum* isolates from men with non-gonococcal urethritis by pulsed field gel electrophoresis. Presented at the 18th Congress of the International Organization for Mycoplasmaology. Abstract 91, Chianciano, Italy, 11-16 July.
532. **Xiao, L., J. Glass, L. B. Duffy, and K. B. Waites.** 2008. Detection of *Mycoplasma pneumoniae* by real-time PCR with validation by two gene targets. Presented at the 17th Congress of the International Organization for Mycoplasmaology. Abstract 188, Tianjin, China, 6-11 July.

533. **Xin, D., Z. Mi, X. Han, L. Qin, J. Li, T. Wei, X. Chen, S. Ma, A. Hou, G. Li, and D. Shi.** 2009. Molecular mechanisms of macrolide resistance in clinical isolates of *Mycoplasma pneumoniae* from China. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**:2158-2159.
534. **Yasuda, M., S. Maeda, and T. Deguchi.** 2005. In vitro activity of fluoroquinolones against *Mycoplasma genitalium* and their bacteriological efficacy for treatment of *M. genitalium*-positive non-gonococcal urethritis in men. *Clin. Infect. Dis.* **41**:1357-1359.
535. **Yaya, A., L. Manso-Silvan, A. Blanchard, and F. Thiaucourt.** 2008. Genotyping of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC by multilocus sequence analysis allows molecular epidemiology of contagious bovine pleuropneumonia. *Vet. Res.* **39**:14.
536. **Yogev, D., G. F. Browning, and K. S. Wise.** 2002. Genetic mechanisms of surface variation, p. 417-443. In S. Razin and R. Herrmann (ed.), *Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas*. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.
537. **Yogev, D., D. Halachmi, G. E. Kenny, and S. Razin.** 1988. Distinction of species and strains of mycoplasmas (mollicutes) by genomic DNA fingerprints with an rRNA gene probe. *J. Clin. Microbiol.* **26**:1198-1201.
538. **Yokoi, S., S. Maeda, Y. Kubota, M. Tamaki, K. Mizutani, M. Yasuda, S. Ito, M. Nakano, H. Ehara, and T. Deguchi.** 2007. The role of *Mycoplasma genitalium* and *Ureaplasma urealyticum* biovar 2 in post-gonococcal urethritis. *Clin. Infect. Dis.* **45**:866-871.
539. **Yoshida, T., T. Deguchi, M. Ito, S. Maeda, M. Tamaki, and H. Ishiko.** 2002. Quantitative detection of *Mycoplasma genitalium* from first-pass urine of men with urethritis and asymptomatic men by real-time PCR. *J. Clin. Microbiol.* **40**:1451-1455.
540. **Yoshida, T., S. Maeda, T. Deguchi, and H. Ishiko.** 2002. Phylogeny-based rapid identification of mycoplasmas and ureaplasmas from urethritis patients. *J. Clin. Microbiol.* **40**:105-110.
541. **Yoshida, T., S. Maeda, T. Deguchi, T. Miyazawa, and H. Ishiko.** 2003. Rapid detection of *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma parvum*, and *Ureaplasma urealyticum* organisms in genitourinary samples by PCR-microtiter plate hybridization assay. *J. Clin. Microbiol.* **41**:1850-1855.
542. **Yu, J. T., W. Y. Tang, K. H. Lau, L. Y. Chong, and K. K. Lo.** 2008. Asymptomatic urethral infection in male sexually transmitted disease clinic attendees. *Int. J. STD AIDS* **19**:155-158.
543. **Yus, E., T. Maier, K. Michalodimitrakis, V. van Noort, T. Yamada, W. H. Chen, J. A. Wodke, M. Guell, S. Martinez, R. Bourgeois, S. Kuhner, E. Raineri, I. Letunic, O. V. Kalinina, M. Rode, R. Herrmann, R. Gutierrez-Gallego, R. B. Russell, A. C. Gavin, P. Bork, and L. Serrano.** 2009. Impact of genome reduction on bacterial metabolism and its regulation. *Science* **326**:1263-1268.
544. **Zheng, X., L. J. Teng, H. L. Watson, J. I. Glass, A. Blanchard, and G. H. Cassell.** 1995. Small repeating units within the *Ureaplasma urealyticum* MB antigen gene encode serovar specificity and are associated with antigen size variation. *Infect. Immun.* **63**:891-898.
545. **Zhu, Y., P. E. Fournier, M. Ereemeeva, and D. Raoult.** 2005. Proposal to create subspecies of *Rickettsia conorii* based on multi-locus sequence typing and an emended description of *Rickettsia conorii*. *BMC Microbiol.* **5**:11.
546. **Zimmerman, C. U., R. Rosengarten, and J. Spargser.** 2010. Phase variation of the UU172 locus in *Ureaplasma parvum* serovar 3. Presented at the 18th Congress of the International Organization for Mycoplasmaology. Abstract 60, Chianciano, Italy, 11-16 July.

ANNEXES

ANNEXES

Liste des publications et communications en rapport avec les mycoplasmes

Articles publiés dans des revues internationales à comité de lecture

- Pereyre S, Métifiot M, Cazanave C, Renaudin H, Charron A, Bébéar C, Bébéar CM.
Characterisation of in vitro-selected mutants of *Ureaplasma parvum* resistant to macrolides and related antibiotics.
Int. J. Antimicrob. Agents 2007;29(2):207-211.
- Dégrange S, Cazanave C, Charron A, Renaudin H, Bébéar C, Bébéar CM.
Development of multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis for molecular typing of *Mycoplasma pneumoniae*.
J. Clin. Microbiol. 2009;47(4):914-23.

Article soumis à publication

- Cazanave C, Charron A, Renaudin H, Bébéar C.
Development of a Multiple-Locus Variable-Number Tandem-Repeat Analysis (MLVA) for *Mycoplasma genitalium* Molecular Typing.
Soumis au J. Clin. Microbiol.

Travaux didactiques

- Bébéar C, Cazanave C, Pereyre S, Bébéar CM.
2009. Mycoplasmes urogénitaux, p. 57-61.
In M. Janier (ed.), Les maladies sexuellement transmissibles. Masson, Paris.

Communications orales

- Dégrange S, Cazanave C, Charron A, Régnier J, Renaudin H, Bébéar C, Bébéar CM.
Génotypage de *Mycoplasma pneumoniae* par analyse multi-loci des séquences répétées en tandem. V^{ème} Congrès de la Société Française de Microbiologie, Nantes, France. 30 mai-1^{er} juin 2007.
- Dégrange S, Cazanave C, Charron A, Renaudin H, Bébéar C, Bébéar CM.
Development of multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis for molecular typing of *Mycoplasma pneumoniae*. 17^{ème} Congrès de l'International Organization for Mycoplasmaology, Tianjin, Chine. 6-11 juillet 2008.

- Cazanave C, Charron A, Renaudin H, Bébéar C.
Development of multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis for molecular typing of *Mycoplasma genitalium*. 18^{ème} Congrès de l'International Organization for Mycoplasmaology, Chianciano Terme, Italie. 11-16 juillet 2010.

Communications écrites (posters)

- Pereyre S, Métifiot M, Charron A, Renaudin H, Cazanave C, Bébéar C, Bébéar CM. In vitro selection and characterization of resistance to macrolides and related antibiotics in *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma parvum*. 16^{ème} Congrès de l'International Organization for Mycoplasmaology, Cambridge, Angleterre. 9-14 juillet 2006.
- Cazanave C, Dégrange S, Charron A, Régnier J, Renaudin H, Bébéar C, Bébéar CM.
Génotypage de *Mycoplasma pneumoniae* par analyse multi-loci des séquences répétées en tandem. 8^{ème} Journée scientifique 2008 de l'Ecole Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé de l'Université de Bordeaux, Arcachon, France. 16 avril 2008.
- Cazanave C, Dégrange S, Charron A, Renaudin H, Bébéar CM.
Génotypage de *Mycoplasma pneumoniae* par analyse multi-loci des séquences répétées en tandem. 9^{ème} Journée Scientifique de l'École Doctorale Sciences de la Vie et de la Santé de l'Université de Bordeaux, Arcachon, France. 8 Avril 2009.