HAL
open science

Etude fonctionnelle de la communauté microbienne de la peau par une approche métagénomique

Alban Mathieu

To cite this version:

Alban Mathieu. Etude fonctionnelle de la communauté microbienne de la peau par une approche métagénomique. Autre. Ecole Centrale de Lyon, 2014. Français. NNT : 2014ECDL0010 . tel-02140144

HAL Id: tel-02140144

https://theses.hal.science/tel-02140144

Submitted on 27 May 2019

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

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

THÈSE

Présentée pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LYON

Délivré par l'

ÉCOLE CENTRALE DE LYON

École doctorale : EEA
Spécialité : Génomique microbienne

Par

Alban Mathieu

Etude fonctionnelle de la communauté microbienne de la peau par une approche métagénomique

Directeur de thèse: Pascal SIMONET

Soutenue à l'Ecole Centrale de Lyon, Ecully

Le 25 Avril 2014

Devant le jury composé de

Prof. Max Maurin, Institut de Biologie et Pathologie, CHU de Grenoble.	**Rapporteur**
Dr. Jean François Brugère, Université d'Auvergne, Clermont-Ferrand.	**Rapporteur**
Dr. Gérard Lina, Centre de Biologie et d'Anatomie Pathologique Sud , Lyon.	**Examinateur**
Dr. Eric Pelletier, CEA / Génoscope-Centre National de Séquençage, Evry.	**Examinateur**
Prof. Timothy M. Vogel, Université Claude Bernard Lyon 1, Ecully, France.	**Examinateur**
Dr Patrick Robe, Libragen, Toulouse.	**Co-directeur de thèse**
Dr. Pascal SIMONET, CNRS Ecole Centrale de Lyon, Ecully, France.	**Directeur de thèse**

Résumé

La peau l'un des plus grands organes du corps humain avec une superficie moyenne de 1,5m² à 2m² est à l'interface avec le monde extérieur et régule les échanges entre les deux milieux. Avec ses nombreuses invaginations et des apports nutritifs constants cet écosystème favorise la colonisation par des microorganismes.

Les études taxonomiques basées sur le séquençage du gène *rrs* après amplification PCR à partir de l'ADN extrait ont permis de découvrir la diversité des différentes populations microbiennes qui colonisent la peau humaine dont peu sont cultivables in vitro. A côté des espèces communes à tous les individus une certaine spécificité individuelle a été trouvée de même qu'il a été montré que la surface du corps humain se différencie en régions avec des spécificités physico-chimiques propres pour lesquelles des correspondances taxonomiques du microbiote ont été détectées.

Ce travail de thèse, réalisé dans le cadre d'un contrat CIFRE avec la société LibraGen a eu pour but d'aborder le volet fonctionnel du microbiote cutané grâce à l'application de l'approche séquençage haut débit de l'ADN metagénomique bactérien extrait de la peau humaine. Cet objectif a nécessité le développement d'une méthode de prélèvement-extraction de l'ADN afin de remédier aux contraintes spécifiques de l'écosystème étudié, une faible densité microbienne et la putative présence de contamination par l'ADN humain. Les données de séquence obtenues nous ont permis de caractériser le potentiel fonctionnel du microbiote cutané des différents sites cutanés et, par comparaisons inter-environnementales de déterminer les fonctions spécifiquement rencontrées dans ce microbiote lié à l'homme. Les applications de ces travaux sont importantes comme par exemple la démonstration d'un effet sur le microbiote d'une application quotidienne d'onctions qui modifie tant la diversité taxonomique que le potentiel fonctionnel du microbiote cutané.

Remerciements

En premier lieu, j'aimerais remercier toutes les personnes qui m'ont offert la possibilité d'effectuer ce travail. La première personne à qui je pense est Pascal, merci à toi de m'avoir permis de continuer une nouvelle thèse, même si la première collaboration s'était avérée tumultueuse et compromise (ce n'était pas de notre faute). Ces plusieurs années de travail (mais pas que) avec toi ont été formatrices et agréables d'un point de vue professionnel évidemment, mais aussi humain. Merci de m'avoir accompagné tant de fois à Genève, Toulouse, etc..

Merci à toute l'équipe de Libragen de m'avoir ouvert leur porte pour débuter une collaboration et d'avoir accepté de commencer ce travail pionnier. Merci à Renaud de m'avoir accueilli dans un premier temps, merci à Marie-Joëlle d'avoir continué cette collaboration et de s'être impliquée dans la concrétisation et le devenir des travaux. J'aimerai également remercier Cyrille, avec qui les 3 premiers mois à Toulouse ont été formateurs et m'ont donné envie de valoriser les travaux de recherche, merci à Patrick d'avoir pris le relais et d'avoir suivi les travaux tout au long de ces dernières années. J'aimerai également remercier les personnes qui se sont investies physiquement dans ces études, Daniel, Rob, encore une fois Cyrille et Patrick. La vie n'a pas due être facile pour ces 2 mois passés avec du déodorant que sur une aisselle… Ou peut-être devrais-je remercier votre entourage ! Merci à toute l'équipe de Toulouse, Anne-Marie, Aurélien, Joran, Chantal, Pascale, Boris, Carine, Rob et Fabrice.

Je souhaiterais également remercier toute l'équipe du service d'allergologie de l'hôpital Lyon Sud, c'est à dire l'équipe de Jean-François Nicolas et de Frédéric Bérard. Merci à Aurore Rozières de m'avoir plus qu'aidé dans la rédaction de différents projets, de ma thèse, ainsi que le protocole pour le comité d'éthique. Merci aux infirmières pour m'avoir aidé à échantillonner, à Gérard Lina, à Marc Vocanson, à Jean-François Nicolas et à Frédéric Bérard pour nous avoir suivis dans les projets et assistés aux différentes réunions. Il est très frustrant pour moi de n'avoir pu aboutir et pu présenter nos travaux dans ce manuscrit.

Je remercie bien évidemment toute l'équipe de Génomique microbienne environnementale, qui a beaucoup changé entre mon arrivée au sein de l'équipe et la fin de ce travail maintenant. Néanmoins, un petit groupe résiste encore et toujours à l'envahisseur. Merci à toi, Tim, pour toutes les discussions scientifiques qui dérivent quand même relativement vite vers des sujets très éloignés. J'espère pouvoir encore progresser aux échecs pour pouvoir au moins avoir une victoire contre toi.. Merci à Seb, pour son aide assez fréquente dans mes difficultés d'écriture informatique underscoreMerciunderscore, pour ses bon petits plats aux conclaves et pour sa bonne humeur, quand je ne passe pas par la porte interdite. Merci à Cath, mon ancienne coloc, ça commence à faire un bout de temps maintenant mais c'était vraiment sympa ! J'espère que maintenant tu es imbattable sur la chanson française. Merci à Joseph pour ses petits coups de gueule intempestifs sur tout, et ses discussions intéressantes sur tout.

Merci aux anciens de l'équipe avec qui j'aurai du terminer presque en même temps, Jérém (c'était bien sympa Jérem), Margaux, Sam, Céline, Laurine, Tom (mon copain'g !), et ceux d'avant quand j'étais encore en master, Yohan, Cédric, Aurélie, Maude, Nath. Merci à ceux qui sont toujours dans l'équipe, Sandrine, Laure, Isabelle, Lorrie, Laura, Christoph, Jean-Seb, David. Beaucoup d'entre vous ont joué le jeu de l'échantillonnage, je sais ça a pu être embarrassant au début que je frotte vos dessous de bras, mais on s'habitue à tout, non ? Merci à mes stagiaires Rabéa et Nikola, qui n'ont pas beaucoup eu besoin de moi pour faire du joli travail.
Merci à ceux et celles qui faisaient partie de mon bureau, certains sont déjà cités, mais je pense à Amal et Eliana, qui m'ont bien fait rire pendant ces 3 ans. Félicitations pour vos bouts de choux. Merci à toutes les personnes du laboratoire, François, Marie-Christine, Christian, Edith, Edwige, Marie, Naoufel et beaucoup d'autres ! Ah et merci Alice, qui m'a racketté de 50 centimes tous les midis pour pouvoir rentrer au chaud quand l'hiver était glacial.

Enfin il reste encore beaucoup de personnes plus proches que j'aimerai remercier. Ma famille évidemment, merci Père, merci Mère, pour m'avoir permis de faire ces longues années d'études, sans voir forcément où j'irai à la fin. Merci à mes frères et sœur, Cyrille (tu conduis bien), Félix (tu écris bien) et Carole (tu dessines bien). Merci les amis fléchois, Bertrand, JS et Jérem et tous les autres ; Merci les amis lyonnais, Manu, Jano, Olive, Romain et tous les autres. Et finalement Merci ma Steph, pour qui la metagénomique n'a plus de secrets, j'espère ne pas avoir été trop ennuyeux avec la rédaction de ce qui suit.

Glossaire et abréviations

ACP : Analyse en composante principale. Méthode d'analyse de données permettant de réduire le nombre de variables expliquant la structuration des individus/échantillons entre eux, et de les représenter sur un nombre réduit d'axes.

Core : Ensemble taxonomique microbien qui représente les microorganismes d'un environnement gobal sur l'ensemble des sous-environnements (ie. dans cette étude, le core microbiote du front est représenté par les microorganismes détectés dans tous les environnements du front des différents individus testés).

Fitness : Valeur adaptative des espèces à leur environnement. Capacité d'une entité biologique à se reproduire et/ou se multiplier dans un environnement.

Lecture : Nom attribué aux séquences d'ADN contenues dans un métagénome de l'analyse des séquenceurs, plus communément appelé « read » d'après leur nom anglais.

MDA : Multiple displacement amplification. Technique d'amplification aléatoire d'ADN utilisant une polymérase de phage afin d'augmenter les quantités disponibles pour un échantillon.

PCR : Polymerase chain reaction. Réaction de polymérisation en chaîne.

Phylotype : Unité de classement phylogénétique basée sur la relation phylogénique qu'ont les entités biologiques entre elles. Dans le cadre de la métagénomique, toutes les séquences d'un marqueur phylogénétique avec une analogie de séquences à 97% sont regroupées dans un même cluster, ce qui permet de les assigner à un niveau taxonomique.

qPCR : PCR quantitative, méthode expérimentale permettant de compter le nombre de copies de gènes présent dans un échantillon d'ADN.

Liste des figures

Figure 1 : Coupe schématique de la peau et répartition des différentes couches cellulaires cutanées. 21
Figure 2 : Acidité et température selon les régions du corps humain (d'après Wilson *et al.* [47]). 24
Figure 3 : Schéma d'une coupe longitudinale de peau et des cellules de l'immunité présentes (d'après Nestle *et al.* [57]). 27
Figure 4 : Schéma de la participation des kératinocytes à la réponse immunitaire (d'après Nestle *et al.* [57]). 28
Figure 5 : Coupe schématique de peau et la distribution des microorganismes dans leur microbiome. 31
Figure 6 : Les différentes techniques d'étude de la diversité microbienne et leurs potentielles conclusions. 32
Figure 7 : Distribution topographique du microbiote de la peau selon les régions du corps (d'après Grice *et al* [45]). 35
Figure 8 : Observation microscopique d'un échantillon prélevé sur le pied (X500). 50
Figure 9 : Observation microscopique d'un échantillon prélevé sous l'aisselle (X500)… 51
Figure 10 : Distribution relative des reads de métagénomes de la peau assignés aux 21 genres les plus détectés (MG RAST annotation, Evalue <10^{-5}). 63
Figure 11 : Distribution relative de reads assignés à 6 genres bactériens ayant une différence significative de représentation sur les métagénomes de peaux par rapport aux 65 autres métagénomes environnementaux (en %, données basées sur l'annotation MG-RAST, Evalue<10^{-5}). 65
Figure 12 : Distribution relative de reads assignés aux sous systèmes de niveaux général 1 (en %, données basées sur l'annotation MG-RAST, Evalue<10^{-5}). 67
Figure 13 : Distribution relative de reads assignés aux sous systèmes de niveaux 3 ayant une différence significative de représentation entre les 2 individus (en %, données basées sur l'annotation MG-RAST, Evalue<10^{-5}). 68
Figure 14 : Analyse en composante principale base sur l'analyse de la distribution des reads au niveau fonctionnel 3 de l'annotation MG-RAST (Evalue<10^{-5}). 69
Figure 15 : Distribution relative de reads assignés à 6 fonctions bactériennes ayant une différence significative de représentation sur les métagénomes de peaux par rapport aux 65 autres métagénomes environnementaux (en %, données basées sur l'annotation MG-RAST, Evalue<10^{-5}). 73
Figure 16 : Schéma récapitulatif du protocole expérimental. 84
Figure 17 : Analyse en composante principale des profils RISA des échantillons des temps 1, 2 et 3 (avant traitement). 88
Figure 18 : Analyse en composante principale des profils RISA des échantillons des temps 1, 2 et 3 (avant traitement). 89
Figure 19 : Analyse en composante principale des profils RISA des échantillons des temps 1, 2 et 3 classés entre sites de prélèvements (avant traitement). 90
Figure 20 : Analyse en composante principale des profils RISA des échantillons des aisselles (avant traitement). 92
Figure 21 : Analyse en composante principale des profils RISA des échantillons des pieds (avant traitement). 94
Figure 22 : Analyse en composante principale des profils RISA des échantillons des hémi-fronts. 96

Figure 23 : Distribution relative (en %) des genres majeurs du microbiote cutané (*Staphylococcus*, *Propionibacterium* et *Corynebacterium*) ainsi que des genres statistiquement différents entre les 3 zones cutanées (données basées sur l'annotation MG-RAST, Evalue<10^{-5}). 101
Figure 24 : Distribution relative (en %) des genres statistiquement différents les 3 zones cutanées (données basées sur l'annotation MG-RAST, Evalue<10^{-5})....102
Figure 25 : Distribution relative des 3 genres majeurs bactériens cutanés dans les métagénomes du pied appartenant à l'individu DAU. 104
Figure 26 : Distribution relative des 3 genres majeurs bactériens cutanés dans les métagénomes du pied appartenant à l'individu RTH. 104
Figure 27 : Distribution relative des 3 genres majeurs bactériens cutanés dans les métagénomes de l'aisselle appartenant à l'individu DAU. 106
Figure 28 : Distribution relative des 3 genres majeurs bactériens cutanés dans les métagénomes de l'aisselle appartenant à l'individu RTH. 107
Figure 29 : Distribution relative des 3 genres majeurs bactériens cutanés dans les métagénomes du front appartenant à l'individu DAU. 108
Figure 30 : Analyse en composante principale basée sur l'analyse des distributions fonctionnelles au niveau fonctionnel 3 de l'annotation MG-RAST (Evalue<$10^{-5)}$ des échantillons provenant de la zone cutanée aisselle. 110
Figure 31 : Analyse en composante principale basée sur l'analyse des distributions fonctionnelles au niveau fonctionnel 3 de l'annotation MG-RAST (Evalue<$10^{-5)}$ des échantillons provenant de la zone cutanée du pied et du front. 112
Figure 32 : Distribution relative (en %) de fonctions ayant subi un putatif impact des traitements effectués à la zone cutanée (données basées sur l'annotation MG-RAST, Evalue<10^{-5}). 116
Figure 33 : Distribution relative (en %) de voies fermentaires ayant une différence significative de distributions entre les environnements aisselle, pied et front (données basées sur l'annotation MG-RAST, Evalue<10^{-5}). 119
Figure 34 : Distribution relative (en %) de fonctions associées aux voies fermentaires différemment distribuées entre les métagénomes de zones avec traitement comparés aux métagénomes des zones contrôles (données basées sur l'annotation MG-RAST, Evalue<10^{-5}). 122
Figure 35 : Distribution relative (en %) de fonctions ayant une différence significative de distributions entre les environnements aisselle, pied et front (données basées sur l'annotation MG-RAST, Evalue<10^{-5}). 124
Figure 36 : Distribution relative (en %) de fonctions associées à la résistance bactérienne à différents composés différemment distribuées entre les métagénomes de zones avec traitement comparés aux métagénomes des zones contrôles (données basées sur l'annotation MG-RAST, Evalue<10^{-5}). 127
Figure 37 : Distribution relative (en %) de fonctions permettant l'utilisation de différentes sources de carbone ayant une différence significative de distributions entre les environnements aisselle, pied et front (données basées sur l'annotation MG-RAST, Evalue<10^{-5}). 128
Figure 38 : Distribution relative (en %) de fonctions associées à l'utilisation de différentes sources carbonées différemment distribuées entre les métagénomes de zones avec traitement comparés aux métagénomes des zones contrôles (données basées sur l'annotation MG-RAST, Evalue<10^{-5})....131
Figure 39 : Distribution relative (en %) de fonctions associées à l'utilisation de différentes sources carbonées différemment distribuées entre les métagénomes de

zones avec traitement comparés aux métagénomes des zones contrôles (données basées sur l'annotation MG-RAST, Evalue<10^{-5})....133
Figure 40 : Distribution relative (en %) de fonctions associées à la biosynthèse de différents composés, différemment distribuées entre les métagénomes de zones avec traitement comparés aux métagénomes des zones contrôles (données basées sur l'annotation MG-RAST, Evalue<10^{-5})....135
Figure 41 : Distribution relative (en %) de fonctions associées à la biosynthèse de composés différemment distribuées entre les métagénomes de zones avec traitement comparés aux métagénomes des zones contrôles (données basées sur l'annotation MG-RAST, Evalue<10^{-5}). 136
Figure 42 : Distribution relative (en %) de fonctions associées à la biosynthèse de différents composés, différemment distribuées entre les métagénomes de zones avec traitement comparés aux métagénomes des zones contrôles (données basées sur l'annotation MG-RAST, Evalue<10^{-5})....137
Figure 43 : Distribution relative (en %) de fonctions diverses différemment distribuées entre les métagénomes de zones avec traitement comparés aux métagénomes des zones contrôles (données basées sur l'annotation MG-RAST, Evalue<10^{-5}). 139
Figure 44 : Distribution relative (en %) de fonctions diverses différemment distribuées entre les métagénomes de zones avec traitement comparés aux métagénomes des zones contrôles (données basées sur l'annotation MG-RAST, Evalue<10^{-5}). 141

Liste des tableaux

Tableau 1 : Composés détectés dans la sueur humaine (d'après Wilson *et al.* [47]). 25
Tableau 2 : Protocole de *qPCR* 48
Tableau 3 : Moyenne des rendements des quantités d'ADN et moyenne des quantifications des gènes *16S* et *gapdh* dans les échantillons. 54
Tableau 4 : Tableau des acronymes des échantillons séquencés. 82
Tableau 5 : Fonctions différemment distribuées entre les échantillons du front de l'individu DAU droit temps 8 et les autres échantillons du front....113

Liste des figures annexes

Figure annexe 1 : Observation microscopique d'un échantillon prélevé à l'avant bras (X500). 164
Figure annexe 2 : Observation microscopique d'un échantillon prélevé sur le front (X500). 165
Figure annexe 3 : Représentation virtuelle de profils de migration de produits d'amplification RISA. 178
Figure annexe 4 : Electrophorégrammes des échantillons pro aisselle droite des temps t1 à t8. 180
Figure annexe 5 : Electrophorégrammes des échantillons pro aisselle gauche des temps t1 à t8. 181
Figure annexe 6 : Electrophorégrammes des échantillons dau aisselle droite des temps t1 à t8. 182
Figure annexe 7 : Electrophorégrammes des échantillons dau aisselle gauche des temps t1 à t8. 183
Figure annexe 8 : Electrophorégrammes des échantillons cja aisselle droite des temps t1 à t8. 184

Figure annexe 9 : Electrophorégrammes des échantillons cja aisselle gauche des temps t1 à t8. 185
Figure annexe 10 : Electrophorégrammes des échantillons rth aisselle droite et gauche des temps t1 à t8. 186
Figure annexe 11 : Electrophorégrammes des échantillons pro pied droit des temps t1 à t8. 187
Figure annexe 12 : Electrophorégrammes des échantillons pro pied gauche des temps t1 à t8. 188
Figure annexe 13 : Electrophorégrammes des échantillons dau pied droit et gauche des temps t1 à t8. 189
Figure annexe 14 : Electrophorégrammes des échantillons cja pied droit des temps t1 à t8. 190
Figure annexe 15 : Electrophorégrammes des échantillons cja pied gauche des temps t1 à t8. 191
Figure annexe 16 : Electrophorégrammes des échantillons rth pied droite et gauche des temps t1 à t8. 192
Figure annexe 17: Electrophorégrammes des échantillons pro du front côté droit et gauche des temps t1 à t7. 193
Figure annexe 18: Electrophorégrammes des échantillons dau du front côté droit et gauche des temps t1, t2, t3 et t7. 194
Figure annexe 19: Electrophorégrammes des échantillons cja du front côté droit et gauche des temps t1, t2, t3 et t7. 195
Figure annexe 20 : Electrophorégrammes des échantillons rth du front côté droit et gauche des temps t1, t2, t3 et t7. 196

Liste des tableaux annexes

Tableau annexe 1 : Méthode de prélèvement cutané 161
Tableau annexe 2 : Extraction ADN avec les méthodes de lyse enzymatique ou de lyse physique. 162
Tableau annexe 3 : Numéros d'accessions des métagénomes environnementaux. 166
Tableau annexe 4 : Les 53 fonctions différemment distribuées dans les métagénomes de peaux par rapport aux 65 autres environnements. 167
Tableau annexe 5 : Distribution relative des genres bactériens les plus abondamment détectés dans les métagénomes de peau avec la méthode de «Lowest common ancestor ». 173
Tableau annexe 6 : Quantité d'ADN extraite des échantillons aisselles (ng). 175
Tableau annexe 7 : Fréquence de distribution relative des 50 premiers genres différemment distribués entre les métagénomes des 3 différentes zones cutanés. 197
Tableau annexe 8: Distribution des genres différemment représentés entre les échantillons DAU pieds sans traitement et les échantillons traités DAU PD8 (*p-value* sélective <0,01). 199
Tableau annexe 9 : Distribution des genres différemment représentés entre les échantillons RTH pieds sans traitement et les échantillons traités RTH PD8 (*p-value* sélective $<10^{-5}$). 201
Tableau annexe 10 : Distribution des genres différemment représentés entre les échantillons RTH aisselles sans traitement et les échantillons traités RTH AD8 (*p-value* sélective $<10^{-7}$). 203

Tableau annexe 11 : Distribution des genres différemment représentés entre les échantillons RTH aisselles sans traitement et les échantillons traités RTH AD8 (*p-value* sélective <10^{-4}).....204
Tableau annexe 12: Distribution des genres différemment distribués entre les échantillons DAU front contrôles et FD8 (*p-value* sélective <0,01).....206
Tableau annexe 13: Fonctions différemment distribuées entre les échantillons de l'aisselle de l'individu DAU droit temps 8 et les autres échantillons de l'aisselle (*p-value* <10^{-4}).....207
Tableau annexe 14: Fonctions différemment distribuées entre les échantillons de l'aisselle droite de l'individu RTH temps 8 et les autres échantillons de l'aisselle (*p-value* <10^{-6}).....210
Tableau annexe 15: Les fonctions différemment distribuées entre les métagénomes DAU PD8 et les autres métagénomes de pieds de l'individu DAU (*p-value* < 10^{-3}). 213
Tableau annexe 16: Les fonctions différemment distribuées entre les métagénomes RTHPD8 et les autres métagénomes de pieds de l'individu RTH (*p-value* < 10^{-5}). 215

Table des matières

Glossaire et abréviations **7**
Liste des figures **8**
Liste des tableaux **10**
Liste des figures annexes **10**
Liste des tableaux annexes **11**

Introduction **15**

Chapitre 1 : Synthèse bibliographique: La peau et son microbiote. **19**
La peau, un organe du corps humain. **19**
Composition chimique et biologique 21
Organisation cellulaire 21
Zones humides 24
Zones sébacées 25
Zones sèches 25
Barrière physique 26
Barrière immunologique 26
La peau, un environnement microbien **30**
Apport des approches culturales pour la mise en évidence du microbiote de la peau 30
Apport des approches basées sur l'extraction et l'exploitation de l'ADN bactérien directement extrait de la peau 33
Inventaire des différents types d'organismes présents à la surface de la peau humaine 36
Acquisition, développement et impacts du microbiote cutané **37**
Origine et développement de la flore microbienne cutanée. 37
Facteurs de structuration du microbiote cutané 38
Influence (potentielle) du microbiote sur l'état de santé de la peau 39
Décryptage fonctionnel du microbiote **41**
Métagénomique fonctionnelle du microbiote intestinal humain 41
Applications de la métagénomique fonctionnelle au microbiote cutané 42

Chapitre 2 : Etude de la faisabilité de la caractérisation fonctionnelle du microbiote cutané. **44**
Matériels et méthodes **45**
Microscopie 45
Prélèvements cutanés 46
Swabbing 46
Scratching 46
Surface de prélèvements 46
Protocoles d'extractions. 46
PCR quantitative 47
Filtration et traitement dnase 48
Résultats et discussion **49**
Microscopie 49
Prélèvements cutanés 51
Protocoles d'extraction d'ADN 54
Contamination en ADN hôte et PCR quantitative 55
Conclusion **57**

Chapitre 3: Caractérisation fonctionnelle du microbiote cutané **58**
Séquençage « shot-gun » du métagénome du microbiote cutané **58**
Matériels et méthodes 59
Echantillonnage 59
Extraction d'ADN 60
Séquençage et annotation 60
Résultats 62
Comparaison des genres microbiens : 62

Comparaison fonctionnelle : 65
Discussion 69
Comparaison taxonomique 69
Comparaison fonctionnelle 71
Comparaison fonctionnelle inter-environnementale 72
Voies métaboliques : 73
Conclusion 77

Chapitre 4 : Applications : Etudes de l'impact d'onctions sur les communautés microbiennes 78
Matériels et méthodes 79
Echantillonnage, traitement et extraction ADN 79
Etudes RISA 80
Méthode d'analyse de l'effet d'un traitement sur la diversité RISA 81
Séquençage et annotation 81
Méthodes d'analyses des distributions métagénomiques taxonomiques et fonctionnelles 83
Résultats et Discussion : 85
Impact des produits cosmétiques sur la diversité taxonomique du microbiote cutané 86
Similitude de la diversité RISA selon les zones cutanées 87
Similitude de la diversité RISA selon l'individu 89
Evolution de la diversité RISA selon l'environnement aisselle 91
Evolution de la diversité RISA selon l'environnement pied 93
Evolution de la diversité RISA selon l'environnement front 95
Conclusion de l'étude RISA 97
Impact des produits cosmétiques sur le profil métagénomique du microbiote cutané 98
Comparaison de la diversité taxonomique du microbiote. 99
Environnement Pied 102
Environnement Aisselle 105
Environnement Front : 107
Evolution temporelle du potentiel fonctionnel du microbiote. 109
Fonctions potentiellement ciblées par les onguents 114
Voies fermentaires 118
Résistance au stress environnemental 122
Sources de carbone 128
Biosynthèse 133
Divers 137
Conclusion 142

Conclusion générale 146

Références : 150

Annexes 161

Introduction

Les microorganismes procaryotes (bactéries, Archaea) évoluent sur la planète Terre depuis environ 3,5 milliards d'années [1], pour atteindre aujourd'hui dans la biosphère un nombre de cellules estimé à $5x10^{30}$ [2], soit supérieur à celui des grains de sable sur la terre ou celui des étoiles dans l'univers. Ces deux facteurs quantitatifs associés au fabuleux potentiel adaptatif des procaryotes que leur confère leur importante plasticité génétique et génomique [3] sont à l'origine de l'extraordinaire niveau de diversité procaryotique observé aujourd'hui [4]. Ceci a permis à ces organismes de coloniser tous les écosystèmes de notre planète des plus courants, sols [5], eaux [6], environnements marins [7] et sédiments [8] aux plus extrêmes tels que les milieux acides [9], hyper-salins [10], sources hydrothermales [11] ou encore tous les milieux en interaction avec d'autres organismes dans le monde animal [12], végétal [13] et même avec des champignons [14].

Les méthodes d'études des microorganismes sont relativement récentes, puisqu'il a fallu attendre l'avènement de la microscopie avec Anton van Leeuwenhoek au XVIIème siècle afin de démontrer l'existence d'un monde microbien par définition invisible à l'œil nu [15].

C'est avec la mise en culture *in vitro* des microorganismes sur des milieux appropriés qu'ont pu ensuite se développer les études de physiologie, de génétique, ou d'écologie microbienne [16]. La possibilité de former une colonie sur un milieu de culture suite à la multiplication clonale à partir d'une cellule unique a permis l'isolement de milliers de souches pures pouvant être ensuite cultivées en milieux liquides. Les études de physiologie réalisées sur les isolats disponibles ont donné un premier aperçu de la palette de fonctions que pouvaient réaliser ces représentants cultivés du monde microbien, de décrire les caractéristiques propres de chacun d'eux, en termes d'utilisation de sources carbonées, de dépendance à l'oxygène, et de gamme de composés susceptibles d'être métabolisés ou produits. Rappelons que 70% des antibiotiques présents actuellement sur le marché trouvent leur origine chez des microorganismes isolés du sol cultivés en fermenteurs géants pour obtenir les quantités nécessaires [17].

Après la découverte de la structure de l'ADN, les études de physiologie se sont enrichies de toute la gamme des concepts et méthodes liés à la génétique, la biologie moléculaire permettant d'identifier les gènes, comprendre leur régulation et leur expression. Ces

outils ont également été utilisés pour affiner la taxonomie bactérienne par toute une panoplie de méthodes dont les plus connues sont l'hybridation ADN-ADN [18] et le séquençage de l'ARN ribosomique [19]. Ces études ont aussi débouché sur une meilleure compréhension des mécanismes qui ont permis aux procaryotes d'évoluer et de s'adapter aux différents écosystèmes mentionnés précédemment. Organismes le plus souvent unicellulaires se reproduisant généralement par division mitotique, leur principale capacité d'adaptation basée sur la possibilité de générer une importante diversité génétique se fait alors par le biais de mutations spontanées [20] ou par réarrangements chromosomiques endogènes via l'implication de transposons et de séquences d'insertion [21]. Autre mécanisme, quasi spécifique à ces microorganismes, le transfert horizontal de matériel génétique entre cellules de même génération est considéré comme majoritairement responsable de l'incroyable potentiel d'adaptation en permettant à des gènes ou même des structures génomiques entières telles que les plasmides d'être partagés entre les membres d'une même communauté [22].

Mais les travaux de physiologie, de génétique et surtout d'écologie n'ont pas tardé à révéler les limites de l'approche basée sur la culture *in vitro* des bactéries. Par différentes approches, notamment la microscopie, permettant d'analyser les cellules dans les échantillons environnementaux, il a pu être montré que seule une petite fraction des espèces présentes étaient susceptibles de développer des colonies sur les milieux solidifiés qui leur étaient proposés. Selon les environnements, les proportions d'organismes cultivables ou tout au moins cultivés, pouvaient selon les estimations, ne pas dépasser 0,1%, à 1 % [23].

Cette limitation, beaucoup trop contraignante, a très certainement été à l'origine du développement de nouvelles approches visant à s'affranchir de ces biais. A côté des efforts réalisés pour proposer des milieux de culture plus appropriés, pour prendre en compte les nécessités métaboliques les plus pointues, y compris dans le cadre d'associations entre plusieurs espèces [24], la microbiologie environnementale a réalisé sa révolution en ne s'intéressant plus aux organismes eux-mêmes mais à leur seul ADN. Différentes techniques ont alors vu le jour pour extraire et purifier l'ADN bactérien directement à partir de l'environnement court-circuitant totalement l'étape de mise en culture [25]. N'étant plus ciblé sur un microorganisme isolé mais intégrant nécessairement tous les génomes extraits, de génomique le niveau d'étude est devenu « métagénomique » et a bénéficié de tous les outils d'exploitation et d'étude de l'ADN :

hybridation, restriction, amplification, clonage, séquençage *etc* [26]. De limitée à l'exploitation de l'ADN environnemental après clonage pour produire des banques d'ADN, la définition de la « métagénomique » s'est progressivement étendue jusqu'à inclure toute approche utilisant l'ADN directement extrait d'une communauté microbienne [27].

Le séquençage de l'ADN grâce aux nouvelles approches à haut débit [28] a cependant permis de franchir un palier annexe pour décrire la diversité microbienne tant taxonomique que fonctionnelle en dépit des biais importants liés à la difficulté d'extraire tout l'ADN bactérien du milieu exploré [29]. Le principe est simple ; il consiste à associer par similarité les données de séquences générées à partir de l'ADN environnemental (ou des produits résultant de son amplification PCR) à celles présentes dans les bases de données constituées des génomes séquencés d'isolats identifiés et caractérisés pour en tirer des informations d'ordre taxonomique ou fonctionnel [30]. Naturellement, l'approche souffre encore des biais initiaux de la microbiologie car les études de physiologie ont nécessairement été limitées aux seuls isolats, laissant de fait un nombre important de gènes et de fonctions orphelins [31].

La métagénomique a malgré ces biais permis d'approfondir considérablement le décryptage de nombreux environnements microbiens et de constater combien l'omniprésence des bactéries y était préalablement sous-estimée [32]. Soulignons les travaux sur le tube digestif humain et la découverte de la diversité microbienne liée à un nombre de cellules dix fois supérieur à celui de la totalité des cellules qui composent un corps humain [33], à leur implication dans des pathologies que l'on croyait étiologiquement inférées à des causes environnementales ou génétiques [34]. L'importance du microbiote digestif est telle que son (méta)-génome (i.e. l'ensemble des génomes des bactéries qui le composent) a été qualifié de second génome humain [35].

Indéniablement, le microbiote intestinal bénéficie aujourd'hui d'une reconnaissance du monde scientifique, son décryptage au niveau fondamental s'accompagnant de retombées médicales et industrielles considérables, comme par exemple pour le développement de probiotiques [36]. Cette reconnaissance s'est accompagnée d'une prise de conscience que les microbiotes associés à d'autres organes du corps humain pouvaient aussi d'une part constituer de très bons modèles d'étude des mécanismes fondamentaux régissant les interactions entre pro et eucaryotes et d'autre part receler de nombreuses possibilités d'applications médicales et industrielles [37]. C'est notamment

le cas du microbiote cutané, même si son positionnement sur une partie beaucoup plus externe du corps humain par rapport au microbiote du tube digestif était initialement sensé lui conférer une importance moindre. Des études récentes semblent infirmer cette assertion avec un rôle du microbiote cutané non seulement dans l'apparence et la santé de la peau, avec potentiellement une implication dans des pathologies spécifiques mais encore sur la santé générale des patients [38]. Industriellement, l'essor de la cosmétique et le développement d'une quantité de produits dont la cible est la peau, sa santé et sa beauté montrent tout l'intérêt de prendre en compte le microbiote cutané, un partenaire qui peut jouer un rôle fondamental favorable ou défavorable.

Ce travail de thèse se positionne dans un objectif de décryptage du microbiote cutané tant au niveau taxonomique que fonctionnel en ayant recours pour la première fois aux outils les plus performants de la métagénomique et du séquençage à haut débit. Un tel objectif nécessitait une analyse approfondie des connaissances disponibles sur la peau, des bactéries qui en avaient été isolées, des interactions potentielles qui avaient pu être établies entre cellules humaines et bactériennes. C'est de ce travail fondamental qu'ont pu être tirées les bases méthodologiques nécessaires pour développer une approche métagénomique. Le manuscrit présente ces avancées, propose une première description du potentiel fonctionnel du microbiote et décrit les résultats d'une première application technologique qui pourrait inspirer l'industrie cosmétique pour développer des produits prenant en compte le potentiel fonctionnel exprimé par ce qui pourrait bien devenir le 3ème génome du corps humain.

Chapitre 1 : Synthèse bibliographique: La peau et son microbiote.

La peau, un organe du corps humain.

La peau est un des plus grands organes humains possédant une surface d'une taille moyenne allant de 1,5 à 2 m^2 chez une personne adulte [39]. Il est possible de lui attribuer le nom d'organe si l'on se réfère à sa définition, la peau étant une structure anatomique possédant des cellules différenciées organisées en tissus ayant une fonction déterminée, celle de contrôler les échanges entre le corps humain et l'environnement extérieur. De ce fait, la peau est l'interface entre le corps humain et le monde extérieur. Elle est un des premiers indicateurs de l'état de santé d'un individu, de son âge et révèle sa qualité de vie. Les soins cutanés ne sont pas l'apanage des temps modernes puisque, selon la légende, on s'y adonnait déjà du temps des premières civilisations comme le laissent supposer les bains au lait d'ânesse de la reine Cléopâtre, ces soins restant toujours hypothétiques quant à leur bienfaisance [40].

Les applications de produits cosmétiques sur la peau se sont largement développées, leur utilisation se combinant à une meilleure connaissance de l'anatomie et du fonctionnement de cet organe. Les études récentes concernant la peau, même si elles ont permis des avancées certaines en dermatologie avec des retombées en cosmétologie ont aussi permis de mettre en évidence les lacunes restant à combler pour en apprécier toute la complexité, l'implication de son état sur le reste de l'organisme, les relations entretenues avec le milieu extérieur et notamment avec les microorganismes qui colonisent plus que sa surface. La peau peut être sujette à des maladies de gravité variable comme le psoriasis, la dermatite atopique, l'acné aiguë et différentes formes de cancers. Comme d'autres organes elle peut être infectée par des microbes pathogènes (bactéries, champignons) et des virus. Les traitements vont alors relever de la médecine alors que ceux visant à atténuer les effets du temps sur des peaux saines ou réparer les dégradations cutanées localisées ou les formes les plus bénignes de l'acné entrent dans le registre de la cosmétologie.

Une des principales découvertes des dernières années concernant la peau est l'importance des interactions avec les microorganismes qui la colonisent naturellement depuis les tout premiers instants de la vie. En effet, de par son exposition au milieu extérieur, ses invaginations et les apports nutritifs liés aux secrétions cutanées, la peau

est un écosystème non seulement favorable à la survie des microorganismes mais aussi à leur développement, la multiplicité des conditions favorisant une importante diversité des germes. La prise en compte de la composante microbienne cutanée est donc essentielle pour assurer la santé et le bon fonctionnement de cet organe qui va interférer avec l'état général de l'être humain. Quel que soit le niveau d'intervention sur la peau, depuis les simples ablutions ou l'application de produits cosmétiques jusqu'aux traitements plus lourds relevant du domaine médical, l'impact sur la microflore cutanée, sur sa composition et sa dynamique, sur les fonctions réalisées par chacun des microbes devra être soigneusement considéré.

Cette synthèse bibliographique a pour objectif de passer en revue les principales connaissances concernant la composition physico-chimique de la peau humaine. Elle se focalisera toutefois rapidement sur le microbiote cutané, pour d'abord présenter les différentes approches technologiques qui ont permis d'arriver au niveau de connaissance actuel du microbiote tant au niveau taxonomique que fonctionnel. Nous présenterons dans un second temps les différents facteurs biotiques et abiotiques susceptibles d'entrainer un remodelage du microbiote. Mais cette synthèse permettra aussi d'identifier les différentes questions restant en suspens quant à l'activité de ces microorganismes dans le cadre de leurs interactions avec la peau. Nous verrons alors si les technologies actuelles pourront permettre de décrypter suffisamment en profondeur ces interactions pour apporter des réponses tant dans le domaine de la pathologie qu'en cosmétique.

Composition chimique et biologique

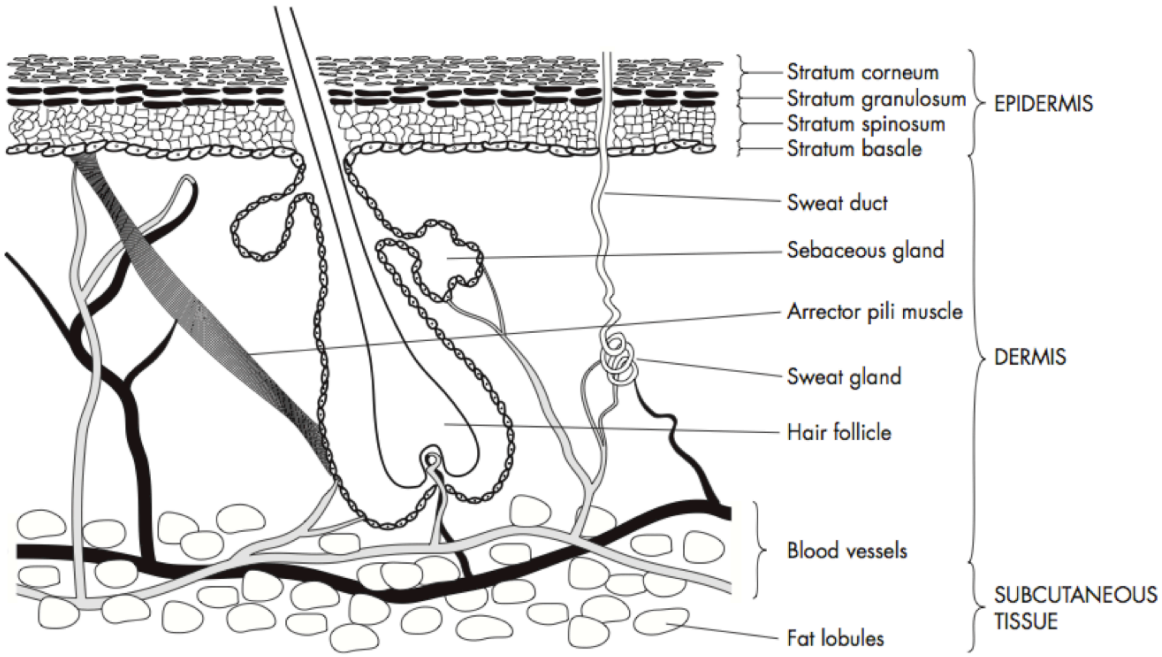


Figure 1 : Coupe schématique de la peau et répartition des différentes couches cellulaires cutanées.

Organisation cellulaire

La peau est organisée en plusieurs couches cellulaires (Figure 1). Elle est constituée de 3 parties, en commençant par les couches basales : l'hypoderme (subcutaneous tissue), le derme (dermis) et l'épiderme (epidermis) [41].

L'hypoderme n'est pas toujours considéré comme appartenant à la peau en tant que tel et contient des tissus conjonctifs formés en majeure partie d'adipocytes (ou cellules graisseuses) [42]. Cette couche permet de donner de l'élasticité à la peau et d'isoler thermiquement et physiquement le corps humain de l'environnement extérieur (protection contre les coups ou les chocs de température). Les adipocytes présents peuvent aussi servir de réserve énergétique [42]. Cette couche de cellules permet enfin de faire le lien entre la peau et les structures sous-jacentes.

Le derme est aussi constitué de tissus conjonctifs, des fibroblastes, qui participent à la synthèse des macromolécules comme le collagène. Certaines cellules de l'immunité (lymphocytes mastocytes et macrophages) sont également présentes [41]. Le derme joue un rôle nutritif à l'égard de l'épiderme en lui apportant via les réseaux sanguins les éléments nutritifs requis. Il permet aussi de contrôler la thermorégulation du corps humain et par le même phénomène de transpiration d'excréter des molécules toxiques

[43]. Cette partie de la peau contient la base des glandes et des follicules pileux, ces derniers remontant jusqu'à la surface en passant par l'épiderme (Figure 1).
L'épiderme est lui-même constitué de plusieurs couches de cellules distinctes: le stratum basale (ou germinatum), le stratum spinosum, le stratum granulosum, et le stratum corneum [43]. Les cellules qui les composent sont les kératinocytes, les mélanocytes, les cellules de langerhans et les cellules de Merkel.

Les kératinocytes sont présents dans toutes les couches de l'épiderme et sont les cellules majoritaires de l'épiderme [41]. Ils ont pour rôle d'assurer la cohésion du cytosquelette grâce à leur matrice extracellulaire et leurs systèmes de jonctions entre cellules (hémidesmosomes et desmosomes) [41]. Les jonctions serrées entre ces cellules assurent le rôle de protection physique contre l'environnement extérieur au niveau de la couche cornée (stratum corneum). Les kératinocytes se forment d'abord au niveau des couches basales (stratum basale) puis migrent vers la surfaces extérieure poussés par la formation des nouvelles cellules. Pendant ce processus les cellules se différencient, elles perdent peu à peu leur contenu cellulaire (noyau également) pour devenir des enveloppes vides quand elles arrivent au niveau du stratum corneum ; l'accumulation en surface de ces enveloppes joue un rôle de protection de l'organisme contre les agressions extérieures [44]. Des enzymes protéolytiques et lipolytiques sont excrétées entraînant une rupture des liens entre cellules, permettant la libération de celles-ci et évitant une accumulation de cellules mortes au niveau du stratum corneum [44]. Ce processus est appelé la desquamation. Il est estimé qu'environ 3 semaines sont nécessaires à une cellule pour migrer de la couche basale à la dernière couche de cellules du stratum corneum [45]. Les mélanocytes représentent la 2eme population cellulaire de l'épiderme et produisent de la mélanine dans les mélanosomes qui seront ensuite assimilés par les kératinocytes et permettront une protection contre les ultra-violets (UV) [44]. Des cellules du système immunitaire sont également présentes, les cellules de langerhans (faisant partie des cellules dendritiques), sont les cellules clés dans l'initiation et l'activation du système immunitaire et dont leur rôle est de capturer les antigènes présents dans l'épiderme. Enfin, les cellules de Merkel sont des cellules neuroépithéliales avec comme fonction la mécanoréception et donc un rôle dans le pouvoir sensoriel de la peau. D'autres cellules du système immunitaire sont présentes comme les lymphocytes T, les macrophages, les mastocytes [46].

Paramètres physico-chimiques

Comme énoncé plus tôt la peau est un des plus grands organes du corps humain. Il recouvre la totalité du corps humain et possède quelques spécificités selon les zones étudiées. La peau possède de nombreuses parties toutes différentes des unes des autres par leur composition chimique, l'exposition à la lumière ou à un frottement mécanique, l'épaisseur de l'épiderme, la présence et le nombre de glandes sudoripares et sébacées. L'acidité et la température sont des paramètres qui fluctuent selon les régions du corps, ces paramètres ont été souvent mesurés car il sont révélateurs de l'état de santé de la peau et sont également des paramètres importants qui influencent le développement de la flore microbienne cutanée [47] (Figure 2). La composition chimique de la peau est dépendante de nombreux facteurs propres à l'individu, de son mode de vie et de son environnement. Au sein même d'un individu la composition chimique de la peau varie également selon sa localisation. Si l'on considère la dernière couche de la peau, le stratum corneum, des estimations de sa composition chimique ont été effectuées. Les valeurs moyennes de sa composition sont : 75-80% de contenu protéique, 5-15% lipidiques et 5-10% de composés non identifiés [48], mais ces résultats sont variables en fonction du site de prélèvement. Le contenu protéique est majoritairement composé de kératines alpha et beta puis de protéines membranaires des enveloppes [49].

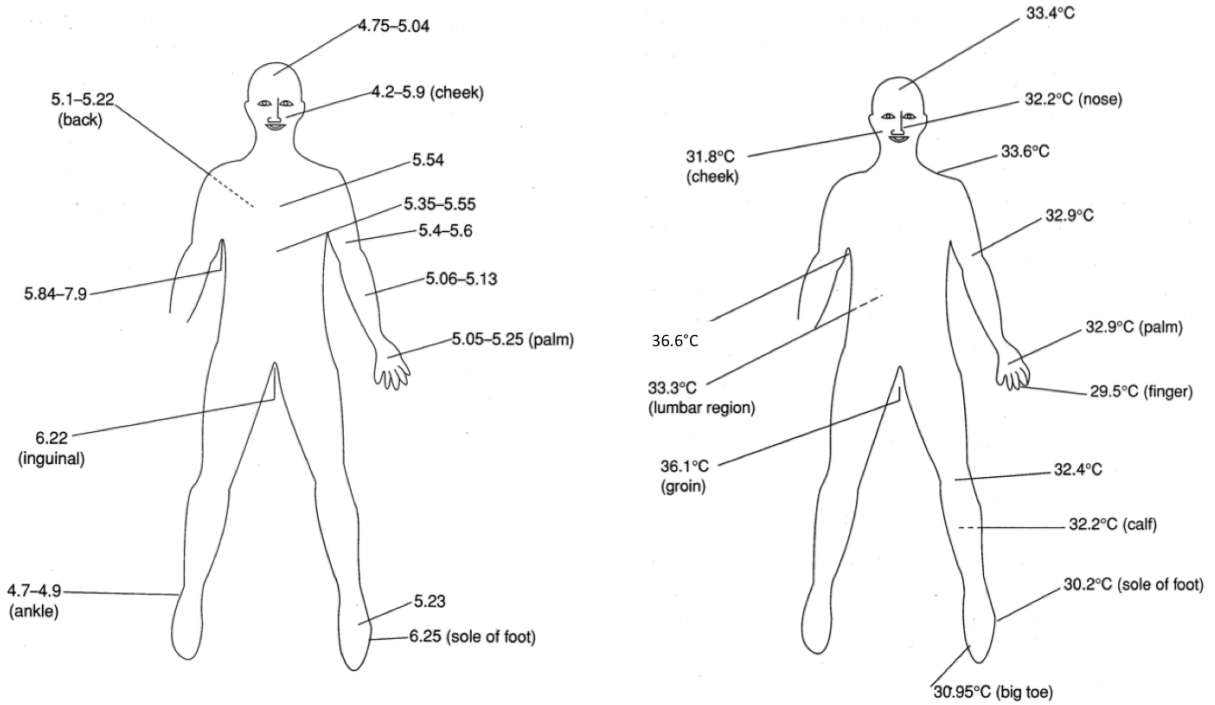


Figure 2 : Acidité et température selon les régions du corps humain (d'après Wilson *et al.* [47]).

Mais si chaque partie du corps est chimiquement unique, il est cependant possible de regrouper certaines zones. Ce regroupement est propre aux écologistes microbiens qui définissent ces zones sur la peau comme des environnements et observent une composition biologique similaire mais il n'est pas possible de retrouver ce regroupement dans les revues dermatologiques même si la lecture des articles nous montre bien une composition biologique et chimique plus ou moins spécifique à trois types de zones sur la peau.

Zones humides

Comme leur nom l'indique, les régions humides sont caractérisées par une forte teneur en eau. Cette humidité est provoquée par une sécrétion de sueur plus importante. La paume des mains, les pieds et les aisselles sont des régions concernées car de nombreuses glandes sudoripares sont présentes [50] et y sont très actives [51]. De plus la sueur dans ces zones n'est pas seulement due à la présence de glandes mais aussi à la perte d'eau transépidermale appelée perspiration permettant d'assurer la thermorégulation ainsi que l'homéostasie [52]. La sueur est donc présente sur toutes les parties du corps même celles pauvres en glandes sudoripares. La composition de la sueur varie selon la personne, son âge ou ses habitudes, néanmoins certains composants

principaux peuvent être généralisés pour entrer dans la composition intrinsèque (Tableau 1) [47]. Globalement, l'urée, l'ammoniac et l'acide lactique sont les composants le plus souvent associés à la sueur. Il est également possible de trouver en quantité moindre certains éléments toxiques tels que des métaux lourds qui sont excrétés via le processus de transpiration [53].

Tableau 1 : Composés détectés dans la sueur humaine (d'après Wilson *et al.* [47]).

Substances présentes dans la sueur humaine				
>99 µg/ml	10-99 µg/ml	1-9,9 µg/ml	0,1-0,99 µg/ml	< 0,1 µg/ml
urée	glucose	acide utique	bromide	iodine
protéines	acide pyruvique	créatinine	fluoride	magnésium
acide lactique	acide urocanique	potassium	calcium	manganèse
sérine	ammonia	sodium	iron	cadmium
ornithine	sulphate	cuivre	zinc	plomb
glycine	phosphate	acides aminés	cystine	nickel
	chloride			actylcholine
	acides aminés			vitamines

Zones sébacées

Les zones sébacées sont des zones du corps qui sécrètent beaucoup de substances lipidiques, de par la présence de glandes sébacées. Ces dernières produisent du sébum, une substance composée de différents lipides tel que des triglycérides, des acides gras, des esters de cholestérol, des squalènes… [54]. Les joues, le front, le dos ou la poitrine sont des régions où la présence de ces composés a été relevée en grande quantité par rapport aux autres parties du corps [55]. Le rôle des composés lipidiques sur la peau n'est pas complètement éclairci il est généralement admis qu'ils ont un rôle dans l'élasticité de la peau ainsi que dans la protection anti microbienne [54].

Zones sèches

Les zones sèches sont des zones qui contiennent en faible quantité les glandes sudoripares et les glandes sébacées. Elles sont qualifiées de « sèches » en comparaison avec les deux autres types de zones de peaux mais possèdent néanmoins une certaine teneur en eau du fait de la perspiration et d'une présence faible de glandes sudoripares [51].

Barrière physique

La peau est l'organe permettant/limitant les échanges entre les cellules et le monde extérieur. Ces échanges sont dépendants de l'épaisseur du stratum corneum. Cette couche isolante permet d'éviter une dessiccation du corps humain, elle assure également une protection des agressions extérieures en empêchant à tout agent biologique, chimique d'entrer en contact avec des cellules vivantes et de potentiellement les altérer [56]. De plus cette couche permet d'éviter que les chocs physiques abîment les organes, réseaux capillaires *etc*.. Cette barrière physique est constituée de 3-4 couches cellulaires de kératinocytes complètement vidés de leur contenu cellulaire aussi appelés cornéocytes à ce stade de leur maturation. En effet pendant le processus de différentiation il y a énucléation et perte du contenu cellulaire, celui-ci étant remplacé par un cytosquelette protéiné [56]. Cette couche de protection est donc biologiquement morte car les cellules sont incapables de se reproduire et aucune activité enzymatique n'y est présente. Les enzymes sécrétées afin de desquamer sont produites par les cellules des couches inférieures encore actives.

Cette paroi de cellules mortes n'est toutefois pas suffisante pour protéger la peau contre d'éventuels agents extérieurs et la présence des cellules de l'immunité joue un rôle très important dans la protection du corps humain.

Barrière immunologique

Le rôle d'immunosurveillance de la peau est primordial pour le maintien de l'intégrité du corps humain et permet d'apporter une réponse adéquate à l'agression subie. Beaucoup de cellules immunitaires sont présentes dans les différentes couches de la peau. Le système est relativement complexe et est encore très étudié dans certaines affections pathologiques. L'épiderme contient comme type de cellules de l'immunité les cellules de Langerhans et des lymphocytes T quand il y a réponse inflammatoire. Le derme, quant à lui, contient une plus grande variété de cellules immunitaires comprenant des cellules dendritiques, des lymphocytes T, les macrophages, les mastocytes ainsi que les populations granuleuses (Figure 3) [57].

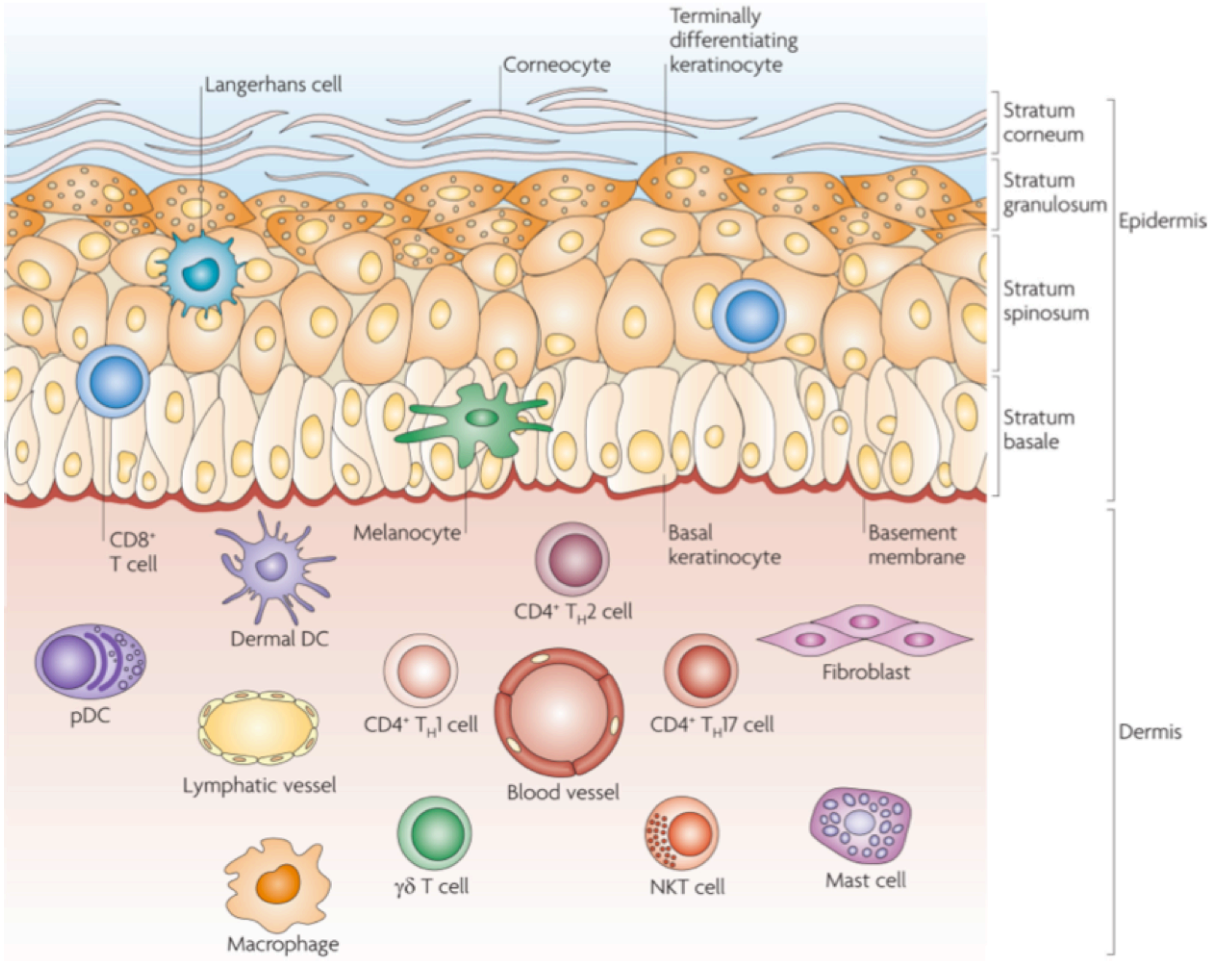


Figure 3 : Schéma d'une coupe longitudinale de peau et des cellules de l'immunité présentes (d'après Nestle *et al.* [57]).

Dans l'épiderme, les premières cellules à avoir un rôle dans la réponse immunitaire sont les kératinocytes, avec comme fonction première un rôle de sentinelle grâce à certaines structures membranaires, les récepteurs Toll like, qui leurs permettent de reconnaître les antigènes (comme les lipopolysaccharides LPS, le peptidoglycane, la flagelline ou encore les acides nucléiques [58]), et aussi grâce à d'autres protéines permettant de reconnaître les agents irritants ou toxines d'origine non microbienne [59]. Ces récepteurs, une fois l'antigène reconnu, entraînent les différentes cascades d'activation du système immunitaire et permettent d'obtenir la réponse inflammatoire.

Une autre réponse inflammatoire engendrée par les kératinocytes est la production de β-défensines et de cathelicidines, des protéines antimicrobiennes (AMP). Ces molécules empêchent les invasions microbiennes soit en tuant directement les agents pathogènes, ou en recrutant les cellules de l'immunité et en modulant la production de cytokines [60].

De plus les kératinocytes synthétisent une partie des protéines de l'immunité (*ie.* nombreuses cytokines et tumor necrosis factor TNF) [61] et sont capables d'exprimer le complexe majeur d'histocompatibilité de classe II, ce qui permet de présenter les antigènes aux lymphocytes T afin de les activer et de les différencier [62].

Avec la production d'AMP et de cytokines ainsi que leur capacité à présenter les antigènes, les kératinocytes participent activement à la réponse immunitaire innée et acquise. La figure 4 résume les différents participants à la réponse immunitaire et détaille certaines cascades d'activation au sein d'un kératinocyte.

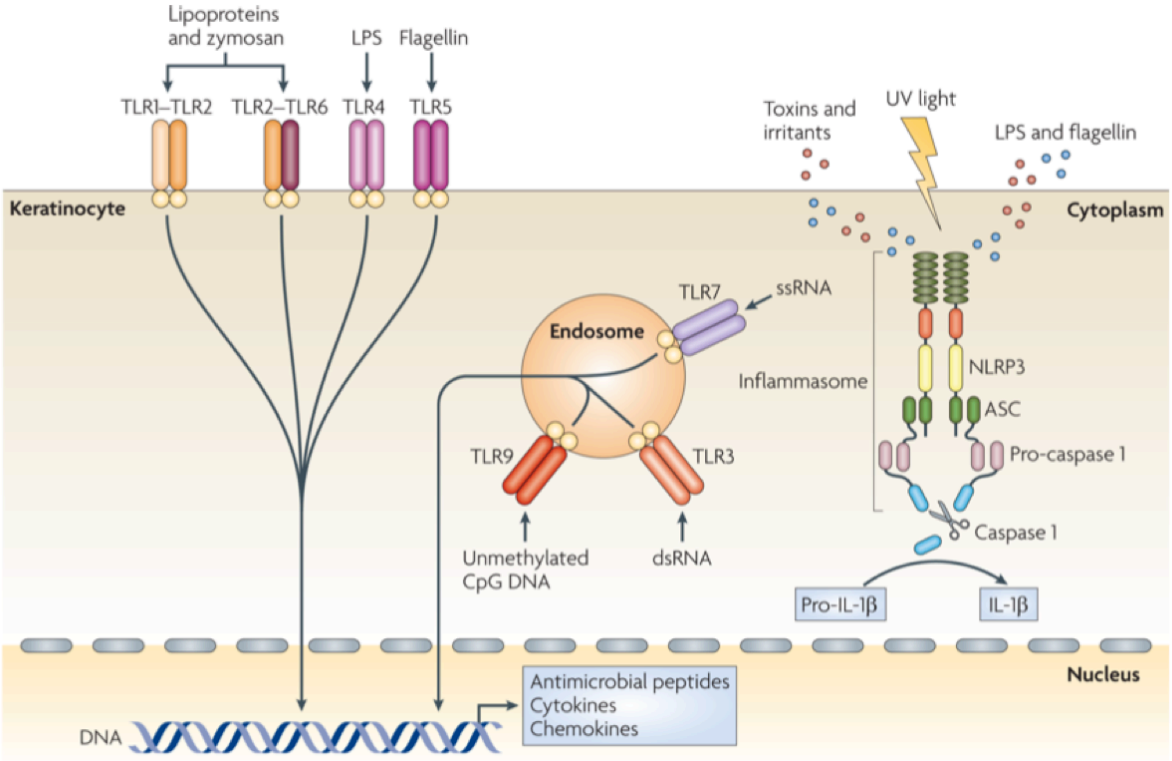


Figure 4 : Schéma de la participation des kératinocytes à la réponse immunitaire (d'après Nestle *et al.* [57]).

La première population de cellules strictement liées à l'immunité dans l'épiderme est celle des cellules de Langerhans. Ce sont des cellules dendritiques (CD) présentatrices « professionnelles » d'antigènes, *a contrario* avec les cellules macrophages dont leur fonction première est de phagocyter et ensuite, potentiellement, de présenter les antigènes.

Enfin, différents lymphocytes T sont présents au sein de l'épiderme et remplissent leur fonction classique de reconnaissance-destruction ou de différentiation [63]. Dans le derme, il existe aussi des CD qui appartiennent à un groupe plus large que les cellules de

Langerhans avec plus de diversité dans les types de cellules et dans leur contenu [64]. Il existe certaines différences entre les CD du derme et de l'épiderme. Même si leur fonction est commune, les cellules sont adaptées à différents types d'agressions ou différents types de réponses. Par exemple les CD du derme ont été reconnues pour être plus impliquées dans la réaction d'hypersensibilité [65]. Différents lymphocytes T sont également présents dans le derme comme dans l'épiderme.

La peau, un environnement microbien

La peau est à la fois un organe du corps humain et un environnement où les microorganismes peuvent se développer et jouer un rôle positif ou négatif sur l'état de santé de l'individu hôte.

Apport des approches culturales pour la mise en évidence du microbiote de la peau

Les premières découvertes sur le monde microbien cutané ont été le résultat de l'isolement de microorganismes provenant de tissus malades, ignorant alors si ces microorganismes étaient la cause ou la conséquence de la pathologie ou prévalaient à l'installation de la maladie. C'est par microscopie que l'on confirma également la présence des microorganismes partout sur l'épiderme. Dépendant des sites étudiés de la peau, entre 10^2 et 10^7 cellules bactériennes par cm^2 ont été dénombrées [66]. La répartition des microorganismes sur la peau est encore putative mais devrait ressembler à ce qui est reproduit figure 5, ce qui signifie que plusieurs stratégies d'échantillonnage sont possibles, en échantillonnant plus ou moins profondément dans l'épiderme. Cette spécificité pourra être contraignante quant au design expérimental, car il est possible que la diversité microbienne soit différente selon la profondeur étudiée dans l'épiderme. Les approches culturales ont permis de mettre en évidence que la peau était colonisée par de nombreux microorganismes mais ont cependant présenté une limite liée à l'incapacité d'une partie des germes de se développer dans les conditions standard de laboratoire. Ceci tient au fait que les caractéristiques physiologiques varient fortement au sein du monde microbien (sensibilité à l'oxygène, sources de carbone utilisables), et que le développement *in vitro* de ces germes nécessite des conditions de culture extrêmement diversifiées. Ces difficultés liées à l'isolement ont longtemps été la cause d'un inventaire taxonomique très incomplet (imparfait) du microbiote de la peau.

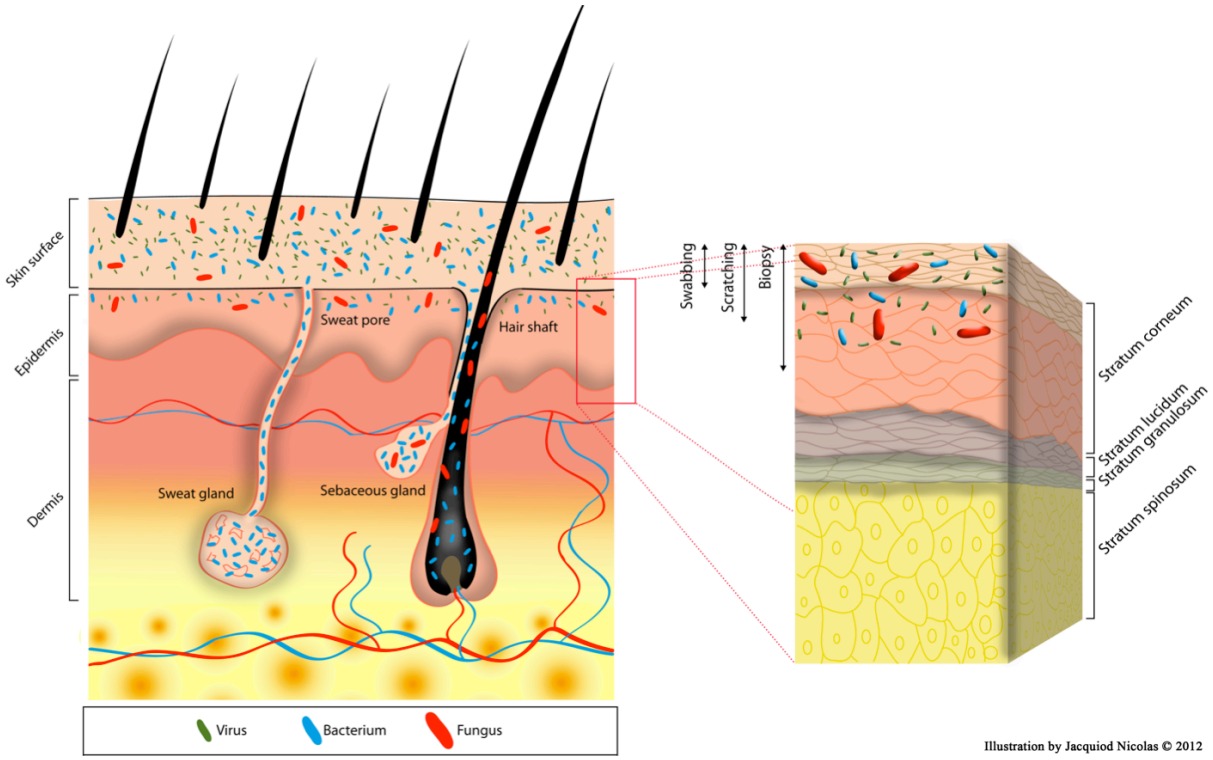


Figure 5 : Coupe schématique de peau et la distribution des microorganismes dans leur microbiome.
Puis à droite zoom sur les couches de l'épiderme et la profondeur d'échantillonnage des différentes techniques d'échantillonnage du microbiote cutané (d'après Mathieu *et al.* [67]).

C'est ainsi que seulement une trentaine d'espèces microbiennes résidentes de la peau humaine ont été recensées par Chiller *et al.* [68], ne représentant selon des estimations que de 10 à 50% de la diversité totale du microbiote de la peau [69]. Cette faible proportion s'explique par les caractéristiques physiologiques des microorganismes qui limitent la possibilité d'isolement, et cette contrainte est poussée à son paroxysme dans des environnements plus complexes tels que le sol, où moins de 1% de la diversité microbienne est cultivée. Ces travaux confirment la faible efficacité de l'approche pasteurienne dans l'inventoriage de la diversité microbienne dans différents types d'environnements [23]. C'est toutefois l'approche culturale qui a permis de poser toutes les bases de la microbiologie, le développement d'une colonie à partir d'une seule cellule initiale permettant de développer études physiologiques, génétiques et écologiques sur ces bactéries isolables. Il devient possible d'identifier les traits métaboliques et les facteurs de croissance nécessaires à ce microorganisme (source de carbone, utilisation de l'oxygène, résistance à des molécules toxiques…) et de caractériser les facteurs d'adaptation de la cellule à son environnement. Considérant l'environnement « peau »,

des hypothèses ont pu être émises sur les relations entre la cellule bactérienne et son hôte (Figure 6), par exemple dans certains cas de pathologies cutanées. L'approche culturale a permis de démontrer l'implication de la bactérie *Propionibacterium acnes* dans la pathologie de l'acné même si cette seule approche ne permet pas de faire la démonstration entière de la causalité [70]. Inversement, le rôle protecteur de la bactérie commensale de la peau *Staphylococcus epidermidis* qui produit des composés modulant la production de peptides antimicrobiens chez l'hôte a pu être ainsi démontré grâce à la possibilité d'isoler ces organismes sur des milieux de culture et d'en étudier les différentes propriétés [71].

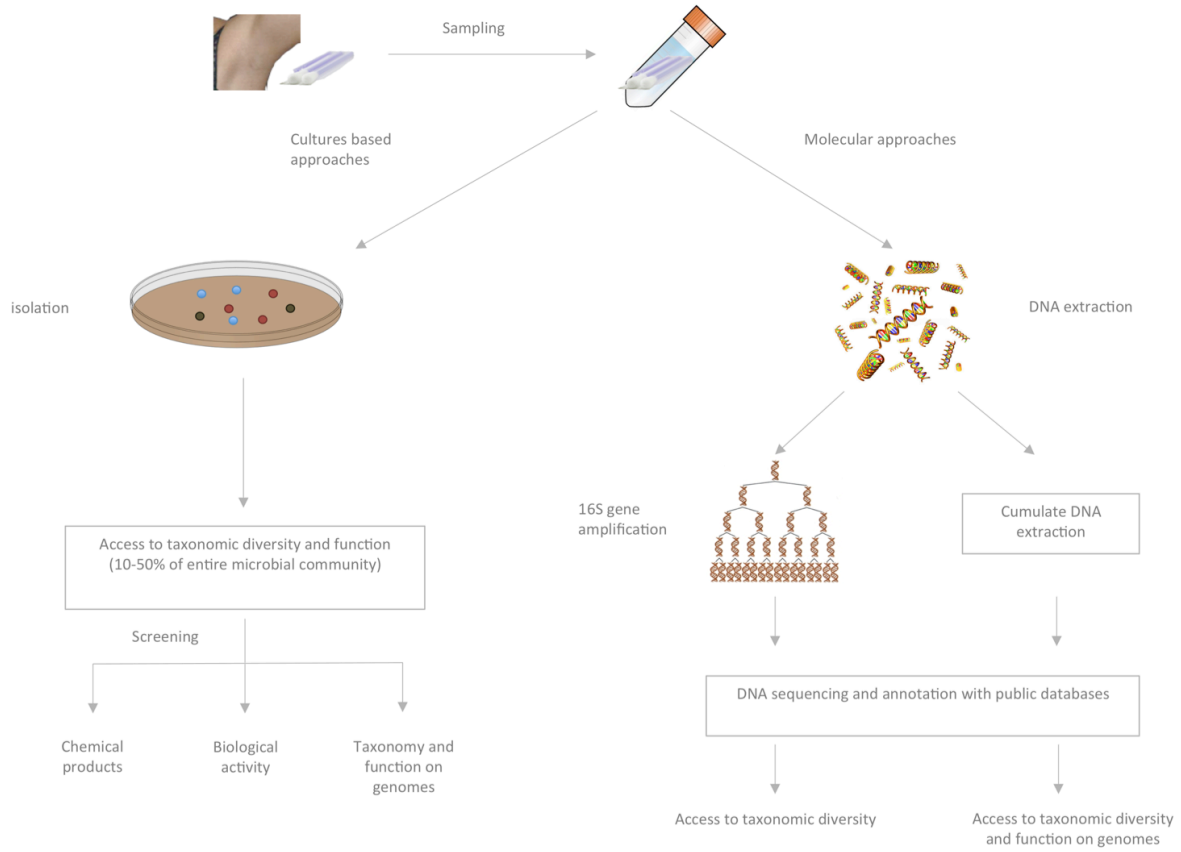


Figure 6 : Les différentes techniques d'étude de la diversité microbienne et leurs potentielles conclusions.
Description des approches basées sur l'ADN ou sur la culture et leurs avantages/inconvénients quant à la description du microbiote cutané (Mathieu *et al.* [67]).

Cependant, ces avancées sur la fraction des seuls organismes isolés ne peuvent faire oublier la nécessité de considérer la totalité de la communauté et l'objectif de compréhension des interactions du microbiote avec son hôte n'autorise pas à se limiter à la seule approche culturale. Seule la prise en compte des relations complexes entre les

multiples microorganismes et de leurs activités enzymatiques, des métabolites secondaires qu'ils produisent - lesquels vont conditionner les relations d'association ou au contraire d'exclusion - serait en mesure de fournir les données permettant de comprendre le déclenchement de pathologies ou au contraire le maintien de l'équilibre de la peau de l'être humain. S'il est maintenant totalement admis que la présence et l'activité microbienne ont un impact sur la peau et son état de santé [72], le décryptage précis tant taxonomique que fonctionnel du microbiote nécessite des études approfondies conduites avec des technologies complémentaires de l'approche culturale.

Apport des approches basées sur l'extraction et l'exploitation de l'ADN bactérien directement extrait de la peau

L'inventaire taxonomique du microbiote cutané a été considérablement amélioré grâce à l'arrivée des nouvelles approches basées sur l'amplification et le séquençage de l'ADN directement extrait des bactéries collectées sur la peau (le métagénome) [27]. La métagénomique a révolutionné la microbiologie dans de nombreux environnements où la plupart des bactéries étaient récalcitrantes à la mise en culture. Les approches métagénomiques ne sont pas confrontées aux mêmes limitations que la mise en culture, leur défi étant lié à l'efficacité de l'extraction de l'ADN de la plus grande partie des cellules microbiennes et à son exploitation.

D'une définition initialement restreinte à la construction et au criblage de librairies de clones plasmidiques, fosmidiques ou BAC constitués d'inserts provenant de l'ADN environnemental [73] la métagénomique intègre maintenant les différentes applications analytiques qui peuvent être faites de l'ADN extrait incluant PCR, puces à ADN, clonage, séquençage.. [74].

Les difficultés spécifiques du développement de l'approche métagénomique au microbiote de la peau sont liées à la relative faible densité de cellules en comparaison à d'autres environnements et conséquemment à une quantité d'ADN bactérien extraite limitée, problème d'autant plus délicat qu'une contamination avec de l'ADN issu des cellules de l'hôte ne peut être exclue. Cette difficulté a joué en faveur d'une application des technologies basées sur l'amplification de l'ADN par réaction en chaine médiée par une enzyme polymérase thermorésistante (Polymerase chain reaction, PCR). Appliquée

au gène ribosomal *rrs* (aussi appelé *16S* gène) dont les produits sont ensuite séquencés, cette approche a permis des avancées spectaculaires dans le décryptage de la diversité taxonomique du microbiote de la peau humaine [75]. En effet, la technique PCR permet d'amplifier les régions variables de quasiment toutes les bactéries, l'ADN cible étant amplifié grâce à des amorces dites « universelles » ciblées dans les régions conservées de ce gène ubiquiste. Le séquençage du mélange des produits PCR générés permet de caractériser taxonomiquement l'échantillon, par comparaison des séquences obtenues avec celles des gènes ribosomaux *rrs* présents dans les bases de données.

Cette approche a permis d'accroître considérablement l'inventaire des espèces bactériennes présentes au niveau de la peau, de différencier les individus, mais aussi les différents sites sur le corps humain, et d'observer les variations taxonomiques que subissent ces différents microbiotes au cours du temps ou suite à l'action de traitements chimiques ou physiques. Tous sites confondus, ce sont approximativement 200 phylotypes (rang taxonomique proche du concept d'espèce microbienne résultant de l'approche de séquençage de l'ADN ribosomal *rrs*, où un phylotype est défini par une similarité de 97% de l'ADN séquencé) qui ont été identifiés sur la peau humaine, avec un certain niveau de spécificité taxonomique pour chaque partie du corps, les différences entre sites sur un même individu étant supérieures à celles observées entre individus [76,77]. D'autre part, des sites sur le corps humain qui présentent des caractéristiques physico-chimiques comparables, de type sec, humide ou sébacé se regroupent également de par la composition taxonomique de leur microbiote (Figure 7).

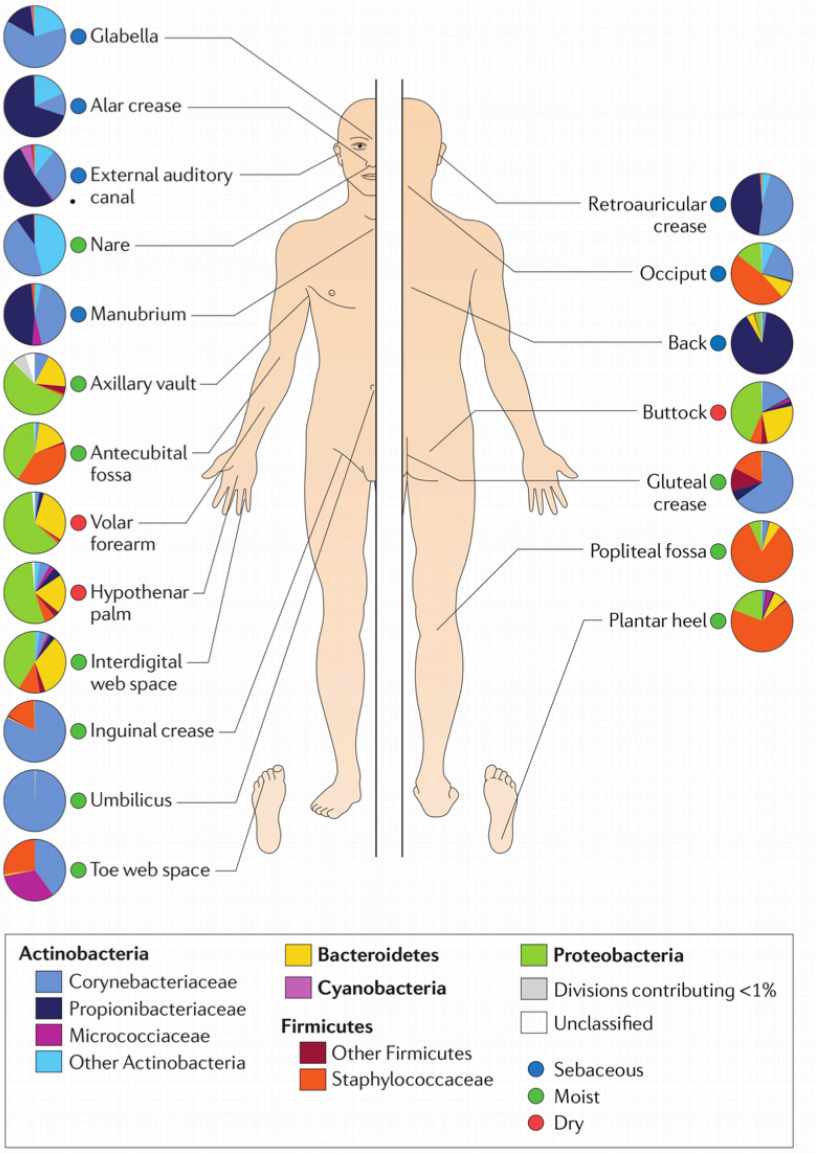


Figure 7 : Distribution topographique du microbiote de la peau selon les régions du corps (d'après Grice *et al* [45]).
La classification des organismes est au niveau taxonomique famille pour les couleurs et en gras au-dessus sont les différents phyla. Les régions de la peau sont groupées selon leur caractéristique physique telle que sébacé (cercles bleus), humide (cercles verts) et sec (cercles rouge).

Les environnements sébacés sont caractérisés par la prédominance du phylum *Propionibacterium*, un niveau de diversité faible et peu de variation entre individus [76]. Les environnements humides sont généralement dominés par les genres *Corynebacterium* et *Staphylococcus* avec un niveau de diversité plus important que les régions sébacées, mais plus faible que les régions sèches. Les régions sèches sont caractérisées par une certaine prédominance de Beta-proteobactéries [76]. Bien que ces sites secs présentent une fluctuation importante de la diversité bactérienne, la

proportion importante de bactéries à coloration de Gram négative est une caractéristique commune à ces environnements [45].

Sans remettre en cause l'apport considérable de l'approche de séquençage d'amplicons du gène *rrs* à partir d'ADN métagénomique, il convient d'en présenter également les limites et les conséquences sur l'inventoriage taxonomique du microbiote de la peau. Il est communément admis aujourd'hui une sous-estimation de la diversité liée à l'amplification non exhaustive de tous les gènes *rrs* résultant des différences de séquences dans les régions conservées de ce gène pour certains taxa non encore décrits et limitant son amplification [78] . Des différences d'efficacité d'amplification entre les matrices d'ADN pourtant pourvues des séquences complémentaires aux amorces vont également biaiser tant l'analyse qualitative (identification des différents taxa présents) que quantitative (respect des proportions entre taxa) [79].

Inventaire des différents types d'organismes présents à la surface de la peau humaine

Les bactéries ne sont pas les seuls organismes à avoir colonisé la peau puisque différents organismes eucaryotes composent également la microflore cutanée. Les acariens du genre *Dermatophagoides* sont parmi les plus connus, de par la réaction allergique que peuvent provoquer certaines de leurs protéines [80]. Les champignons sont également détectés en nombre sur la peau, le genre *Malassezia* y étant fréquemment décrit et occasionnellement associé aux symptômes de la pathologie psoriasis [81]. Pour d'autres organismes l'arrivée des nouvelles technologies de séquençage de l'ADN a également été bénéfique puisqu'il a été possible de démontrer la présence d'Archaea au sein du microbiote cutané et d'en caractériser la diversité [82]. Les virus y sont également présents et, quoique détectés grâce à l'utilisation controversée de l'amplification MDA (Multiple Displacement Amplification), selon un niveau significatif de diversité [83].

Acquisition, développement et impacts du microbiote cutané

Origine et développement de la flore microbienne cutanée.

La découverte de la diversité taxonomique du microbiote cutané a permis de mieux comprendre comment cette communauté a pu s'installer et se structurer dans son environnement. Les premières bactéries colonisant la peau sont acquises au moment de la naissance. Les bactéries que reçoit l'enfant proviennent des communautés microbiennes commensales de sa mère. Il a d'ailleurs été démontré que le type de délivrance impacte la communauté obtenue. Par voie génitale, l'enfant aura une communauté similaire au microbiote vaginal de la mère alors que par césarienne l'enfant aura une communauté similaire au microbiote cutané [84]. Après 1 mois, les profils des communautés cutanées se modifient régulièrement. Graduellement et jusqu'à la première année, se mettent en place qualitativement et quantitativement les spécificités taxonomiques des différents sites différenciés sur le corps humain [85]. Malheureusement, les données de la littérature ne présentent aucune information sur les évolutions susceptibles de se réaliser pendant l'enfance, l'adolescence et jusqu'au stade adulte. Même si l'on peut envisager que la stabilisation doive intervenir à l'adolescence, les modifications ultérieures étant plus mineures, ceci reste à démontrer expérimentalement.

Chez l'adulte, une fois la communauté installée, des différences taxonomiques du microbiote entre individus ont été détectées, plus ou moins marquées selon les sites étudiés. Dans la limite des techniques actuelles, les différences entre individus sont très marquées sur les sites secs et humides, le « core » microbiote dans ces régions étant alors relativement faible alors que les environnements sébacés présentent une plus grande constance de leur microbiote. Seulement 6,6% des 91 genres détectés sur l'avant-bras sont ubiquistes et systématiquement détectés sur les 6 individus étudiés [69]. La communauté microbienne de la paume de la main est tellement spécifique de chaque individu hôte qu'il a été proposé de l'utiliser comme outil d'identification médico-légal. Le microbiote détecté sur la souris d'un ordinateur permis d'en identifier le propriétaire parmi 270 individus [86].

Facteurs de structuration du microbiote cutané

Comprendre la hiérarchie des facteurs influant sur la structuration du microbiote de la peau pourra permettre d'en modifier taxonomiquement et fonctionnellement la composition. Comme il l'a été précisé plus haut, le premier microbiote cutané du nouveau-né est directement conditionné par les communautés microbiennes vaginales ou cutanées de la mère selon le type d'accouchement. Par la suite, celui-ci va évoluer selon les contraintes intrinsèques à l'individu hôte et à son environnement.

Des travaux réalisés sur la souris montrent l'implication du système immunitaire sur la structuration du microbiote, en l'occurrence, le microbiote intestinal. Les différentes immunoglobulines codées par les gènes du complexe majeur d'histocompatibilité sélectionnent des microbiotes spécifiques comme l'a montré l'analyse des communautés de fèces de deux lots souris exprimant différentiellement les gènes CMH de classe I et II [87,88]. Le système immunitaire de l'hôte est donc un des premiers facteurs dont l'impact sur la structure de la communauté microbienne cutanée a été pressenti. La présence chez les kératinocytes de complexes protéiques capables de reconnaître les motifs protéiques microbiens et leur production de peptides antimicrobiens leur confère un rôle certain sur la sélection des microorganismes de la peau. Le contact prolongé des antigènes des bactéries commensales induirait comme une tolérance immunitaire n'enclenchant pas de réaction inflammatoire, comme c'est le cas lors de la rencontre avec un agent pathogène.

Mais d'autres facteurs interviennent sans qu'il soit possible parfois d'en isoler un principal. Il n'a ainsi pas été possible de déterminer si la spécificité taxonomique très marquée du microbiote cutané des populations amérindiennes en comparaison des autres groupes ethniques aux Etats-Unis est due à l'origine ethnique, aux habitudes de vie ou à la localisation géographique [89]. L'analyse du microbiote de la paume de la main a montré un impact lié au sexe, à la préférence manuelle gauche ou droite et aux pratiques hygiéniques. Plus précisément une plus grande diversité taxonomique bactérienne a été détectée dans les mains des femmes par rapport aux hommes mais les travaux manquent de profondeur pour séparer l'influence du facteur « sexe » de celui des « pratiques hygiéniques » [90]. Plus aboutie, une étude a montré l'effet positif du maquillage sur le niveau de diversité du microbiote des différentes régions traitées [91] et

un autre travail a montré la transmission de germes entre individus lors d'un sport de contact comme le roller derby [92]. Toutefois, les mesures éthiques à respecter lorsque l'être humain devient le sujet des expérimentations, tout à fait légitimes, ont ralenti la progression des travaux sur le décryptage du microbiote cutané et sur les facteurs tant de l'hôte que de l'environnement, qui le structurent. Ce n'est qu'à travers de nouvelles études inspirées des travaux d'épidémiologie que des progrès conséquents pourront être réalisés permettant de hiérarchiser les facteurs structurant taxonomiquement et fonctionnellement le microbiote cutané.

Influence (potentielle) du microbiote sur l'état de santé de la peau

Le microbiote de la peau, de par sa présence assure déjà une certaine protection en occupant une niche écologique qui sans cela serait colonisée par d'autres microorganismes potentiellement pathogènes. A ce rôle de barrière s'en ajoute un second, plus directement actif et lié à la capacité de certaines souches de produire des composés antimicrobiens, notamment des peptides, qui vont limiter la colonisation des tissus de l'épiderme par des souches sensibles [93]. Un autre niveau concerne les conséquences potentielles pour la peau, sa santé et son apparence, de la présence du microbiote et de ses interactions avec son hôte, quand à l'inverse le rôle de l'hôte dans la structuration de la communauté microbienne est parfaitement reconnu. Pour des environnements comme les sols ou les sédiments, l'implication des microorganismes dans le modelage physico-chimique de leur milieu est démontrée justifiant toute interrogation sur le corps humain même si, dans le cas des peaux en bonne santé, l'effet potentiel du microbiote, bénéfique ou non, ne puisse que difficilement être établi. C'est donc sur des peaux pathologiques qu'ont été recherchées les liens entre microorganismes et déclenchement de la maladie. Même si aucun agent pathogène spécifique ne remplit à ce jour toutes les contraintes du postulat de Koch, qui en ferait l'unique et seule cause d'une des pathologies majeures de la peau, différents travaux montrent l'implication et l'influence de germes du microbiote cutané sur la sévérité des symptômes. La bactérie commensale *Propionibacterium acnes* a régulièrement été associée à l'acné, la sécrétion de protéines spécifiques contribuant à la lésion des tissus [70]. Mais la seule inoculation de cette bactérie sur une peau saine est insuffisante pour

déclencher des symptômes d'acné, réfutant ainsi le rôle d'agent causal au profit de celui de pathogène opportuniste contribuant à la sévérité des symptômes.

En revanche, aucun agent microbien n'émerge des travaux conduits sur les peaux de type psoriatique ou dermatite atopique pour en faire un ou des candidats seuls responsables de ces pathologies. Ceci pourrait conduire à exclure toute implication microbienne si l'antibiothérapie n'avait pas montré une certaine efficacité à en réduire les symptômes [94,95]. Ce n'est pas de la démonstration par séquençage du gène *rrs* d'une composition taxonomique différente des microbiotes des peaux saines et atteintes de symptômes que pourra s'éclaircir la situation concernant l'implication microbienne. L'accroissement des représentants appartenant au phylum des *Firmicutes* en parallèle avec une proportion moindre d'*Actinobacteria* dans les lésions psoriatiques [96] ou la prédominance des bactéries du genre *Staphylococcus* sur les peaux à dermatite atopique[97] ne suffisent à en déduire leur implication même si à une baisse de sévérité des symptômes suite aux traitements se superpose une structure du microbiote tendant à se rapprocher de celle de la peau saine[97]. Ces différentes données montrent la difficulté à différencier entre cause et conséquence le lien qu'entretiennent les bactéries avec la peau et ses différentes pathologies. Elles montrent aussi les limites d'une étude du microbiote cutané restreinte à la seule information taxonomique quand ce sont les fonctions exercées par ces microorganismes qui vont déterminer leur potentiel de colonisation, d'implantation à long terme et les interactions de bénéfiques à délétères qu'ils vont établir avec leur hôte. C'est par une étude fonctionnelle, comme celle qui a permis par exemple d'établir l'implication de *Staphylococcus epidermis* dans la modulation de la réponse immunitaire cutanée [71] que pourra être appréhendé le rôle du microbiote cutané. C'est cependant à l'échelle du microbiote complet que doit s'adresser cette étude et non pas restreinte à certains représentants cultivés *in vitro*. Cette condition implique d'appliquer au niveau fonctionnel le même changement d'échelle qui a été réalisé au niveau taxonomique avec le séquençage des produits PCR du gène *rrs* amplifié à partir de l'ADN métagénomique. La métagénomique fonctionnelle est un des moyens de relever un tel défi.

Décryptage fonctionnel du microbiote

Métagénomique fonctionnelle du microbiote intestinal humain

L'approche métagénomique basée sur l'extraction de l'ADN génomique des microorganismes colonisant un écosystème possède un potentiel analytique qui va bien au-delà du simple inventaire taxonomique basé sur l'amplification PCR et le séquençage d'un gène marqueur phylogénétique. Par le séquençage direct de l'ADN métagénomique sans aucune étape d'amplification PCR et l'analyse bioinformatique de la masse de données générées, ce sont les fonctions et activités potentiellement exprimées *in situ* par les microorganismes qui peuvent être détectées, identifiées et quantifiées, pouvant conduire à une meilleure compréhension des mécanismes adaptatifs et évolutifs, et des interactions entre microorganismes. L'approche de métagénomique fonctionnelle a été appliquée à de nombreux écosystèmes [98] dont plusieurs concernant directement l'être humain et notamment le microbiote intestinal, tout particulièrement dans le cadre de deux projets internationaux de grande envergure, MetaHIT et HMP [33,99].

Ces travaux sur le microbiote intestinal ont déjà abouti à des résultats probants comme ceux montrant une implication bactérienne dans l'obésité, dont la sévérité des symptômes était liée à certaines fonctions exprimées par des populations du microbiote [34] alors que cette pathologie était initialement perçue comme résultant des seuls facteurs environnementaux et des prédispositions génétiques. Il ne fait plus de doute aujourd'hui qu'un bon fonctionnement du tube digestif et plus généralement que la santé des individus dépendaient des fonctions codées par les gènes des bactéries du microbiote intestinal [100]. Ces conclusions ont été tirées de résultats montrant des différences d'abondances relatives de gènes d'intérêts sous différentes situations, l'approche statistique permettant de corréler prévalences de gènes et états sanitaires, de celui de santé aux différents états pathologiques. Par exemple Jones *et al.* ont déterminé le niveau de prévalence des gènes bactériens codant les enzymes Bile salt hydrolases (BSHs). L'implication des BSHs dans le fonctionnement du tube digestif a été montrée [101] comme un de ces indicateurs de l'état sanitaire, tout comme des enzymes ou bien des voies biochimiques potentiellement impliquées dans la dérégulation de la réponse immunitaire le sont avec la maladie de Crohn [102]. C'est cependant par une approche

(méta)transcriptomique et (méta)protéomique que l'implication de ces microorganismes et de leurs fonctions précises pourra être définitivement établie, les corrélations entre prévalence des gènes et présence/absence de symptômes n'étant que la première étape d'une approche sans *a priori* qui permet de suggérer des voies enzymatiques bactériennes candidates à une interaction directe avec l'hôte.

Applications de la métagénomique fonctionnelle au microbiote cutané

Il apparait donc évident que l'application à l'écosystème peau humaine de l'approche métagénomique fonctionnelle soit fondamentale pour la compréhension du fonctionnement du microbiote de la peau et de ses interactions avec son environnement. Le décryptage des voies biochimiques bactériennes potentiellement exprimées *in situ* devrait permettre d'émettre des hypothèses sur les mécanismes d'interactions entre le microbiote et son hôte, pour expliciter les adaptations bactériennes aux différents sites de la peau, les spécificités du microbiote de chaque individu, l'influence combinée des facteurs génétiques et environnementaux (modes de vie, hygiène etc.). Mais cette approche aura également un rôle fondamental pour identifier les fonctions, quel que soit l'hôte microbien susceptible de les héberger et les exprimer, qui vont influer sur l'état de santé de la peau avec des retombées majeures en thérapeutique et pour l'industrie cosmétique. Ce pourrait être alors non plus des microorganismes mais les gènes codant des fonctions enzymatiques spécifiques qui constitueraient les biomarqueurs d'un état pathologique de la peau ou de l'efficacité d'un traitement confirmant, grâce à ces modifications fonctionnelles au sein du microbiote cutané, le retour vers un état sain.
Cela pourra même amener à définir des traitements incluant l'usage de probiotiques de la peau comme le montrent les potentielles applications déjà imaginées visant à recourir à des souches bactériennes productrices de métabolites pour protéger la peau des rayons U.V. [103], ou à des traitements pour favoriser le développement spécifique d'un groupe bactérien commensal dont l'effet bénéfique aurait pu être prouvé.
L'application de la métagénomique fonctionnelle au microbiote cutané nécessite cependant des ajustements techniques du fait des quantités modérées d'ADN bactérien extraites des cellules bactériennes présentes à la surface de la peau à de très faibles densités. De plus, l'hétérogénéité de la surface du corps humain délimitant des zones avec des microbiotes taxonomiquement différenciés, limite la surface des zones de

peaux exploitables, et réduit la possibilité de collecter des quantités conséquentes de cellules microbiennes et d'ADN. La possible contamination par l'ADN de l'hôte constitue une autre contrainte, puisque l'implémentation d'un séquençage direct sur une solution brute d'ADN, potentiellement contaminée, ne privilégiera pas l'analyse de l'ADN bactérien, quand aucune étape PCR n'apporte une spécificité pour le microbiote.

C'est dans ce contexte que s'inscrivent les travaux qui sont présentés ci-après, dont le premier objectif a été d'optimiser les conditions et les stratégies protocolaires afin de produire les premières données fonctionnelles du microbiote de la peau et de décrypter ses spécificités fonctionnelles. Dans un second temps ces approches seront utilisées pour tenter de démontrer l'impact de l'application de cosmétiques sur la peau sur le profil fonctionnel du microbiote cutané.

Chapitre 2 : Etude de la faisabilité de la caractérisation fonctionnelle du microbiote cutané.

A l'initiation de ces travaux de thèse (2011) les sociétés commercialisant le séquençage de l'ADN par la technologie 454 imposaient comme contraintes à leurs clients de leur soumettre des solutions concentrées de telle sorte que la quantité d'ADN totale disponible soit supérieure à 3 µg d'ADN. Si réunir de telles quantités n'est généralement pas problématique quand l'ADN est préalablement amplifié par PCR ou que l'on s'adresse à l'ADN génomique d'un organisme supérieur, d'un micro-eucaryote ou d'un procaryote se développant en culture pure ou à l'ADN métagénomique extrait d'environnements à forte densité cellulaire (fèces, sols, sédiments) ou pour lesquels la taille de l'échantillon n'est pas limitant (eaux), il en est différemment pour quelques écosystèmes. Comme cela a été indiqué au chapitre 1 la peau humaine est un de ceux-là du fait d'une surface limitée à $2m^2$ maximum chez l'adulte, échantillonnable uniquement par zones du fait d'une hétérogénéité physico-chimique qui conditionne une diversité spatiale taxonomique du microbiote et d'une densité bactérienne globalement faible.

Les spécificités propres à cet écosystème que constitue la peau humaine conduisent donc à considérer différents paramètres afin de satisfaire aux contraintes techniques (quantité d'ADN) tout en respectant celles d'un échantillonnage scientifiquement cohérent. Un premier élément à considérer concernait l'homogénéité quantitative de la répartition des cellules à la surface de la peau, entre zones sébacées, sèches et humides et au sein de chacune de ces zones. Encore plus fondamental pour un décryptage des interactions entre le microbiote cutané et l'hôte, se pose le problème de l'homogénéité de la colonisation bactérienne en profondeur dans l'épiderme au travers du *stratum corneum.* Les questions sont en effet autant conceptuelles que techniques, liées d'abord à la difficulté de prélever les bactéries en profondeur, nécessitant la mise en œuvre de méthodes invasives. D'un autre point de vue, la récupération de ces cellules pourrait accroître la quantité d'ADN bactérien extrait mais en accroissant toutefois le risque d'extraire concomitamment des cellules épidermiques vivantes, dont l'ADN du noyau contaminerait la solution d'ADN métagénomique bactérien. Le problème est loin d'être trivial lorsque les $3,4x10^9$ paires de bases du génome d'une cellule humaine sont comparées aux $4x10^6$ paires de bases en moyenne d'une cellule bactérienne, une

contamination même mineure par l'ADN humain pouvant rapidement conduire à rendre inexploitable les données de séquences obtenues à partir de l'ADN extrait de la peau. Ces considérations techniques tendraient à favoriser le recours à une analyse de l'ADN des cellules bactériennes de surface, sous réserve qu'elles soient représentatives taxonomiquement et fonctionnellement de celles colonisant les couches plus profondes du *stratum corneum* , directement responsables des interactions avec l'hôte. Parmi les méthodes de prélèvement des bactéries de la peau, celles connues sous les termes anglais de « swabbing » et de « scratching » sont basées respectivement sur le frottement et le grattage de la peau ne vont concerner que les organismes microbiens de surface [104]. Autre type de prélèvement, la biopsie permettra d'atteindre des microorganismes se développant en profondeur mais cette méthode est beaucoup plus intrusive et peu compatible avec le traitement d'un grand nombre d'échantillons.

Quel que soit le protocole de prélèvement utilisé, l'étape suivante consistera à extraire l'ADN des cellules bactériennes. Les données de la littérature indiquent une sensibilité différente des microorganismes aux traitements lytiques, la récalcitrance d'une proportion importante de la microflore d'environnements comme les sols ou les sédiments contribuant à faire de cette étape le principal biais de l'approche métagénomique [105]. Même si les problèmes d'extraction pouvaient sembler moins aigus que pour des microbiotes extraits d'autres environnements, nous avons considéré que l'évaluation voire la mise au point de protocoles d'extraction d'ADN optimisés constituait un pré-requis indispensable à la mise en oeuvre d'une étude métagénomique de la peau.

Matériels et méthodes

Microscopie

Les échantillons ont été prélevés en déposant un scotch double face sur la zone prospectée puis déposé sur une lame de verre. L'échantillon a été coloré avec du Live-Dead (LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kit). Les ligands ont été mélangés en quantité égale et dilués au 1/600 avec de l'eau ultra pure, 100 µl ont été déposés sur le scotch double face et incubés pendant 10 min. L'observation a été faite au microscope à fluorescence Axio Imager M1 Zeiss avec différentes longueurs d'ondes (485nm pour les bactéries vivantes et 630 nm pour les bactéries mortes).

Prélèvements cutanés

Trois stratégies sont envisageables, le swabbing, le scratching et la biopsie (Figure 5) [104]. Chaque technique est de plus en plus invasive à l'intérieur de l'épiderme. La biopsie n'a pas été testée dans ces expérimentations car cela nécessite de pratiquer une incision dans la peau de l'individu testé et seuls les laboratoires agréés en ont l'autorisation.

Swabbing

Appelé également frottement, il consiste à frotter l'épiderme avec un coton ou autre tissu afin de prélever les squames de peau. La plupart des précédents travaux basés sur l'étude du gène *16S* privilégient cette technique simple et rapide [86,76,77]. Dans ces travaux il est préconisé d'imbiber le coton d'une solution de Nacl 0,15M et Tween 20 à 0,1% en solution finale. Le Tween 20 est un détergent permettant de dés-adhérer les cellules de la peau.

Scratching

Le « grattage » est plus intrusif que le frottement. Le protocole de Grice *et al.* recommande de gratter avec une lame stérile [104]. Nous avons utilisé un scalpel préalablement stérilisé et ce dernier a été rincé avec la même solution que pour le swabbing.

Surface de prélèvements

Plusieurs surfaces ont été testées pour pouvoir déterminer quelle était la surface requise pour récupérer assez de matériel génétique. La méthode des études précédentes basées sur l'analyse 16S faisant l'usage des coton tiges classiques stérilisée a été testée, mais également de plus grandes surfaces avec du coton gaze stérilisé d'une aire de 10 cm^2. Plusieurs régions du corps ont été échantillonnées car la densité cellulaire peut différer comme expliqué précédemment. Les descriptions des protocoles de prélèvement sont développées en annexe (tableaux annexes 1 et 2).

Protocoles d'extractions.

Plusieurs protocoles ont été évalués afin de déterminer celui permettant d'obtenir le meilleur rendement.

- Lyse chimique – enzymatique :

Aussi appelée lyse ménagée, elle permet la dégradation des parois cellulaires et préserve ainsi la qualité de l'ADN. Plusieurs enzymes sont utilisées, la lysostaphine (dégrade la paroi des cellules des *Staphylococci*), la mutanolysine (lyse le peptidoglycane) et de l'achromopeptidase (dégrade la paroi des bactéries à gram positive). Le tableau annexe 2 résume le protocole de lyse. Les enzymes ont été commandées chez le fournisseur Sigma-Aldrich, USA.

- Lyse mécanique :

Deux méthodes ont été testées reposant sur une lyse mécanique, une méthode adaptée de celle développée par Griffiths *et al* [106] ainsi qu'un kit d'extraction d'ADN commercial (MoBio PowerSoil DNA, laboratoires MoBio, USA). A l'intérieur de ces protocoles, il a été possible de faire varier certains paramètres comme le temps de contact dans le liquide de prélèvement, le tampon d'extraction utilisé ou la méthode de précipitation de l'ADN. Le protocole présentant le meilleur rendement est présenté dans le tableau annexe 2.

PCR quantitative

La PCR quantitative (*qPCR*) a été effectuée en utilisant la chimie du SYBR green et l'appareil Rotor-gene 6000™ (Qiagen, FRANCE). Les amorces du gène qui code la glycéraldehyde-3-phosphate déshydrogénase (*GAPDH*) ont été construites selon la publication de Gao *et al* [107] et les amorces ciblant le gène marqueur bactérien *16S* selon la publication de Fierer *et al* [108]. Les protocoles de *qPCR* sont présentés dans le tableau 2. Le volume final du mélange réactionnel était de 20 µl, comprenant 10 µl de solution 2X SensiMix ™ SYBR *qPCR* Kit (Quantace, U.K.), 0,5 µl pour chaque amorce à 10 µM, 2,5 ng d'ADN et H_20 qsp.

Tableau 2 : Protocole de *qPCR*

	Protocole de qPCR	
Gène ciblé	*16S*	*gapdh*
Longueur amplifiat (pb)	200	131
DNA template (ng)	2.5	
Nombre de cycles	55	54
Temps et T° 1ère denaturation	95°C - 10 min	95°C - 10 min
Temps et T° denaturation	95°C - 30 sec	95°C - 30 sec
Temps et T° anneling	53°C - 30 sec	54°C - 30 sec
Temps et T° elongation	72°C - 30 sec	72°C - 30 sec
F primer (5'-3')	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGTCAGAGTTTGATCCTGGCTCAG	GGGCTCTCCAGAACATCATCC
R primer (5'-3')	GCCTCCCTCGCGCCATCAGNNNNNNNNCATGCTGCCTCCCGTAGGAGT	GTCCACCACTGACACGTTGG

Filtration et traitement dnase

Deux systèmes de filtration ont été appliqués aux échantillons. Une filtration avec filtre 5µm stérile a été effectuée puis successivement une filtration avec un taille de pore de 0,2 µm à l'aide du système Swinnex® (Merck Millipore, USA). Les 2 filtres et l'éluat ont ensuite été traités pour l'extraction d'ADN selon les différentes méthodes de lyse testées. Parallèlement au test de filtration, un traitement dnase (Invitrogen, USA) a été appliqué aux échantillons avant la lyse cellulaire selon les recommandations du fournisseur. La dnase a été diluée à une concentration de 5 ng/ml puis 1 µl a été ajouté par ml de solution d'échantillon.

Résultats et discussion

Microscopie

L'organisation, la quantité de cellules bactériennes et leur état de viabilité selon les zones cutanées ne sont pas très bien définis. Afin d'observer la disposition et déterminer s'il y a bien des cellules microbiennes, une étape d'observation au microscope a été jugée nécessaire, permettant de d'apporter une image des microbiomes du pied et de l'aisselle.

La solution de coloration contient 2 ligands fluorescents aux parois bactériennes, l'iodure de propidium ainsi que le SYTO®9. Le SYTO®9 peut se fixer sur les parois intègres (donc celles des bactéries vivantes) et abîmées (associées aux cellules mortes), l'iodure de propidium ayant uniquement la propriété de s'accrocher sur les parois abîmées. La fluorescence du SYTO®9 qui rentre dans les 2 parois est « quenché » quand le 2ème ligand est présent.En figure 8 et 9 sont présentées les prises d'images avec le microscope. Il est possible de voir les squames à la lumière blanche (9 a), colorées en rouge les bactéries mortes et en vert les bactéries vivantes. Les cellules bactériennes observées semblent agglomérées sur les squames de la peau. La présence de bactéries viables est très faible en comparaison du nombre de cellules bactériennes mortes, mais cette observation est variable selon les environnements (Figures 8, 9 ; Figures annexes 1 et 2). D'après nos observations, les cellules viables sont retrouvées préférentiellement sur certains sites d'échantillonnage. Le pied fait partie de ces sites contrairement à l'avant-bras et l'aisselle par exemple. Sur la figure 8a et b on voit nettement la présence de microcolonies de couleur verte que l'on ne retrouve pas dans les autres observations. D'autres observations ont été faites sur d'autre partie du corps et sont présentés en données annexes (Figures annexes 1 et 2).

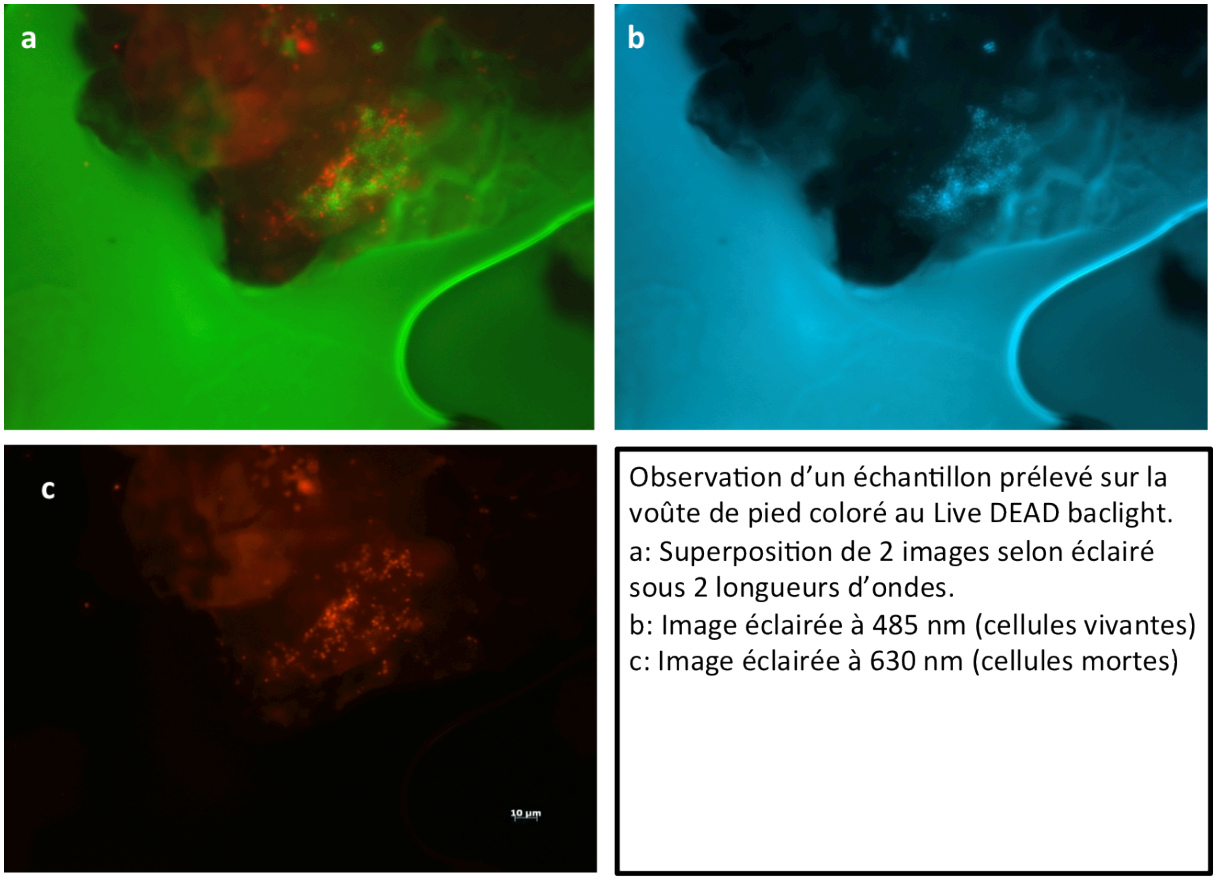


Figure 8 : Observation microscopique d'un échantillon prélevé sur le pied (X500).
La multitude de points verts visibles en figure a et b sont les cellules microbiennes vivantes regroupées en formation de microcolonies.

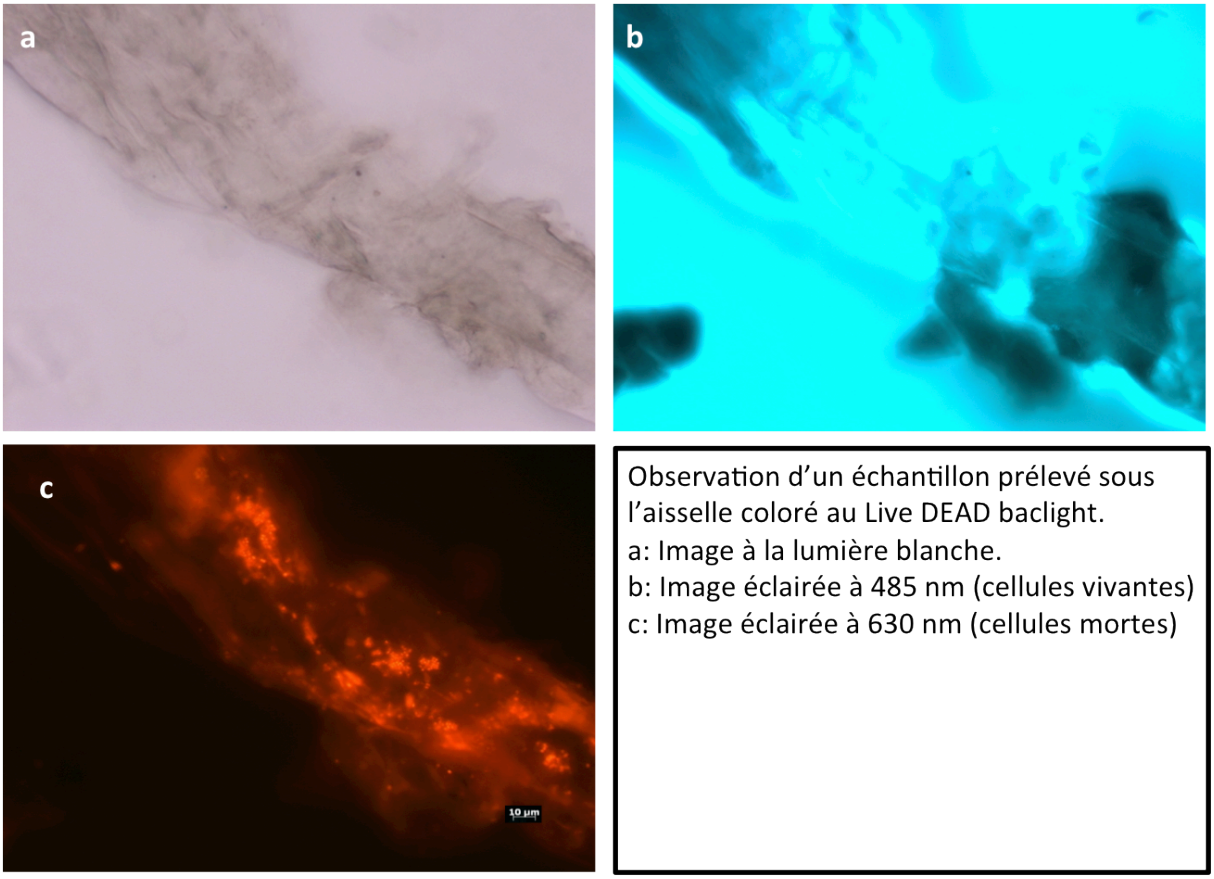


Figure 9 : Observation microscopique d'un échantillon prélevé sous l'aisselle (X500).

La répartition des microorganismes est très aléatoire et dépendante des sites et la répartition à l'intérieur même de ces sites peut être très variable. Les échantillons ont été prélevés sur un même individu, il est donc également possible que la variabilité inter individuelle soit importante. Les cellules microbiennes observées sont principalement dans un état de mort quand on prélève avec du scotch. Les cellules humaines récoltées de cette manière appartiennent aux dernières couches du stratum corneum et sont donc sur le point de desquamer, cette pratique non invasive ne permet pas de pénétrer très profondément la peau et c'est peut-être pour cette raison que la plupart des cellules apparaissent mortes, poussées de leur environnement d'origine dans les couches plus internes, du fait du phénomène de migration des kératinocytes.

Prélèvements cutanés

Bien que les observations faites au microscope ne permettent pas d'établir de conclusions quant à la possibilité d'extraire l'ADN bactérien et en quelle quantité, elles

amènent à s'interroger sur la meilleure stratégie d'échantillonnage du point de quantitatif et qualitatif, afin d'extraire un ADN de bonne qualité et le plus représentatif possible du microbiote. Si l'on veut étudier les cellules bactériennes vivantes il serait très intéressant de pratiquer une biopsie (c'est à dire la technique échantillonnant le plus en profondeur), ce qui permettrait de voir les cellules vivant à l'intérieur de l'épiderme donc ayant potentiellement de fortes interactions avec l'environnement peau. Mais une investigation en profondeur de la peau se fera au contact de cellules humaines vivantes, sources potentielles d'ADN contaminant. D'après Gao *et al.*, un échantillon de peau prélevé par les 3 stratégies possibles et observé par analyse des séquences des gènes *16S* ne diffère statistiquement pas en terme de diversité taxonomique [104], ce qui renforce l'idée que les cellules observées sur les couches externes proviennent majoritairement de leur migration à partir des couches de kératinocytes inférieures (et non pas d'une contamination extérieure). Ce résultat renforce l'hypothèse qu'une bonne représentation taxonomique et fonctionnelle du microbiote de la peau peut être obtenue sans le recours à des prélèvements plus intrusifs sources de contamination par l'ADN de l'hôte. Par contre, cette stratégie ne pourra être retenue quand l'objectif sera d'établir un inventaire des activités et fonctions effectivement réalisées *in situ* par les microorganismes avec l'analyse des ARNm et des protéines. En effet, le temps de migration des cellules bactériennes jusqu'à la surface de la peau s'accompagnera de modifications physiologiques et métaboliques suffisamment profondes pour n'être plus représentatives de leur état physiologique initial. Ce problème ne se rencontre pas pour l'ADN, plus stable dont l'analyse renseigne sur le statut taxonomique des organismes impliqués et des fonctions seulement susceptibles d'être réalisées.

En accord avec les données de la littérature et nos propres observations, ce sont donc les techniques les moins invasives qui répondent le mieux aux critères de bonne représentativité, d'une faible contamination en ADN humain et de facilité de mise en œuvre. Notre objectif a été de déterminer l'efficacité de chaque protocole disponible en considérant en termes de quantité d'ADN extrait et du ratio ADN humain/ADN bactérien.

La surface de la zone de prélèvement est le premier facteur influant sur la quantité d'ADN bactérien extrait.

Les travaux précédents de différentes équipes de recherche, basées sur l'amplification du gène *16S*, font état de l'utilisation d'un coton tige pour échantillonner [76,90,109]. Ce mode opératoire suppose l'absence de contrainte de rendement en ADN puisque les quantités de matériel ainsi prélevé sont extêmement faibles. D'ailleurs aucune quantification n'est effectuée à l'issue de leur procédure d'échantillonage et d'extraction et la validation de l'échantillonnage n'est faite qu'à l'issue de l'étape PCR. L'absence d'amplification dans les témoins négatifs d'échantillonnage et l'observation d'une amplification dans les tubes contenant les échantillons conduit ces auteurs à valider le protocole. Afin d'établir un pool d'ADN suffisant, permettant *a minima* d'effectuer une quantification, nous avons jugé nécessaire dans notre étude de prélever sur une plus grande surface (ie. sur des aires de 10 cm^2), et même, afin de répondre aux exigences quantitatives des prestataires de séquençage, d'assembler des échantillons provenant de plusieurs régions du corps.

Les deux méthodes physiques de prélèvement précédemment évoquées, le scratching ainsi que le swabbing avec du coton-gaze, ont donc été envisagées.

Les tests de scratching à l'aide dun scalpel n'ont pas permis de quantifier de l'ADN, la technique étant beaucoup plus aléatoire et propice à de la contamination extérieure. En effet il a été difficile de récupérer de manière « propre » et stérile les squames grattées sur la lame du scalpel. La technique de scratching effectuée à l'aide d'un scalpel n'a donc pas été retenue car trop aléatoire et agressive pour la peau.

L'utilisation d'un coton-gaze est la meilleure méthode développée car elle permet d'échantillonner une grande surface tout en étant plus abrasif qu'un coton simple. Une fois que le prélèvement est effectué, il est nécessaire de « décrocher » les squames de la gaze. C'est en immergeant la gaze de la solution de prélèvement et en essorant au moyen d'un instrument stérile que nous avons pu extraire le plus de matériel, visible ensuite par centrifugation car les squames forment un culot par ailleurs très instable. En répétant cette procédure une seconde fois, il est possible de récupérer de nouveau du matériel provenant de ce qui n'avait pas été extrait la première fois (le détail du prélèvement est décrit dans le tableau annexe 1). Répéter cette procédure une 3eme fois ne se révèle pas être efficace.

Afin d'obtenir des quantités d'ADN suffisamment importantes et de niveler la fluctuation d'abondance des microorganismes de la zone cutanée prélevée, nous avons cumulé des

échantillons provenant de différents sites cutanés afin d'évaluer les différentes méthodes d'extraction d'ADN.

Protocoles d'extraction d'ADN

La lyse mécanique est classiquement utilisée dans les environnements naturels extérieurs. C'est une technique où la lyse est très énergique mais risque de fragmenter l'ADN obtenu ce qui ne facilite pas le séquençage de celui-ci.

La méthode de lyse enzymatique permet d'obtenir de l'ADN en quantité mesurable mais si l'on compare les quantités obtenues avec la lyse physique les quantités sont moindres et les résultats moins répétables (Tableau 3). La lyse physique a donc été conservée comme meilleure méthode d'extraction. Pour cette lyse ainsi que pour la purification associée, plusieurs facteurs peuvent varier comme le choix du tampon d'extraction, de la précipitation à l'éthanol ou l'isopropanol ou encore des sels de précipitation. La méthode présentant le plus de rendement est décrite dans le tableau annexe 2 et reste la méthode appliquée dans les manipulations suivantes.

Tableau 3 : Moyenne des rendements des quantités d'ADN et moyenne des quantifications des gènes *16S* et *gapdh* dans les échantillons.
Moyennes et écart types calculés avec au minimum, 3 répétitions de chaque condition. Chaque répétition est un nouvel échantillonnage. Le protocole utilisé de lyse physique est la méthode modifiée de Griffiths *et al.* [106].

	Lyse enzymatique					**Lyse physique**				
	sans traitement	Filtration 5 µm			traitement dnase	sans traitement	Filtration 5 µm			traitement dnase
		Filtrat	Filtre	Filtration 0.2 µm			Filtrat	Filtre	Filtration 0.2 µm	
Quantité moyenne d'ADN / extraction (ng)	**99.66**	**230.00**	**146.00**	**0.00**		**527.60**	**103.6**	**878.33**	**4.45**	**46.67**
(±SD)	61.41	50.99	103.50	0.00		330.98	23.6	173.89	7.71	11.05
copies 16S / ng ADN						**1.E+09**	**1.E+08**	**1.E+08**		**1.E+09**
(±SD)						2.E+07	1.E+06	1.E+06		1.E+07
copies gapdh / ng ADN						**41**	**12**	**535**	**215**	**1000**
(±SD)						10	6	205	36	161

Contamination en ADN hôte et PCR quantitative

Les protocoles d'extraction d'ADN ayant été optimisés, nous avons souhaité estimer le taux de contamination en ADN humain, et déterminer si les stratégies de traitement dnase ou de filtration n'étaient pas trop délétères pour le rendement ADN. Il était possible que le rendement en ADN soit élevé mais qu'une forte proportion de cet ADN soit d'origine humaine. Il fallait alors trouver une méthode permettant de séparer l'ADN humain de l'ADN bactérien. Deux solutions ont été envisagées : la méthode de filtration afin de séparer les cellules humaines et bactériennes et le traitement dnase permettant de dégrader l'ADN extracellulaire. En effet ce dernier traitement faisant sens compte tenu du fait que le noyau est éjecté pendant le processus de desquamation, libérant ainsi potentiellement un ADN humain extracellulaire.

La comparaison des rendements d'ADN obtenus après séparation à ceux obtenus sans aucun traitement (échantillons contrôles) nous montre une baisse drastique des quantités en ADN (Tableau 3). L'éluat de la filtration ainsi que le filtre de 0,2 µm contiennent beaucoup moins d'ADN que les concentrations relevées sur le filtre 5 µm (censé ne retenir que les cellules eucaryotes car leur taille est supérieure à 5 µm). La comparaison des quantités recueillies sur ce filtre 5 µm aux échantillons directement extraits nous montre une moyenne plus importante, mais les écarts types de chacune de ces valeurs sont très importants, du fait de la variabilité d'échantillonnage sur un même individu dans le temps sur des sites de prélèvements différents. Il semble que le filtre 5 µm ne remplisse pas son rôle de séparateur des cellules humaines et des cellules de microorganismes, et le fait que les résultats puissent être supérieurs correspond à la variabilité d'échantillonnage sur un même individu dans le temps. Le traitement dnase est très stringent et baisse fortement les concentrations en ADN, possiblement parce que l'ADN des bactéries est également extracellulaire, car les cellules dégradées comme observé en microscopie (Tableau 3).

Afin de déterminer la proportion d'ADN humain et bactérien de nos échantillons, la technique de PCR quantitative a été utilisée dans les pools d'ADN des différents échantillons obtenus. Le ratio entre le nombre de copies de chaque gène marqueur *16S* et *gapdh* ne varie pas selon les échantillons, il y a toujours 10^2/ 10^3 copies de gène *gapdh* et 10^8/10^9 copies de gènes *16S* (Tableau 3). D'un point de vue biologique, les

nombres de copies de gènes obtenus semblent être surestimés si l'on fait une approximation potentielle de copies de gènes que peut contenir 1 ng d'ADN. En effet, il est considéré que la masse molaire moyenne d'un doublet de nucléotides est de 660 g/mol, et qu'une mole contient le nombre d'Avogadro de doublets ($6{,}022.10^{23}$). Alors dans 1 ng d'ADN, il y a potentiellement de l'ordre de 10^{11} paires de nucléotides.

$\mathcal{N}$ 1 ng

$$\frac{6{,}02 \times 10^{23} \times 10^{-9}}{660} \approx 9\times10^{11} \text{ doublets de nucléotides}$$

Masse molaire

Si l'on reprend le nombre de copies de gènes *16S* détectés dans les échantillons (10^8ou 10^9), et que l'on multiplie le nombre de copies de ce gène au nombre de paires de base que contient ce même gène (1550pb [109]), on obtient un ordre de grandeur de 10^{11}, égal à la quantité de doublets contenus dans 1 ng. Le nombre de copies d'ADN 16S est donc surestimé. L'information importante est qu'aucune stratégie de séparation d'ADN humain-bactérien n'a permis de changer le ratio *GAPDH/16S*, ou alors la tendance observée est inversée de celle attendue (ratio *GAPDH/16S* des échantillons non traités meilleur que les échantilons traités). La présence de gènes marqueurs humains est indéniable (les produits *qPCR* ont été séquencés), mais ces résultats ne doivent pas être sur interprétés. En effet si l'on associe à une copie de gène détecté un génome de cellule procaryote pour le gène *16S* et un génome de cellule humaine pour le gène *GAPDH*, alors la contamination en ADN humain est très importante car la taille des génomes de cellules humaines est 10^3 fois plus importante que celles des procaryotes. Mais ce raisonnement est peut être erroné car les kératinocytes en fin de cycle perdent leur noyau, donc leur ADN ; il est possible que le nombre de gènes marqueurs ne corresponde pas au nombre de génomes car l'ADN doit être dégradé, avec potentiellement une dégradation différentielle du génome en milieu extracellulaire. Associer le nombre de copies de gènes marqueurs au nombre de copies de génomes peut s'avérer inexact.

Conclusion

L'analyse microscopique des prélèvements cutanés nous a démontré que la distribution des microorganismes était très variable entre les zones cutanées ainsi qu'au sein même des zones cutanées. Certaines zones telles que celles sébacées ou moites devraient permettre de récupérer assez de matériel génétique comme montrent les observations microscopiques, les protocoles devraient être optimisés ou attendre que les prérequis des technologies de séquençage soient moins contraignants pour les régions sèches. En dépit de ces variations, les différents protocoles d'ADN ont montré leur capacité à produire des certaines quantités d'ADN qui permettront en cumulant un nombre raisonnable d'échantillons de remplir les conditions des prestataires de séquençage. Il apparaît que la technique de lyse physique nous permet d'obtenir des quantités suffisantes avec une faible variation entre les échantillons testés.

Aucune méthode n'a clairement montré la possibilité d'isoler l'ADN bactérien de l'ADN humain, mais l'utilité de cette séparation n'est pas franche car même si l'on est sûr de la présence d'ADN humain, le niveau de contamination n'est pour l'instant pas connu. Seul un séquençage direct permettra d'obtenir un ratio représentatif de la contamination.

Chapitre 3: Caractérisation fonctionnelle du microbiote cutané

Séquençage « shot-gun » du métagénome du microbiote cutané

Dans les chapitres précédents ont été présentées les potentialités qu'offre la métagénomique tant taxonomique que fonctionnelle en comparaison de l'approche basée sur l'isolement de souches bactériennes en culture pure. En court-circuitant l'étape de culture *in vitro* c'est tout un pan de la diversité bactérienne jusque-là inconnue qui devient accessible grâce à l'exploitation de l'ADN extrait directement de l'écosystème étudié. Appliquée à la peau humaine cette approche a permis d'accroître significativement le nombre de taxa détectés fournissant ainsi un inventaire beaucoup plus complet du microbiote cutané. Ces résultats ont été obtenus grâce à l'application d'une étape PCR afin d'amplifier le gène *rrs*, universellement utilisé comme marqueur phylogénétique, étape initiale suivie du séquençage des produits PCR et de l'analyse bioinformatique. Ces premiers travaux sur la peau ont aussi révélé à quelles limites conceptuelles et techniques pouvait être confrontée la métagénomique quand aucune étape PCR ne permettait d'amplifier l'ADN avant séquençage. En effet, la relativement faible densité des bactéries sur la peau couplée à une hétérogénéité de leur répartition à sa surface (ce qui limite nécessairement la taille des zones pouvant échantillonnées) constituent des limites qui ne se rencontrent pas dans d'autres environnements où le matériel biologique n'est jamais limitant. Nous avons évoqué précédemment les différentes méthodes développées pour récupérer les bactéries de la peau et du compromis que représentait la méthode de prélèvement développée précédemment ; quoique restreinte aux seules bactéries de surface de la peau, qui n'en sont pas moins représentatives de celles colonisant la profondeur de l'épiderme, la méthode de prélèvement permet de limiter la contamination par l'ADN des cellules humaines. Toutefois, ces contraintes ne permettent pas d'obtenir des solutions d'ADN contenant des quantités d'ADN métagénomique compatibles avec les requis des prestataires de séquençage sur les plateformes 454 Roche.

Nous présentons dans ce chapitre la stratégie choisie ici pour contourner ces limitations et réaliser la première analyse de métagénomique fonctionnelle du microbiote de la peau humaine. Cette stratégie ne fait pas appel à la méthode d'amplification aléatoire de l'ADN (MDA) par des polymérases de bactériophages [111] du fait des biais très importants

qui la caractérisent avec amplifications préférentielles de certaines régions d'ADN et création de séquences chimériques [112,113]. C'est par contre par le cumul d'échantillons prélevés séquentiellement que nous avons tenté de répondre à ces contingences quantitatives. Nous présentons ici les travaux réalisés sur 2 individus soumis à des prélèvements quotidiens jusqu'à l'obtention de solutions d'ADN métagénomique répondant aux critères qualitatifs et quantitatifs pour un séquençage 454. Les séquences générées ont été analysées afin de confirmer ou infirmer la validité de la stratégie choisie et tirer les premières conclusions sur les fonctions potentiellement exprimées par les représentants du microbiote cutané et les différences interindividuelles telles que celles présentées par les 2 individus échantillonnés.

Matériels et méthodes

Echantillonnage

Deux individus caucasiens mâles âgés de 25 et 26 ans, sans problème cutané référencé, se sont portés volontairement candidats pour être échantillonnés au niveau de leur peau pour l'étude de leur microbiote cutané. Les prélèvements ont été réalisés sur une période de 3 semaines (du 28 mars au 15 avril 2011), tous les 2 jours en fin d'après-midi sur les zones suivantes, dans la paume de la main, sur le nez, le front, les aisselles, les pieds et les plis rétro auriculaires, régions de la peau répertoriées pour avoir la plus forte densité en cellules microbiennes.

Le protocole de prélèvement utilisé est une adaptation de la méthode développée au chapitre 2 consistant à humidifier des gazes préalablement stérilisées à l'aide d'une solution stérile de NaCl 0,15M- Tween 20 à 0,1% (solution de prélèvement) pour frotter vigoureusement avec des gazes différenciées chacune des zones corporelles mentionnées ci-dessus. Chaque gaze est collectée dans un tube Falcon de 50 ml complété de solution de prélèvement avant agitation manuelle vigoureuse du tube et récupération de la gaze pour essorage modéré par pression entre un cône en verre stérile et la paroi du tube Falcon, pour récupération de la suspension bactérienne de l'essorat dans un nouveau tube avant un second traitement identique de la gaze. Les 2 suspensions bactériennes ainsi produites pour chaque échantillon sont centrifugées à 8000xg pendant 30 minutes, le surnageant délicatement éliminé, étape pouvant justifier en cas

d'instabilité du culot une nouvelle centrifugation à 13000xg pendant 30 minutes pour le stabiliser.

Extraction d'ADN

L'extraction de l'ADN bactérien des culots est réalisée après adaptation du protocole de lyse physique de Griffiths *et al.* [106]. Brièvement le culot cellulaire est remis en suspension dans une solution tampon d'hexadecyltrimethylammonium bromide (CTAB) (0,5 ml) et de phénolchloroforme isoamyl acohol 25 :24 :1 (0,5 ml). Les cellules sont lysées pendant 30 secondes à 5,5 m/s avec l'appareil FastPrep FP120 bead beating system (BIO-1O1, Vista, USA), puis les échantillons sont centrifugés 10 min à 11 000xg à 4°C. La phase aqueuse est additionnée de 2 volumes d'éthanol pur et 1/10 de volume de NaCl 5M, incubée à -20 °C avant centrifugation à 13 000xg pendant 30 min à 4°C. Le culot d'ADN est dissous dans du tampon TE (Tris 10 mM, EDTA, 1 mM) et soumis à une étape de purification annexe par application du kit Illustra GFX purification kit (GE HealthCare, Pittsburgh, USA). Pour chacun des deux individus, entre 4 et 6 échantillons ont été systématiquement nécessaires afin d'atteindre après cumul des solutions les 3 µg d'ADN requis pour séquençage par la technologie de pyroséquençage 454 titanium, les traitements de prélèvement des bactéries et d'extraction de l'ADN étant répétés de façon à générer en duplicatas ces solutions d'ADN.

Séquençage et annotation

Pour chaque individu, 2 efforts de séquençage ont été effectués afin d'observer la reproductibilité de la technologie. Le séquençage a été réalisé par la technologie 454 (Roche technologies), 1/6eme d'un séquençage (run) entier étant utilisé pour les 4 échantillons d'ADN qui ont produit chacun 33 657 ± 4835 lectures (reads). L'analyse des séquences a été réalisée en chargeant les fichiers fasta sur le serveur d'annotation MG-RAST [114], l'annotation taxonomique utilisant la stratégie du Lowest common ancestor [115] (*ie.* une séquence qui ne peut pas être inféodée à un seul organisme remonte à la branche taxonomique supérieure commune des organismes la possédant) et la technologie d'annotation en sous-systèmes MG-RAST a été utilisée pour l'annotation fonctionnelle (système M5NR, réunissant de manière non redondante les différentes bases de données disponibles au moment de l'analyse GO, Greengenes, IMG, KEGG, KO GenBank, RefSeq, RDP, SEED, SILVA, SwissProt, TrEMBL, PATRIC, eggNOG) [116].

Seules les lectures caractérisées par un score de similarité élevé avec donc une valeur E.value inférieure à 10^{-5} ont été considérées comme suffisamment significatifs pour une exploitation ultérieure. Les distributions des lectures taxonomiques et fonctionnelles ont été exportées sur le logiciel statistique STAMP de façon à pouvoir les comparer entre elles [117]. Le test statistique t de Welch a été appliqué pour comparer les groupes 2 à 2. Les données métagénomiques du microbiote de la peau ont été comparées à d'autres jeux de données générées à partir d'autres environnements (sols, eaux océaniques, eaux douces chaudes du parc de Yellowstone, eaux acides issues de drainage de mines, boues de station d'épuration, air, sédiments de fond des océans, fèces humain, rumen de vache, intestin de souris et de poulet). Ces jeux de données ont été subjectivement choisis sur le serveur MG RAST afin de comparer les distributions de fonctions du microbiote cutané à celles d'un large éventail d'environnements, soit au total 65 jeux de données de séquences métagénomiques (numéros d'accessions en données annexes, Tableau annexe 3). Pour les tests statistiques, les données environnementales ont été regroupées de façon à comparer les distributions fonctionnelles et taxonomiques avec celles du microbiote cutané, les 4 jeux de données du microbiote de la peau étant eux-mêmes regroupés. Les distributions sont normées avec le nombre de séquences annotées et représentées pour chaque métagénome sous forme d'un histogramme. Pour les comparaisons entre individus au sein du microbiote cutané, les données sont groupées entre individus (donc 2 réplicas par individu). Les *p*-values choisies comme significatives ont été 0,05 pour la comparaison inter-individuelle, 10^{-5} pour la comparaison inter-environnementale.

Résultats

Comparaison des genres microbiens :

La plupart (approximativement 70%) de toutes les séquences annotées sont reliées à 3 genres, *Staphylococcus*, *Corynebacterium* et *Propionibacterium* mais avec des différences de distribution de chacun de ces genres entre les deux individus (Figure 10). *Corynebacterium* représente 37% de la distribution relative dans les métagénomes de l'individu 1, *Staphylococcus* 28% et *Propionibacterium* 6% alors que chez l'individu 2, les proportions s'élèvent respectivement à 29% (-8), 11% (-17) et 27% (+21). D'autres genres bactériens ont également été détectés mais avec des quantités relatives très inférieures (Figure 10). *Streptomyces* et *Mycobacterium* sont les seuls genres moins abondants dépassant quand même le seuil de représentation relative de 2% dans les métagénomes d'au moins un individu. Puis les genres *Bacillus*, *Arthrobacter*, *Rickettsia* et *Rhodococcus* atteignent un pourcentage de représentation relatif de 1%. D'autres genres sont également représentés mais dans des proportions plus faibles.

Il est possible de constater que beaucoup de représentations de genres sont différentes entre les métagénomes de l'individu 1 et 2. Dans les genres prédominants, seuls *Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Arthrobacter* et *Rhodococcus* ne sont pas significativement différemment distribués.

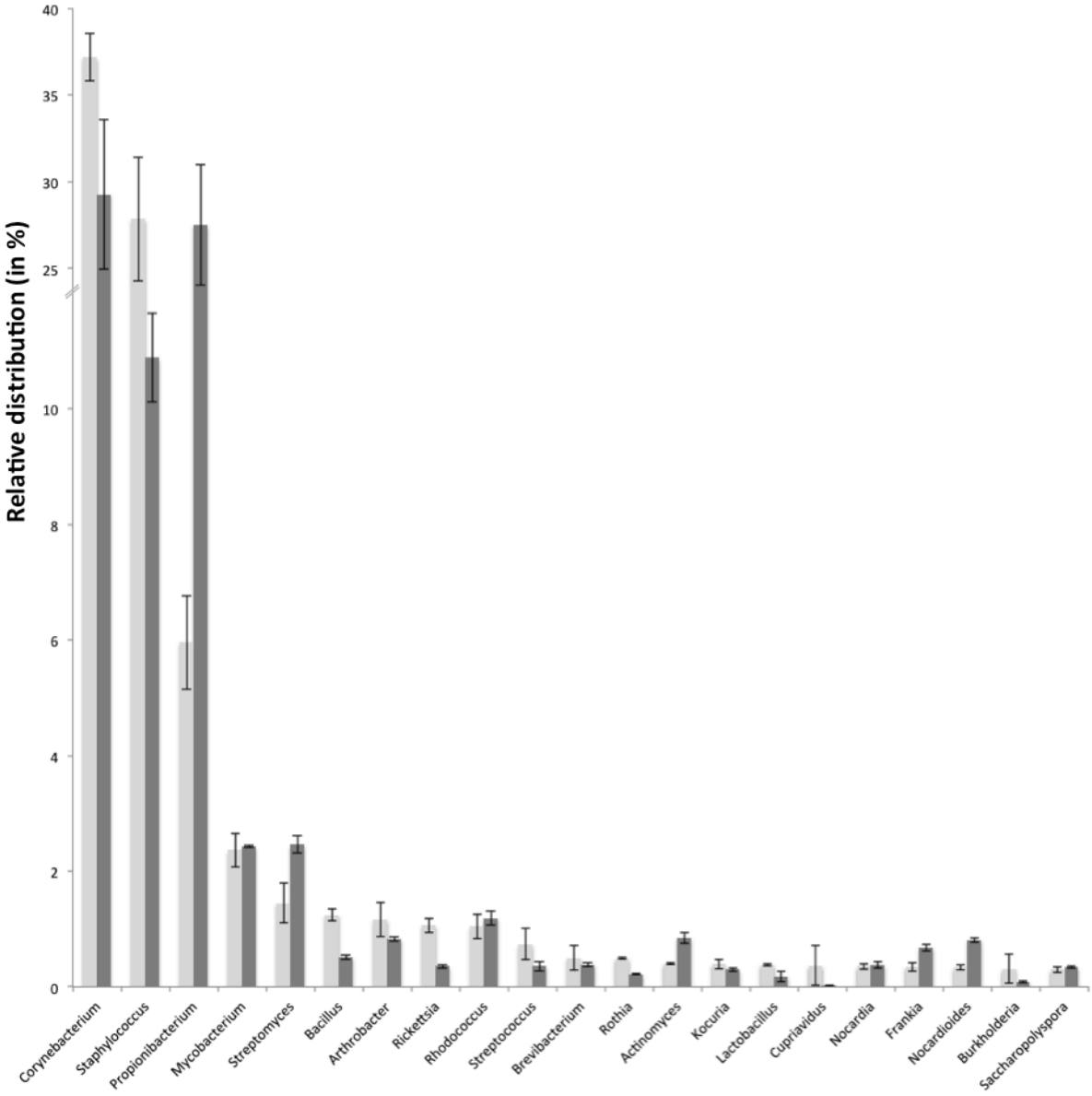


Figure 10 : Distribution relative des reads de métagénomes de la peau assignés aux 21 genres les plus détectés (MG RAST annotation, Evalue <10^{-5}).
En gris clair: individu 1 ; en gris foncé: Individu 2. Les données sont normalisées avec le total des séquences annotées pour chaque métagénome. L'écart type de chaque histogramme est calculé avec les 2 pools d'ADN récupérés et séquencés sur chaque individu.

Les distributions taxonomiques de la peau ont été comparées à celles des genres des 65 métagénomes environnementaux disponibles sur le serveur MG-RAST (le terme environnement étant utilisé pour grouper tous les écosystèmes autres que celui étudié ici, la peau) avec comme objectif de rechercher les différences statistiquement démontrées entre la peau et ces différents environnements (au-dessus d'un seuil de

0,1% de distribution relative, sans quoi le nombre de lectures considéré est trop faible pour être significatif). Certains genres sont détectés dans plusieurs environnements, six d'entre eux ayant été subjectivement choisis pour une analyse plus détaillée du fait qu'ils n'avaient pas encore été référencés comme étant des germes commensaux de la peau humaine (Figure 11). C'est le cas des genres *Nocardia*, *Rhodococcus* et *Kineococcus* dont les représentants sont, selon nos analyses, quantitativement abondants sur la peau mais aussi dans les sols tandis que ceux du genre *Rickettsia*, également abondants sur la peau le sont aussi dans les eaux marines. Les bactéries des genres *Jonesia* et *Arthrobacter* présentent par contre l'abondance relative la plus importante sur la peau par rapport à tous les autres environnements.

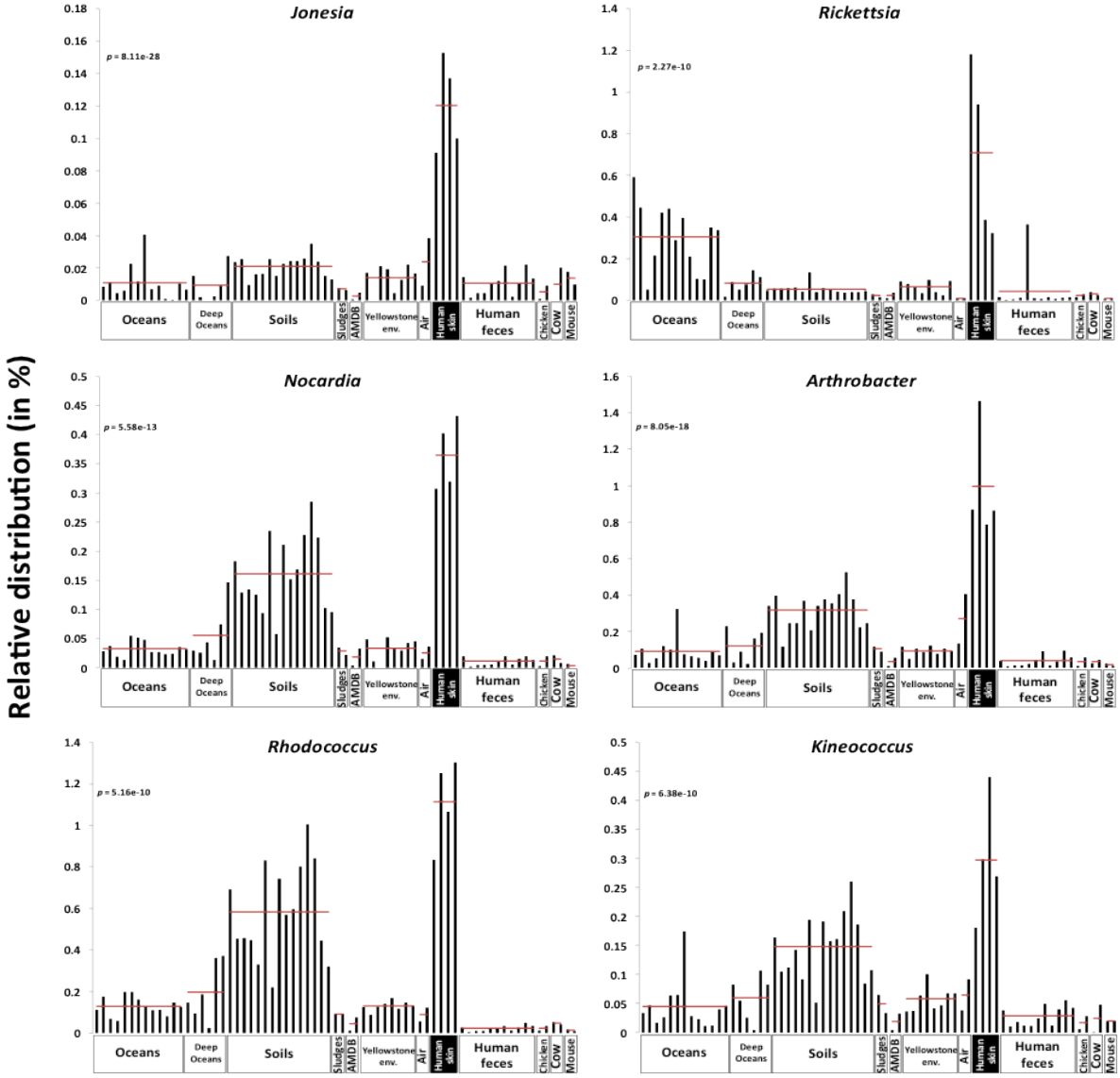


Figure 11 : Distribution relative de reads assignés à 6 genres bactériens ayant une différence significative de représentation sur les métagénomes de peaux par rapport aux 65 autres métagénomes environnementaux (en %, données basées sur l'annotation MG-RAST, Evalue<10^{-5}).
Les données sont normées avec le nombre de séquences annotées. Les lignes rouges horizontales représentent les distributions moyennes par environnement (12 environnements : sol, ocean, Yellowstone, drainage de mine acide, boue de station d'épuration, air, fond des océans, feces humain, rumen de vache, intestin de souris et de poulet). Le test statistique effectué est le test de Whelch, les environnements sont groupés en 2 pour comparer les métagénomes peaux aux autres environnements.

Comparaison fonctionnelle :

L'analyse au niveau fonctionnel des données de séquences du microbiote de la peau présentées en figure 12 concerne le niveau le plus global des fonctions proposé par MG-RAST. A ce niveau d'analyse, aucune différence significative dans leurs distributions n'a pu être mise en évidence entre les 2 individus (test de Welch, P-value < 0,05). Le niveau

d'analyse fonctionnel moins global proposé par MG-RAST permet de révéler des informations d'intérêt même si deux sous-systèmes « Miscellaneous » et « clustering based subsystems » classant des séquences associées à des fonctions peu caractérisées peuvent difficilement être exploités. Le plus grand nombre des lectures des métagénomes de peau ont été assignés au sous-système « Carbohydrate metabolism » puis à celui regroupant les fonctions reliées aux acides aminés et dérivés puis à celui du métabolisme des protéines « protein metabolism ». Il est intéressant inversement de citer des fonctions qui sont peu représentées dans les génomes des bactéries de la peau humaine comme celles des états de dormance et de sporulation « dormancy and sporulation », de mobilité et de chimiotactisme « motility and chemotaxis », de photosynthèse « photosynthesis » et de production de métabolites secondaires « secondary metabolism ».

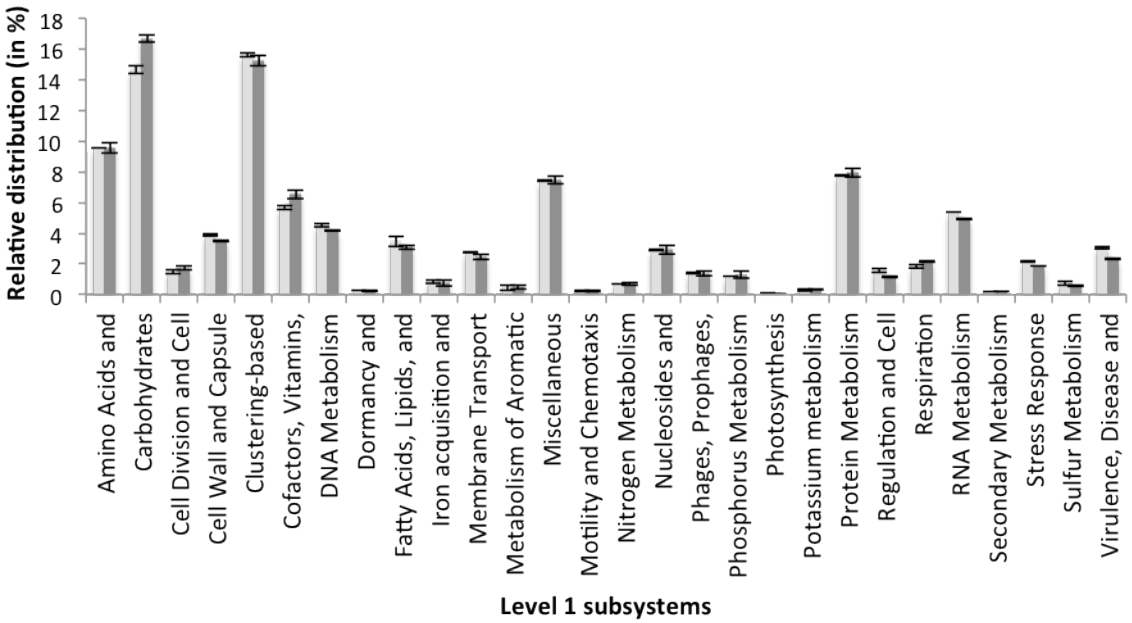


Figure 12 : Distribution relative de reads assignés aux sous systèmes de niveaux général 1 (en %, données basées sur l'annotation MG-RAST, Evalue<10^{-5}).
En gris clair: individu 1 ; en gris foncé: Individu 2. Les données sont normalisées avec le total des séquences annotées pour chaque métagénome. L'écart type de chaque histogramme est calculé avec les 2 pools d'ADN récupérés et séquencés sur chaque individu. Pas de différences significatives observées (Welch's test, P value < 0,05). Les noms complets des sous systèmes ont été raccourcis pour plus de visibilité, voici les noms complets : Amino Acids and Derivatives; Carbohydrates; Cell Division and Cell Cycle; Cell Wall and Capsule; Clustering-based subsystems; Cofactors, Vitamins, Prosthetic Groups, Pigments; DNA Metabolism; Dormancy and Sporulation; Fatty Acids, Lipids, and Isoprenoids; Iron acquisition and metabolism; Membrane Transport; Metabolism of Aromatic Compounds; Miscellaneous; Motility and Chemotaxis; Nitrogen Metabolism; Nucleosides and Nucleotides; Phages, Prophages, Transposable elements, Plasmids; Phosphorus Metabolism; Photosynthesis; Potassium metabolism; Protein Metabolism; Regulation and Cell signaling; Respiration; RNA Metabolism; Secondary Metabolism; Stress Response; Sulfur Metabolism; Virulence, Disease and Defense.

A un niveau d'annotation plus spécifique proposé par MG-RAST, des différences significatives dans les valeurs de distribution des fonctions ont été mises en évidence entre les 2 individus (Figure 13). A titre d'exemple, l'individu 1 présente un plus grand nombre de fonctions classées dans les sous-systèmes « urea degradation », « cardiolipin synthesis and fatty acid biosynthesis » que l'individu 2 alors que c'est l'inverse pour celles liées à la synthèse de la cobalamine « cobalamin synthesis » ou du tréhalose « trehalose biosynthesis ».

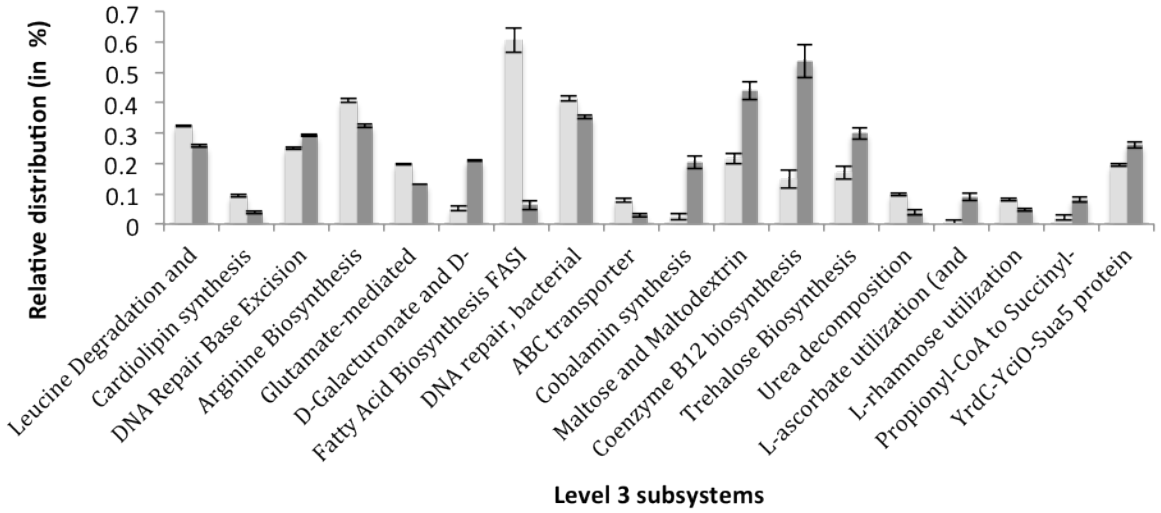


Figure 13 : Distribution relative de reads assignés aux sous systèmes de niveaux 3 ayant une différence significative de représentation entre les 2 individus (en %, données basées sur l'annotation MG-RAST, Evalue<10^{-5}).
En gris clair: individu 1 ; en gris foncé: Individu 2. Les données sont normalisées avec le total des séquences annotées pour chaque métagénome. L'écart type de chaque histogramme est calculé avec les 2 pools d'ADN récupérés et séquencés sur chaque individu. Pas de différences significatives observées (Welch's test, *p*-value < 0,05). Les noms complets des sous systèmes ont été raccourcis pour plus de visibilité, voici les noms complets : Leucine Degradation and HMG-CoA Metabolism ; Glutamate-mediated methylamine utilization pathway ; D-Galacturonate and D-Glucuronate Utilization ; Maltose and Maltodextrin Utilization; L-ascorbate utilization (and related gene clusters) ; Propionyl-CoA to Succinyl-CoA Module.

Le recours au troisième niveau de l'annotation MG-RAST, c'est-à-dire avec une grande spécificité des fonctions montre grâce à l'analyse en composante principale (ACP) en prenant en compte les annotations fonctionnelles des séquences des 69 métagénomes, la spécificité de la peau vis-à-vis des autres écosystèmes (Figure 14). L'analyse sépare clairement et avec cohérence les microbiotes d'environnements liés aux animaux de ceux des écosystèmes extérieurs à l'exception toutefois de celui d'un océan de grande profondeur (Deep-ocean), dont l'objectif, focalisé sur la détection de bactériophages nécessitait l'emploi de protocoles d'extraction adaptés biaisant ainsi l'étude systématique des fonctions bactériennes. La cohérence fonctionnelle entre microbiotes de même origine justifiait de chercher les fonctions surreprésentées dans le microbiote de la peau comme le prouve l'identification à l'aide du programme statistique STAMP de 53 fonctions dont l'occurrence est significativement supérieure dans les microbiotes cutanés en comparaison d'autres environnements (*p*-value sélective <10^{-5}, Tableau annexe 4).

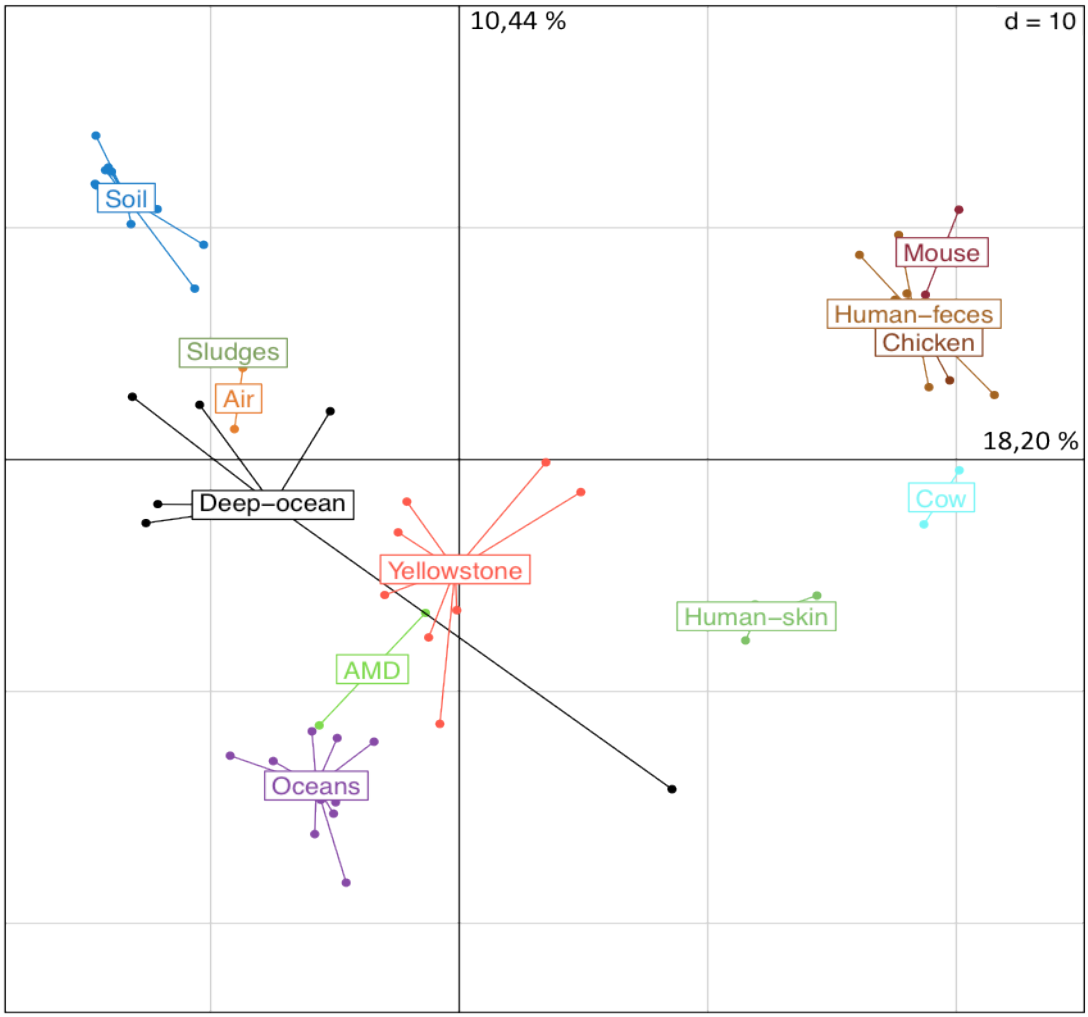


Figure 14 : Analyse en composante principale base sur l'analyse de la distribution des reads au niveau fonctionnel 3 de l'annotation MG-RAST (Evalue<10^{-5}).
Les 800 distributions normalisées de fonctions au sein des 69 métagénomes sont comparées entre elles.

Discussion

Comparaison taxonomique

Le séquençage systématique de l'ADN métagénomique permet l'analyse à des fins taxonomiques du fait d'une part de la présence de séquences concernant des gènes marqueurs comme le gène *rrs* ou de la recherche de motifs de similarité sur l'ensemble des séquences si elles sont assignées à un niveau taxonomique spécifique. Les résultats présentés ici confirment ceux générés par le séquençage du gène *rrs* préalablement amplifié par PCR à partir de l'ADN extrait de la peau à savoir la prééminence des représentants appartenant aux 3 genres bactériens que sont *Staphylococcus*, *Corynebacterium* et *Propionibacterium* [45].

Des bactéries classées dans 13 autres genres bactériens ont également été détectées sur la peau de l'un ou des 2 individus échantillonnés (Tableau annexe 5) confirmant des études précédentes sur le potentiel de ces organismes à coloniser ces écosystèmes. Cependant, le recours à une approche s'affranchissant de la PCR et de ses limitations a permis d'identifier des genres dont aucune étude préalable n'avait révélé la présence de représentants au sein du microbiote cutané comme *Arthrobacter*, *Cupriavidus*, *Cyanothece* et *Coprobacillus*. Ceci peut également s'expliquer par le niveau taxonomique supérieur auquel se référaient certains de ces travaux alors que des isolats classés au sein du genre *Arthrobacter* ont été fréquemment isolés à partir de la peau humaine dans le cadre d'études en milieu hospitalier [118,119]. Il est intéressant de noter que les données métagénomiques sont en phase avec celles des approches classiques sur la présence de microorganismes au sein du microbiote cutané quand ceux-ci échappaient à toute détection lors du recours au séquençage à haut débit de produits PCR.

Notre étude présente six genres bactériens (Figure 11) dont les représentants montrent une prévalence de représentation quantitative sur la peau humaine quoiqu'ils aient aussi été détectés dans d'autres écosystèmes. C'est notamment le cas avec les genres *Jonesia* et *Nocardia* dont les représentants ne sont pas inféodés à un type d'environnement particulier mais pour lesquels l'abondance relative semble plus importante sur la peau que dans les autres environnements. Les bactéries du genre *Nocardia,* ubiquistes, sont connues pour provoquer des infections cutanées [120] comme celles du genre *Rickettsia* [121] sans toutefois que les approches basées sur le séquençage du gène *rrs* les aient jamais encore détectées au sein du microbiote de la peau. Quoiqu'ubiquistes, aucune population des genres *Kineococcus* et *Rhodococcus* n'avait encore été référencée comme commensale de la peau humaine [122,123].

La diversité taxonomique présente dans les métagénomes de microbiote de la peau suggère une forte sélection due aux particularités physico-chimiques de ces écosystèmes. La distribution des genres est typique des habitats à forte pression environnementale avec un faible nombre de genres dont les populations sont quantitativement majoritaires en nombre de cellules (dans notre étude les 3 genres dominants) et un beaucoup plus grand nombre avec un faible nombre d'effectifs.

Entre individus, la variabilité observée ne peut que difficilement être interprétée du fait du mode opératoire utilisé basé sur le cumul d'échantillons bactériens prélevés à plusieurs reprises sur différentes régions du corps. La prépondérance relative du genre

Propionibacterium dans les métagénomes de l'individu 1 pourrait être expliquée par une contribution plus importante des zones sébacées chez cet individu sans variation du microbiote par rapport à l'individu 2 sur les autres régions du corps. Ces résultats confirment la nécessité d'études complémentaires, basées sur le décryptage taxonomique du microbiote de chaque zone spécifiquement, sur un nombre plus important d'individus différenciés par l'âge, le sexe, l'origine ethnique, le régime alimentaire etc. Les nouvelles approches de séquençage, plus efficaces pour une plus faible quantité d'ADN matrice ainsi que les techniques de PCR quantitative sont en mesure aujourd'hui de permettre de relever de tels défis. De même, l'incrémentation régulière des bases de séquences du gène *rrs* permettra d'affilier un nombre supérieur de séquences du microbiote cutané pour en préciser la structure taxonomique.

Comparaison fonctionnelle

La représentation des distributions des fonctions au niveau 1 des sous-systèmes de l'annotation MG-RAST nous a permis de constater que les activités générales potentielles des microorganismes cutanés sont les mêmes entre les individus 1 et 2 (Figure 12). Certaines observations pouvaient être attendues comme le faible niveau de détection de séquences assignées aux fonctions associées à la photosynthèse, mais cela permet de vérifier que les résultats de séquençage confirment ce qui avait été observé au préalable par des études microbiologiques classiques.

Les représentations majeures de certains sous-systèmes fonctionnels peuvent être expliquées par la redondance de certaines fonctions vitales à la cellule bactérienne (*ie.* fonctions associées aux acides aminés ou aux carbohydrates). La plupart des cellules ont besoin du même équipement génétique pour assurer les fonctions basiques de la vie, mais par exemple ce ne sont pas les mêmes composés qui peuvent être utilisés pour produire de l'énergie, et la comparaison fonctionnelle à un niveau plus détaillé permet d'aller plus loin dans les observations et ainsi dans les interactions entre l'hôte et son microbiote (annotation de niveau 3, Figure 13).

Par exemple le sous-système « urea decomposition » est significativement plus représenté dans les métagénomes de l'individu 1, or ce composé est un constituant majeur de la sueur [47], ce qui signifie que les génomes récoltés auraient un potentiel plus important pour utiliser l'urée. Si cette différence entre les individus a une signification

biologique, elle peut s'expliquer par une production plus importante d'urée par l'hôte. Si elle résulte d'un biais méthodologique celui-ci pourrait être imputé à la différence d'accumulation d'ADN entre les sites échantillonnés parmi les deux individus. Néanmoins, ces résultats semblent indiquer l'importance de l'utilisation de l'urée comme facteur discriminant entre les individus.

Le potentiel fonctionnel de chaque microbiote est très différencié mais la stratégie de cumul d'échantillons utilisée ne permet cependant pas une comparaison formelle entre les 2 patients. Néanmoins, les résultats obtenus ont permis d'identifier les spécificités fonctionnelles de microbiotes environnementaux. Des approches de PCR quantitative pourraient être utilisées pour confirmer ces résultats avant que le séquençage « shot-gun » appliqué à chaque zone séparément n'en révèle les spécificités et ne permettent des comparaisons inter-individus.

Comparaison fonctionnelle inter-environnementale

Malgré des protocoles d'extraction d'ADN, des technologies de séquençages et des tailles de métagénomes différents qui font fluctuer les distributions fonctionnelles de façon artificielle dans un même environnement [124], les 69 jeux de données métagénomiques fonctionnelles se regroupent sur une ACP en fonction de leur environnement, ce qui signifie que chaque environnement possède une signature métagénomique fonctionnelle identifiable (Figure 14).

Parmi les 53 fonctions ayant une représentation significative dans les métagénomes de peau, chacune d'entre elles a fait l'objet d'une étude bibliographique afin de tenter de relier leur occurrence à des effets répertoriés ou putatifs sur la peau. Inversement les données anatomiques, biochimiques accumulées sur la peau depuis plusieurs dizaines d'années ont été utilisées pour tenter d'expliquer des distributions atypiques de certaines fonctions. Les choix subjectifs réalisés, quoique basés sur des données de la littérature laissent très certainement « orphelines » des fonctions bactériennes dont l'impact est très important sur l'hôte et ce n'est qu'avec la progression des connaissances que de telles limitations pourront être levées.

Six fonctions ont été choisies du fait de différences de distribution dans les métagénomes entre environnements (figure 15), et certains sous-systèmes fonctionnels de l'annotation MG-RAST cités ci-dessous, nous ont semblé pertinents pour décrire le microbiote de la peau.

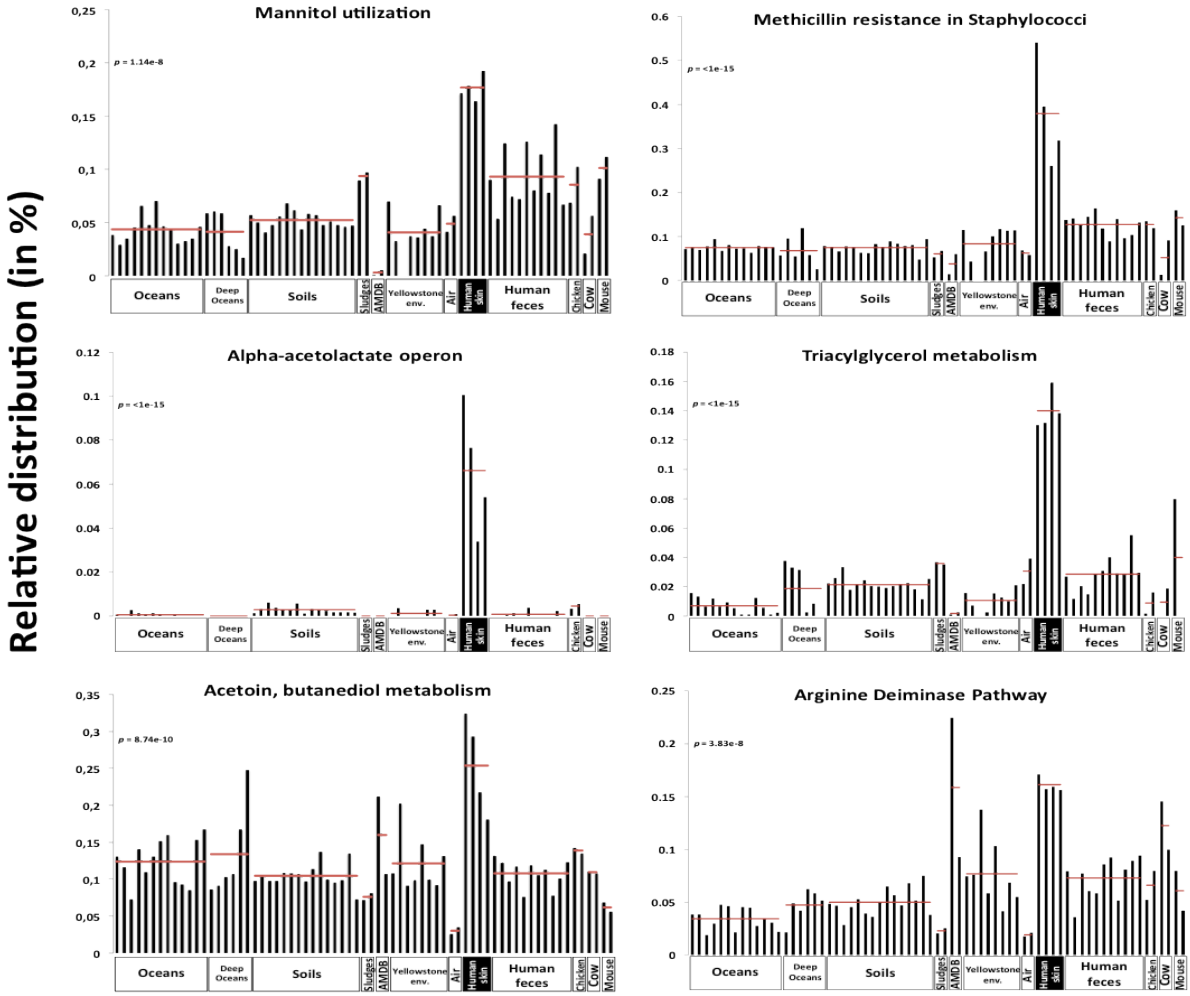


Figure 15 : Distribution relative de reads assignés à 6 fonctions bactériennes ayant une différence significative de représentation sur les métagénomes de peaux par rapport aux 65 autres métagénomes environnementaux (en %, données basées sur l'annotation MG-RAST, Evalue<10^{-5}).
Les données sont normées avec le nombre de séquences annotées. Les lignes rouges horizontales représentent les distributions moyennes par environnement (12 environnements : sol, ocean, Yellowstone, drainage de mine acide, boue de station d'épuration, air, fond des océans, feces humain, rumen de vache, intestin de souris et de poulet). Le test statistique effectué est le test de Whelch, les environnements sont groupés en 2 pour comparer les métagénomes peaux aux autres environnements.

Voies métaboliques :

Mannitol and fructose utilization
Le mannitol est un sucre très commun et des plus abondants dans de nombreux environnements [125]. La voie catabolique de ce sucre a été étudiée dans diverses bactéries et ce composé est transformé en fructose avant d'entrer dans la glycolyse [125]. Dans les métagénomes de peau ces deux voies sont surreprésentées par rapport aux

autres environnements (Figure 15), ce qui suggère une utilisation plus importante et donc une présence plus abondante de ces composés, mais aucun des deux composés n'est référencé dans la composition chimique de la peau, ce qui n'exclue pas leur présence potentielle. Il est également envisageable que ce soit les cellules bactériennes cutanées qui contribuent à l'apport de ces composés, permettant ensuite leur utilisation lors de leur dégradation cellulaire. Afin de renforcer les hypothèses, un dosage des sucres présents sur la peau serait nécessaire.

Sialic acid metabolism

Les lectures associées à ce sous-système sont présentes dans tous les environnements et en plus forte proportion dans les métagénomes de fécès et de peaux humaines. Les gènes les plus représentés dans ce sous-système correspondent aux gènes de dégradation l'acide sialique. Ce composé est un dérivé de sucre, abondant dans tous les environnements et dans les tissus animaux, la peau y compris [126]. Les bactéries associées aux animaux ont le potentiel de le dégrader [127], ce qui semble être également le cas dans les métagénomes de peaux de notre étude.

Triacylglycerol metabolism

Le triacylglycerol (TAG) entre dans la composition de l'épiderme [128] et joue un rôle dans la perméabilité de l'épiderme. Dans la couche cornée, une mauvaise dégradation des triacylglycérides en composés plus simples a été associée à des problèmes de perméabilité de l'épiderme. Ainsi, la déficience de production de TAG lipase par le corps humain procure des pathologies cutanés comme le phénotype ichtyosis (accumulation de squames et assèchement de l'épiderme), car la barrière lipidique est non fonctionnelle [129]. Dans les 4 métagénomes de peau saine qui sont construits, la distribution relative de lectures associées à la dégradation de TAG est plus importante que dans les autres environnements, suggérant une prééminence des microorganismes à utiliser ce composé qui est fortement présent dans la peau [47]. Et en vue d'une application thérapeutique, si les cellules kératinocytes humaines du stratum corneum présentent des déficiences d'activité lipasique, une future thérapie basée sur l'utilisation des microorganismes cutanés et de leur production de lipase est imaginable.

Pyruvate metabolism

Les gènes affiliés à l'opéron acéto lactate et au métabolisme acétoine-butanédiol sont significativement plus représentés dans les métagénomes de peaux. Ces voies métaboliques sont impliquées dans le métabolisme du pyruvate via la fermentation butanédiolique [130]. Il a été démontré dans d'autres environnement que la fermentation butanédiolique pouvait être préférée à la fermentation acides mixtes afin de ne pas augmenter l'acidité déjà importante de certains environnements [131,132]. Cette voie serait utilisée préférentiellement par les microorganismes cutanés pour résister à l'acidité naturelle [47], toute baisse annexe du pH pourrait avoir des effets délétères à la fois sur le microbiote et sur son hôte.

Arginine deiminase pathway

Les gènes de la voie métabolique arginine deiminase ont une représentation significativement plus importante dans les métagénomes de peau, et cette activité a été associée à la tolérance de l'acidité de certains environnements comme la salive [133] et également la peau [134]. Les bactéries commensales de la peau de cette étude pourraient avoir sélectionné le même mécanisme de résistance. Il a d'ailleurs été démontré que l'acidité de la peau était un facteur empêchant l'invasion d'organismes pathogènes, donc impacte la diversité bactérienne et les sélectionne sur leur tolérance à l'acidité [135].

L'acidité du stratum corneum est un facteur important pour le maintien d'un bon état de santé de la peau, en modulant l'homéostasie et en favorisant l'adhésion des bactéries commensales [136]. Dans cette même étude il est expliqué que les microorganismes ne sont pas impliqués dans l'installation de l'acidité même de la peau [136], mais en vieillissant la peau perd de sa capacité à acidifier le stratum corneum sur le modèle murin [137].

Tous ces faits montrent bien l'importance qu'a l'acidité sur la santé de la peau et comment elle impacte la flore microbienne. Les microorganismes, même s'ils ne sont pas les précurseurs de cette acidité, pourraient être utilisés afin d'augmenter ou réduire le pH en promouvant le développement d'une espèce ou d'un consortium exprimant une voie métabolique adaptée. Mais les conséquences d'une telle modification du microbiote dans le temps resteraient d'abord à être établies pour prévenir des effets délétères insoupçonnés.

Gènes impliqués dans la formation de biofilm

Certains gènes au sein de 4 sous-systèmes impliqués dans la formation de biofilm sont significativement plus détectés dans les métagénomes de peau : "biofilm formation in *Staphylococcus"*, "adhesins in *Staphylococcus"*, "murein hydrolase regulation and cell death", "SecY2-SecA2 specialized transport system". Ces groupes fonctionnels ont donc tous été associés à la formation de biofilm mais les bactéries commensales de la peau ne présentent pas *a priori* de formation de biofilm (*cf* chapitre 2 microscopie), plutôt des microcolonies. La présence de ces gènes pourrait être déjà nécessaire à la création de ces microcolonies, ou alors leur présence en surabondance n'est que le reflet d'une co-sélection par d'autres gènes d'un même génome. En effet les gènes détectés sont pour la plupart associés au genre *Staphylococcus*, un des plus abondants du microbiote cutané. Il se pourrait que la sélection de ces génomes ne soit pas pour ses gènes associés à la formation de biofilm mais par les autres gènes portés par ces génomes.

Gènes de résistance aux antibiotiques

Trois gènes de résistance ont une représentation relative plus importante dans les métagénomes de la peau comparés aux autres métagénomes. Pour deux des résistances détectées, à la teicoplanine ainsi qu'à la méthicilline, les lectures associées appartiendraient au genre *Staphylococcus* ; leurs représentations sont donc peut-être dues à la présence des génomes plus qu'à une réponse à une pression sélective. Néanmoins, il est intéressant de relever le fait que ces populations ont une résistance intrinsèque à ces 2 molécules, notamment dans le cas de la méthicilline où sa résistance en milieu clinique est problématique [138]. La 3ème résistance détectée est à la molécule bacitracine, fréquemment utilisée en onguent des soins de premiers secours afin d'éviter les infections sur des traumas épidermiques mineurs [139], l'individu 1 a d'ailleurs confirmé avoir utilisé ce genre de pommade.

Systèmes de capture de fer

Au sein des métagénomes de peau, il y a relativement plus de lectures associées aux sous-systèmes « petrobactin-mediated iron uptake system » et « siderophore anthracelin » que dans les autres métagénomes. Le fer semble être un facteur limitant pour la croissance des bactéries commensales de la peau. C'est le cas des microorganismes pathogènes opportunistes humains comme *Staphylococcus aureus*,

lequel a développé certains mécanismes d'acquisition du fer [140], il est donc imaginable que tous les membres du microbiote cutané rencontrent les mêmes difficultés.

Conclusion

Par cette comparaison métagénomique, il est montré que la communauté microbienne de la peau a le potentiel d'utiliser des composants de la peau humaine et certaines fonctions doivent répondre aux pressions environnementales de cet environnement comme le pH, la disponibilité en eau, ou la production de sébum. Inversement, certaines fonctions microbiennes pourraient permettre d'aider ou de restaurer la peau en un meilleur état de santé (*ie.* Le métabolisme du triacylglycérol ou la production de composé anti acidité..). Ici les métagénomes construits ne sont pas d'une taille très grande mais ont permis de démontrer une spécificité fonctionnelle du microbiote cutané en comparaison avec les autres données environnementales. Une prochaine étape sera de s'affranchir du cumul d'ADN dans l'espace afin de mettre an valeur les spécificités fonctionnelles du microbiote liée à son emplacement sur les régions du corps. Enfin, il sera nécessaire de collecter un plus grand nombre d'échantillons provenant d'individus différents et caractérisés afin de déceler toutes les différences fonctionnelles et comment elles rentrent en interaction avec le corps humain.

Chapitre 4 : Applications : Etudes de l'impact d'onctions sur les communautés microbiennes

Si le décryptage taxonomique et fonctionnel du microbiote de la peau humaine revêt une importance fondamentale considérable pour comprendre les potentialités adaptatives des microorganismes, les relations avec l'hôte, leurs implications dans des pathologies spécifiques et même leur impact sur la santé générale, les applications de ces connaissances sont aussi considérables notamment dans des domaines comme la cosmétologie. La peau fait en effet l'objet de beaucoup d'attention de la part des industriels de ce secteur qui développent toute une gamme de crèmes et lotions visant à ralentir le vieillissement, gommer les rides, masquer les défauts etc. Par contre, l'impact que pouvait avoir l'application de ces traitements sur le microbiote a très peu été étudié même s'il a pu être montré que l'application d'un certain type de maquillage sur le visage induisait une augmentation de la diversité microbienne par rapport aux contrôles [91]. Il est probable que ces critères prendront une importance considérable, être utilisés pour règlementer la commercialisation de produits dont l'impact sanitaire sera mis en cause du fait d'un effet délétère sur le microbiote. Inversement, les industriels pourront s'en servir comme arguments marketing s'il peut être montré un impact positif sur le microbiote du produit qu'ils commercialisent. Nos travaux présentés dans les chapitres précédents montrent cependant le travail fondamental restant à réaliser avant de pouvoir utiliser ces critères tant au niveau médical qu'en cosmétologie. S'il devient possible d'établir un inventaire taxonomique de plus en plus précis des microorganismes impliqués ainsi qu'un répertoire de leurs gènes, leur corrélation avec un état sanitaire est encore plus qu'hypothétique. Que signifie par exemple en termes de bienfait pour la peau un accroissement du niveau de biodiversité taxonomique du microbiote ? Ne peut-on craindre que parmi ces microorganismes nouvellement installés se trouvent des pathogènes ? Quelles fonctions réalisées par ces bactéries vont être bénéfiques et même si c'est le cas un accroissement trop important ne risque-t-il pas d'avoir un effet contraire ?

Notre objectif dans le cadre de ce travail vise à développer les premières étapes d'une démarche qui à terme devrait déboucher sur la prise en compte du microbiote de la peau dans l'évaluation de l'effet d'un produit thérapeutique ou cosmétique. Ces étapes

initiales consistent à déterminer la sensibilité des méthodes préalablement développées pour montrer l'impact sur la structure taxonomique et fonctionnelle du microbiote cutané après application sur différentes zones du corps humain d'onctions cosmétiques développées par la société LibraGen en comparaison de zones contrôles situées dans les mêmes régions. L'évolution taxonomique sera évaluée par la technique RISA alors que le séquençage haut débit de l'ADN métagénomique extrait sera utilisé pour tenter de déterminer les fonctions microbiennes qui auraient pu être quantitativement les plus affectées par le traitement. Les données recueillies par cette étude métagénomique ont également permis de décrypter les différences taxonomiques et fonctionnelles entre les différentes zones cutanées sans traitement du pied, de l'aisselle et du front. Ces résultats ont permis d'approfondir les connaissances fondamentales du microbiote cutané. C'est par la multiplication de telles expérimentations sur une large cohorte de patients, soumis à une large gamme de traitements que pourront être établis les corrélations entre structure taxonomique et fonctionnelle du microbiote et état sanitaire de la peau évalué sur des critères médicaux et d'apparence.

Matériels et méthodes

Echantillonnage, traitement et extraction ADN

Quatre volontaires (DAU, RTH, CJA et PRO) de type caucasien ont été échantillonnés de façon hebdomadaire pendant une période de 8 semaines sur 3 zones prospectées (front, pieds et aisselles). Chaque zone a été latéralisée gauche et droite, un côté étant traité, l'autre non. Pieds gauches, aisselles gauches et hémi-fronts gauches n'ont pas subi de traitement alors que pieds droits, aisselles droites et hémi-fronts droits ont été traités par 3 formulations cosmétiques. Le traitement a démarré au temps 2 jours après le temps t3, afin d'obtenir 3 échantillons contrôles sans traitement de la zone test. Les compositions des différentes formulations sont:

Unitamuron© (Induchem, Suisse) pour l'hémi-front droit

Le principe actif de cette application est composé d'extrait de graines de tamarin (5%), élément qui contient de grandes quantités de polysaccharides, majoritairement de galactoxyloglycanes (chaîne de glucose + xylose + xylose-galactose). Le reste de la formule est composé de pentylène glycol (5-10 % + eau *qsp*).

Novhyal© (Libragen, France) pour le pied droit

Le principe actif de ce traitement est la N-acetyl-glucosamine-6-phosphate (4-5%). La formule contient aussi du glycérol à 4,4 %. Le produit contient enfin des traces de la N-acetyl-glucosamine et de sodium phosphate.

Dermodéo© (Dermophil, France)

Ce déodorant est composé exclusivement de pierre d'alun, une « roche » composée de potassium d'aluminium sulfate.

Le traitement a été commencé après le 3ème échantillonnage de façon à obtenir 3 échantillons avant traitement et 5 échantillons post traitement par individu. Les échantillons ont été traités de la même manière que dans les expérimentations précédentes (Tableaux annexes 1 et 2) pour l'extraction d'ADN.

Etudes RISA

L'étude la diversité microbienne par la technique Ribosomal InterSpacer Analysis (RISA) a été effectuée selon la méthode de Ranjard *et al.* [141]. La région inter-génique de l'opéron ribosomal entre les gènes *16S* et *23S* a été amplifiée avec les amorces *SSU* (TGCGGCTGGAT CCCCTCCTT) et *LSU* (CCGGGTTTCCCCATTCGG). Le kit d'amplification Illustra Hot Start Mix RTG a été utilisé incluant déjà dans chaque tube dNTPs, Taq polymérase et sels (GE HealthCare, UK). Le mix réactionnel a été préparé avec 2,5 ng d'ADN et 1,25 µl d'amorces à une concentration de 10 µM, et de l'eau ultra pure *qsp* 25 µl. Le programme PCR se déroule selon les conditions suivantes 94°C-10 min ; 94°C-30sec ; 55°C-30sec ; 72°C 1min30 (retour étape 2 pendant 29 cycles) ; 72°C-10min. Les produits d'amplification ont été analysées avec l'appareil Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent technologies, USA) [142]. Cet appareil permet d'obtenir une séparation électrophorétique sur puce des amplicons en fonction de leur taille, de la détection de ces amplicons au moyen d'un détecteur de fluorescence et à la visualisation informatique des profils d'amplicons. Le kit de migration utilisé était le kit Agilent DNA chips 1000. Les résultats d'émission de fluorescence en fonction du temps de migration ont été exportés sous forme de table Excel afin d'être traitée sous le logiciel statistique R, permettant une analyse en composante principale (ACP) des échantillons. L'ACP est une méthode descriptive dont l'objectif est de représenter sous forme graphique l'essentiel de l'information contenue dans un tableau de données quantitatives. Dans le tableau de

données brutes, chaque échantillon est décrit par 841 variables (valeur de fluorescence à chaque temps d'acquisition), et se trouve dans un espace à 841 dimensions. L'ACP permet de simplifier la représentation des données multivariées en projetant les données de chaque échantillon dans un espace à nombre réduit de dimensions (2 ou 3). A travers cette démarche d'analyse multivariée, les échantillons seront ou non groupés sur la représentation en ACP en fonction de la proximité voire similarité de leur profil RISA.

Méthode d'analyse de l'effet d'un traitement sur la diversité RISA

L'analyse des changements de la diversité microbienne a été la suivante :
Pour chaque zone prospectée, les comparaisons des profils RISA des échantillons prélevés avant le départ du traitement des zones gauche et droite (t1, t2 et t3) ont été effectuées, puis l'évolution de la zone non traitée (zone gauche) du temps t1 au temps t8, et enfin l'évolution de la zone traitée après commencement du traitement (à partir du temps t4).

Séquençage et annotation

Seulement 24 des 192 échantillons collectés ont été sélectionnés afin d'être envoyés à la plateforme de séquençage. Les échantillons des individus RTH et DAU ont été sélectionnés pour être séquencés car leurs communautés microbiennes ont montré une évolution nette des profils RISA sur certaines zones cutanées. Pour chaque échantillon le séquençage a été effectué 2 fois, ce qui permet d'avoir une répétition de séquençage et d'observer si la technique est reproductible. Le tableau des noms des échantillons est disponible ci-dessous afin de bien comprendre les figures suivantes (Tableau 4).

Tableau 4 : Tableau des acronymes des échantillons séquencés.

		RTH					
		Pied		Front		Aisselle	
		Gauche	Droit	Gauche	Droit	Gauche	Droit
temps t3 (avant traitement)	1er séquençage	RTH_PG3	RTH_PD3	RTH_FG3	RTH_FD3	RTH_AG2	RTH_AD2
	2eme séquençage	RTH_PG3S	RTH_PD3S	RTH_FG3S	RTH_FD3S	RTH_AG2S	RTH_AD2S
temps t8 (post-traitement)	1er séquençage	RTH_PG8	RTH_PD8	RTH_FG8	RTH_FD8	RTH_AG8	RTH_AD8
	2eme séquençage	RTH_PG8S	RTH_PD8S	RTH_FG8S	RTH_FD8S	RTH_AG8S	RTH_AD8S
		DAU					
		Pied		Front		Aisselle	
		Gauche	Droit	Gauche	Droit	Gauche	Droit
temps t3 (avant traitement)	1er séquençage	DAU_PG3	DAU_PD3	DAU_FG3	DAU_FD3	DAU_AG2	DAU_AD2
	2eme séquençage	DAU_PG3S	DAU_PD3S	DAU_FG3S	DAU_FD3S	DAU_AG2S	DAU_AD2S
temps t8 (post-traitement)	1er séquençage	DAU_PG8	DAU_PD8	DAU_FG8	DAU_FD8	DAU_AG8	DAU_AD8
	2eme séquençage	DAU_PG8S	DAU_PD8S	DAU_FG8S	DAU_FD8S	DAU_AG8S	DAU_AD8S

Le séquençage a été effectué avec la technologie Illumina HiSeq 2500 avec le protocole adapté du MySeq permettant d'obtenir une longueur de séquence théorique de 2x150 pb. Deux librairies par échantillon ont été construites permettant ainsi de vérifier la répétabilité d'un run de séquençage. Pour chaque jeu de données, en moyenne 3 450 000 (± 983 000) de séquences ont pu être assemblées par la technique du paired-end (séquençage des 2 côtés d'un segment d'ADN avec un chevauchement des séquences au centre ce qui permet de reconstruire un brin d'une longueur supérieure à chacun des brins initiaux, par exemple dans notre étude l'analyse de séquences d'une taille de 150 pb aboutit à la production d'une séquence pour des fragments d'ADN d'une longueur de 210 ± 14 pb). Les jeux de données ont été annotés via la plateforme MG-RAST en comparant aux bases de données de référence [114]. La stratégie du Lowest common ancestor [115] a été utilisée pour l'étude de taxonomie stipulant qu'une séquence qui ne peut être inféodée à un microorganisme référencé soit utilisée pour le caractériser au niveau taxonomique supérieur (au sein duquel sont groupés tous les organismes avec la

séquence correspondante). L'annotation fonctionnelle a été réalisée à l'aide des sous-systèmes MG-RAST (stratégie du best hit avec une valeur statistique sélective égale à 10^{-5}). Les distributions de genres et de fonctions ont été effectuées via le logiciel STAMP qui compare les distributions relatives fonctionnelles/taxonomiques entre métagénomes ou groupes de métagénomes [117].

Méthodes d'analyses des distributions métagénomiques taxonomiques et fonctionnelles.

Afin de déterminer quelles sont les distributions de genres bactériens/fonctions microbiennes spécifiques aux environnements aisselle, pied et front quand aucun traitement cutané n'est appliqué aux échantillons, les données métagénomiques des zones contrôles (gauche) ont été regroupées et analysées entre elles (en excluant les données provenant de la zone droite). Le jeu de données obtenu a permis d'observer les différences de distributions entre les zones front pied et aisselle, en appliquant un test statistique Anova via le logiciel STAMP, afin de déterminer des différences de distributions significatives entre les 3 zones cutanées.

Pour la détermination d'un effet du traitement sur les distributions de genres bactériens/fonctions microbiennes du microbiote cutané, les échantillons après traitement séquencés (temps t8 de l'échantillon droit) ont été comparés au regroupement des échantillons contrôles (de la zone gauche temps t3, t8, ainsi que de la zone droite temps t3). Les jeux de données métagénomiques sont analysés via le logiciel STAMP, en appliquant un test t de Welch pour déterminer quelles sont les fonctions significativement différentes entre les deux groupes d'échantillons.

Voici un schéma récapitulatif du protocole d'étude (Figure 16).

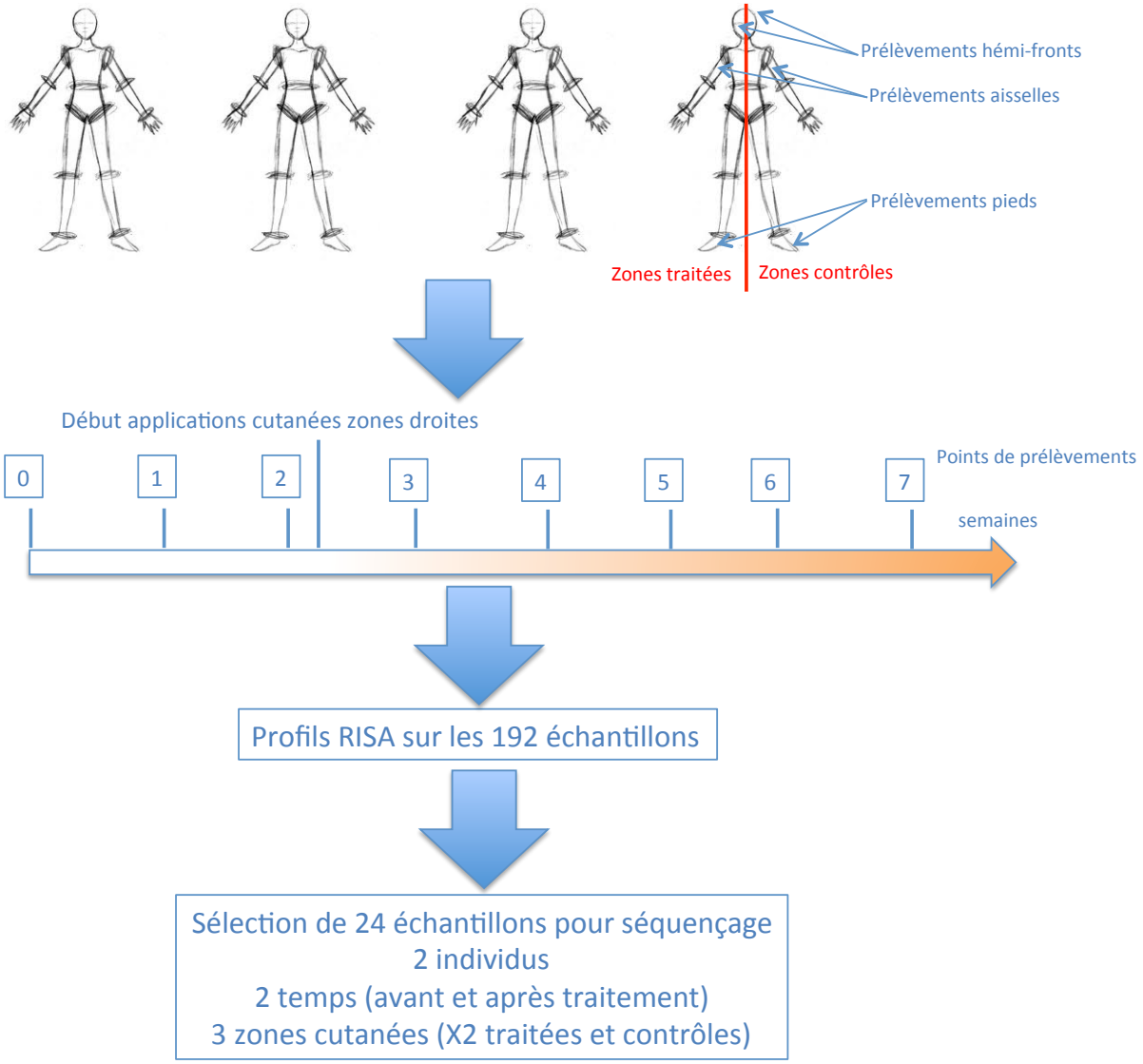


Figure 16 : Schéma récapitulatif du protocole expérimental.
Quatre individus sont échantillonnés sur 3 zones cutanées séparées en 2, les hémis-fronts, les pieds et les aisselles. Les individus sont échantillonnés de manière hebdomadaire et un traitement journalier sur chaque zone traitée (hémi-front, aisselle et pied droits) est effectué. La durée de l'expérimentation dure 7 semaines avec donc 8 points de prél èvements dans le temps. Un profilage rapide est effectué à l'aide de la méthode RISA sur tous les échantillons, puis les échantillons pertinents montrant une certaine évolution sont envoyés à séquencer.

Résultats et Discussion :

Notre étude visait à déterminer l'impact potentiel de l'application de produits cosmétiques sur la structure taxonomique et la représentation des gènes fonctionnels du microbiote cutané. Deux méthodes complémentaires ont été développées, l'une basée sur une approche PCR (outil RISA) appliquée à l'ADN extrait des échantillons prélevés sur différents sites de la peau (sans et après traitement) pour détecter des changements de structure taxonomique du microbiote, l'autre sur le séquençage total des mêmes préparations d'ADN afin de caractériser les échantillons en fonction de leurs distributions fonctionnelles et taxonomiques. Trois zones cutanées (ie. aisselle, pied et front) de 4 volontaires ont été soumis chacun à des traitements spécifiques.

Un déodorant à base de pierre d'alun (produit naturel composé uniquement de potassium d'aluminium) visant à limiter l'émanation d'odeurs désagréables a été appliqué sous une aisselle chez chaque patient (l'autre servant de contrôle), la pertinence d'un tel traitement tenant à l'implication du microbiote dans la production des odeurs par dégradation des composés de la sueur tels que les acides gras volatiles ou les stéroïdes odorants [143]. Nos travaux visaient notamment à confirmer ou infirmer l'implication de certains genres bactériens notamment *Corynebacterium* et de souches affiliées à *Streptococcus* [143].

Le potassium d'aluminium possède un effet astringent, réduisant la sudation par resserrement des pores de la peau [144]. Un effet bactériostatique sur les communautés microbiennes de l'aisselle lui a également été attribué par des approches de microbiologie classique (isolement) [144]. Le couplage des propriétés astringentes et de l'effet létal de l'ion aluminium trivalent attribué au pH faible de sa solution [144] mais également à sa compétition avec le fer et le magnésium dans la cellule et à sa liaison à l'ADN ainsi qu'aux membranes cellulaires [144] font de la pierre d'alun un excellent traitement de la peau pour déclencher des changements profonds du microbiote cutané [145].

L'onguents Novyhal© a été appliqué sur la voute plantaire. Le Novyhal© est un actif utilisé pour régénérer et raffermir l'épiderme, en stimulant la production d'acide hyaluronique. Le principe actif qui représente 6% du produit (le reste étant pour la quasi-totalité de l'eau) est à base de N-acétylglucosamine-6-phosphate, précurseur des

voies de la glycolyse et de synthèse de peptidoglycane chez les bactéries [146]. La différence de pH entre la crème (pH alcalin) et celui de la peau sur le pied (cf Figure 3, pH ≈ 5,3) peut également avoir un impact sur le microbiote cutané.
La zone du front a été traitée avec la crème Unitamuron© commercialisée en prévention du vieillissement cutané en augmentant l'élasticité de la peau grâce à la synthèse d'acide hyaluronique. Son application entraine également la formation d'un film hydro-colloïdique évitant la perte d'eau et le dessèchement des cornéocytes. Ce produit cosmétique est essentiellement composé d'extraits de graines de tamarin, riches en chaînes de polysaccharides de galacto-xylo-glycanes (chaîne de glucose + xylose + galactose) et de butylène glycol connu pour ses propriétés hydratantes. Les sources de carbone que représentent ces produits peuvent potentiellement influer sur le microbiote cutané impacté déjà par les différences de l'activité en eau.

Impact des produits cosmétiques sur la diversité taxonomique du microbiote cutané

Cette problématique a été abordée à l'aide d'une technologie facile d'emploi, rapide, peu coûteuse et résolutive basée sur l'amplification PCR de la région inter-génique de l'opéron ribosomal (d'où l'acronyme RISA) appliquée sur une matrice d'ADN bactérien provenant des échantillons prélevés sur la peau. La résolution après migration électrophorétique des produits PCR divergeant de par leur taille du fait des faibles pressions de sélection au sein de cette région non codante [147] génère un profil caractéristique des différentes communautés bactériennes étudiées qui peuvent être comparées. Outil de première analyse cette technique ne permet pas de relier taille d'amplicons et identité taxonomique à quelque niveau que ce soit. Ceci est du au fait que des organismes taxonomiquement différenciés peuvent présenter une taille similaire de la région intergénique et qu'au sein d'un même génome les différents opérons peuvent présenter des intergènes de taille différente[148]. La technique RISA est toutefois parfaitement adaptée pour déterminer si les traitements cosmétiques apposés sur les différents sites du corps ont généré des modifications taxonomiques conséquentes au sein des microbiotes en comparaison des zones témoin (Figure annexe 3). Dans un second temps, le séquençage haut débit sur la plate-forme illumina des mêmes matrices d'ADN mais limitées aux échantillons les plus pertinents d'après les résultats RISA apportera un tout autre niveau de résolution en identifiant les taxons et gènes

fonctionnels les plus représentés au sein des différents microbiotes. La comparaison de ces différents jeux de données de séquences par les outils statistiques appropriés permettra d'interpréter l'effet des traitements utilisés et notamment de déduire la cohérence des résultats observés d'après les connaissances sur les microorganismes et les fonctions positivement ou négativement affectés considérant également les interactions avec leur hôte.

Similitude de la diversité RISA selon les zones cutanées

La diversité des profils RISA au sein des individus et des sites de prélèvements a d'abord été observée (Figure 16). Cette figure présente le résultat de l'ACP des profils RISA de chaque site prélevé gauche et droit, pour chaque individu, et aux temps précédant le traitement (t1, t2 et t3 ; échantillons réunis dans un même groupe). Sur chaque ACP correspondant à chaque individu, il est possible de voir que les échantillons se regroupent selon le site de prélèvement. Bien que les échantillons soient prélevés sur différents sites gauche et droit, donc peuvent présenter une différence dans la communauté microbienne, les profils RISA gauches et droits d'un même environnement présentent une plus forte similarité entre eux que par rapport aux autres sites, ce qui permettra une comparaison de l'évolution des communautés avec et sans traitement.

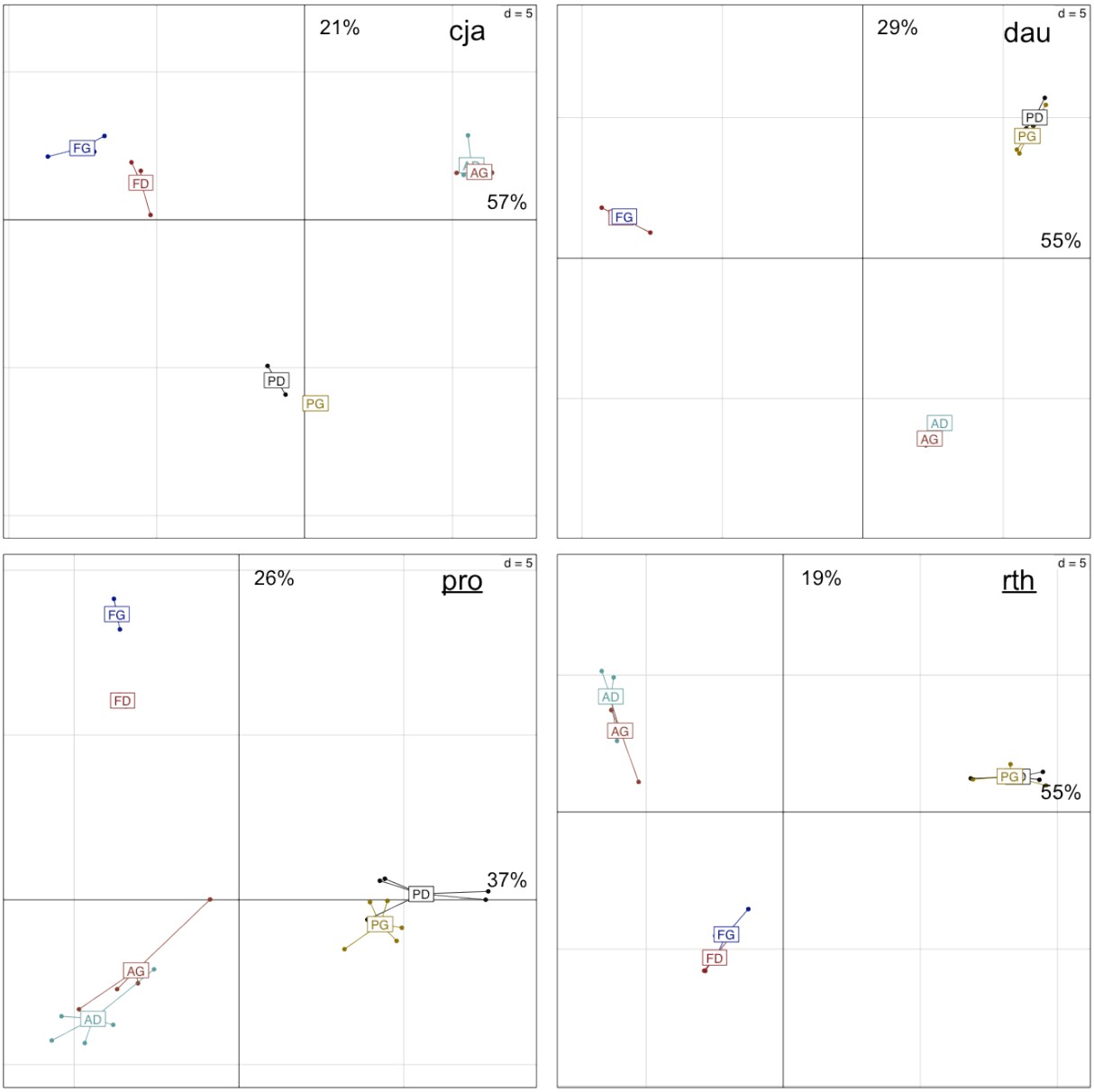


Figure 17 : Analyse en composante principale des profils RISA des échantillons des temps 1, 2 et 3 (avant traitement).
AD: aisselle droite ; AG: aisselle gauche ; PD: pied droit ; PG: pied gauche ; FD: hémi-front droit ; FG: hémi-front gauche. Dénomination des 4 individus : pro, cja, rth et dau.

Comme démontré par les études basées sur le séquençage du gène *rrs*, la diversité microbienne est fonction du site de prélèvement [45]. Si l'on regroupe toutes les données sur une seule ACP, la plupart des échantillons se regroupent en fonction de leur site de prélèvement plus que de leur hôte (Figure 17). L'exception est faite pour le site « Pieds » de l'individu CJA, qui ne se regroupe pas avec les autres échantillons provenant des autres individus sur la même zone de prélèvement.

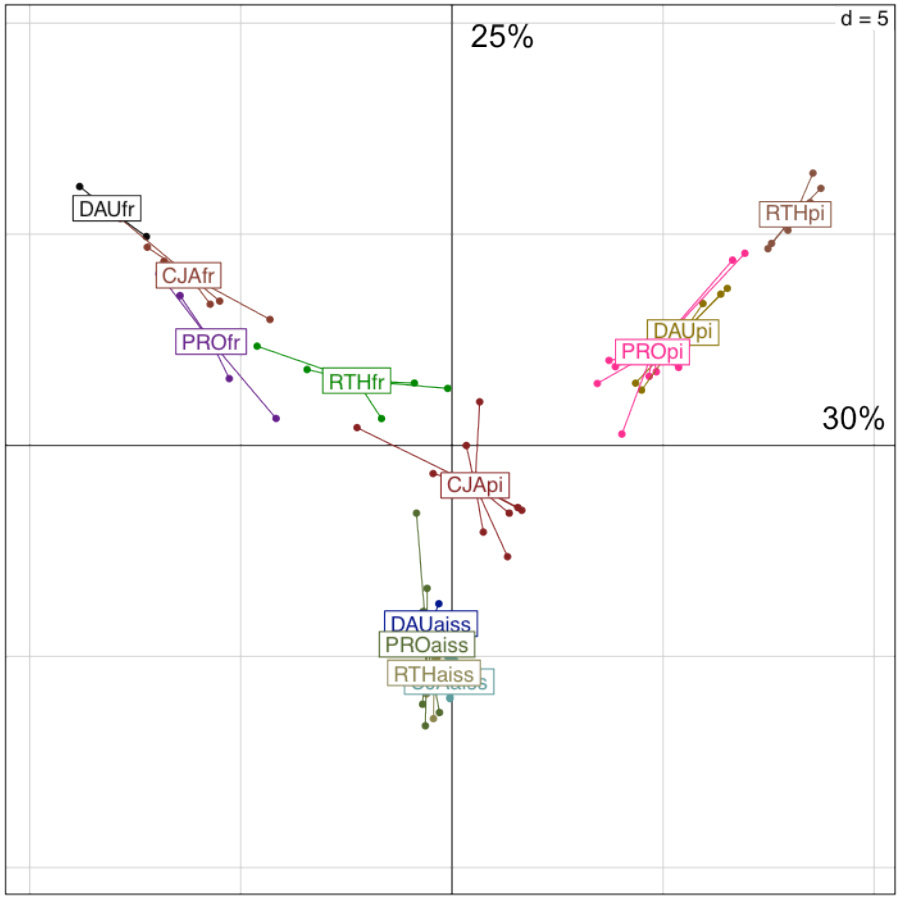


Figure 18 : Analyse en composante principale des profils RISA des échantillons des temps 1, 2 et 3 (avant traitement).
DAU, CJA, RTH et PRO sont les codes représentant les différents individus. « fr » signifie que les échantillons proviennent du front, « pi » des pieds et « aiss » des aisselles.
Pour les échantillons CJApi les temps t4 à t8 du pied gauche, n'ayant subi aucun traitement, ont été rajoutés afin de vérifier que les profils RISA étaient bien tous différents des autres échantillons provenant du pied des autres individus, et que la différence observée avec les échantillons des autres individus n'était pas artefactuelle.

Similitude de la diversité RISA selon l'individu

S'il est bien possible de mettre en évidence par ACP une structuration de la variation des profils RISA en fonction de la zone de prélèvement, la structuration de la variation en fonction de l'individu hôte est moins évidente (Figure 18). Le front et les aisselles sont des environnements où l'effet individu n'est pas très observable en termes de diversité (RISA). En revanche, la communauté microbienne du pied semble bien individu-spécifique, car il y a une claire séparation des profils RISA sur la représentation graphique. Pour des raisons pratiques et dans le cadre du test d'addition d'onctions sur les 3 parties du corps, chaque site et individu va être examiné au cas par cas afin de bien

déterminer s'il y a bien un effet visible du produit sur la communauté microbienne. Mettre toutes les données sur une seule ACP écraserait les évolutions des communautés liées à différents facteurs comme le facteur temps ou le facteur utilisation de traitement.

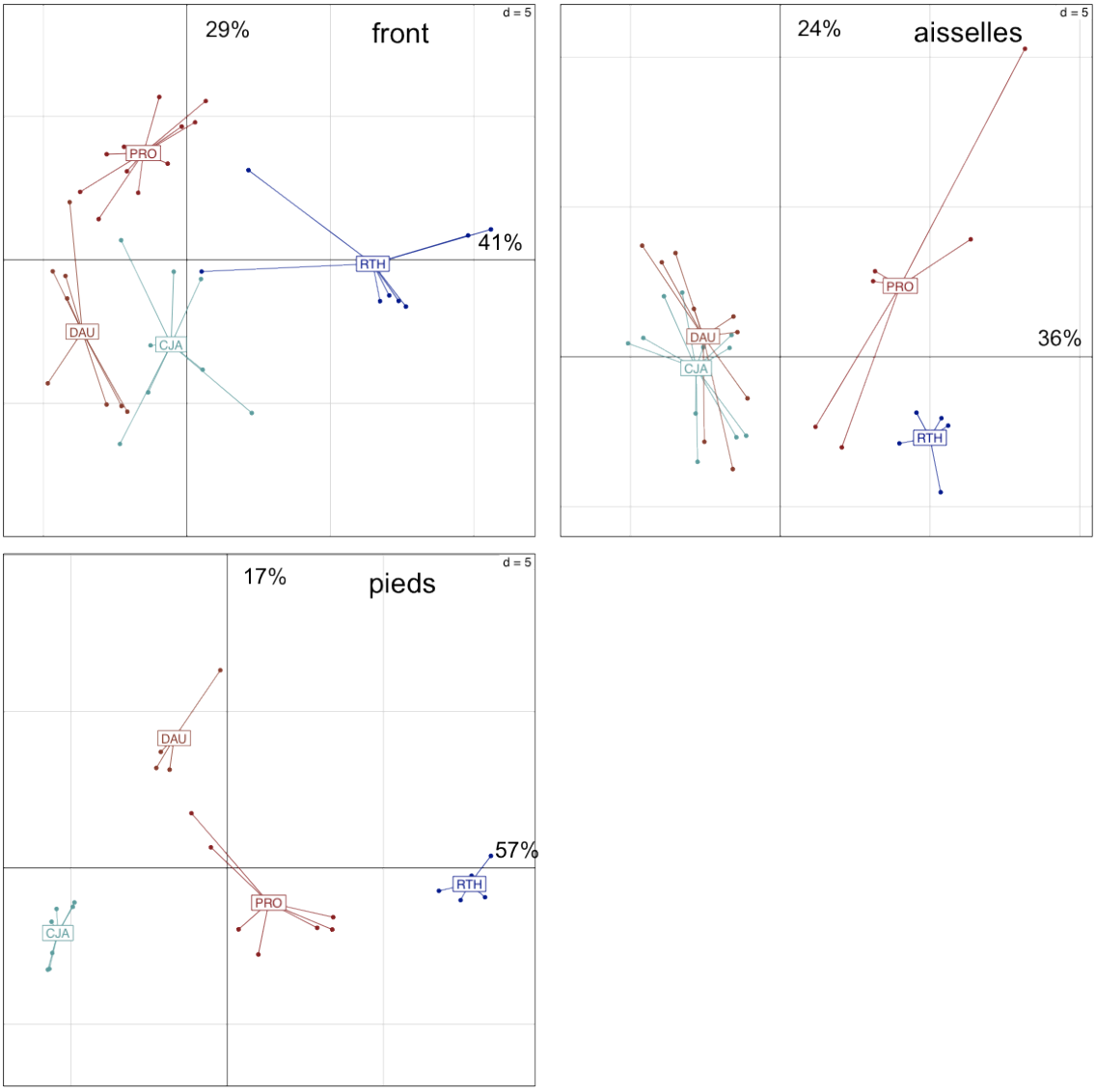


Figure 19 : Analyse en composante principale des profils RISA des échantillons des temps 1, 2 et 3 classés entre sites de prélèvements (avant traitement).
DAU, CJA, RTH et PRO sont les codes représentant les différents individus.

Evolution de la diversité RISA selon l'environnement aisselle

L'aisselle est un environnement où les profils électrophorétiques semblent très instables au cours du temps (Figure 19). Une des premières observations réalisée est la chute du rendement de l'ADN à partir du moment où le déodorant a été appliqué sur la peau sur la zone traitée. En effet, dès le temps t4 les quantités récupérées sont en moyenne dix fois inférieures à ce qu'elles sont sur les zones contrôles (tableau annexe 6). Il est envisageable que le prélèvement puisse impacter la quantité d'ADN extraite, du fait du frottement et de la récolte de la biomasse microbienne, mais les rendements des extractions des autres zones cutanées n'ont pas subi de pertes aussi flagrantes.

Pour les échantillons de l'aisselle gauche des individus cja, dau et pro, la diversité est fluctuante dans le temps malgré l'absence de traitement au déodorant. Il n'y a que pour l'individu rth où la diversité reste stable du temps t1 au temps t8 pour l'aisselle gauche. Pour le côté droit, la diversité est instable quelques fois avant traitement, mais on remarque que pour les 4 individus, l'évolution dans le temps des profils RISA semble plus importante que sur le côté gauche. L'évolution est très rapide pour les 4 individus où le changement des profils des électrophorégrammes se fait dès l'échantillonnage suivant la 1ère utilisation du déodorant (Figures annexe 4 à 10). Puis les profils se stabilisent à des temps différents selon les individus. Les profils et leurs évolutions sont différents et restent propres à l'individu échantillonné.

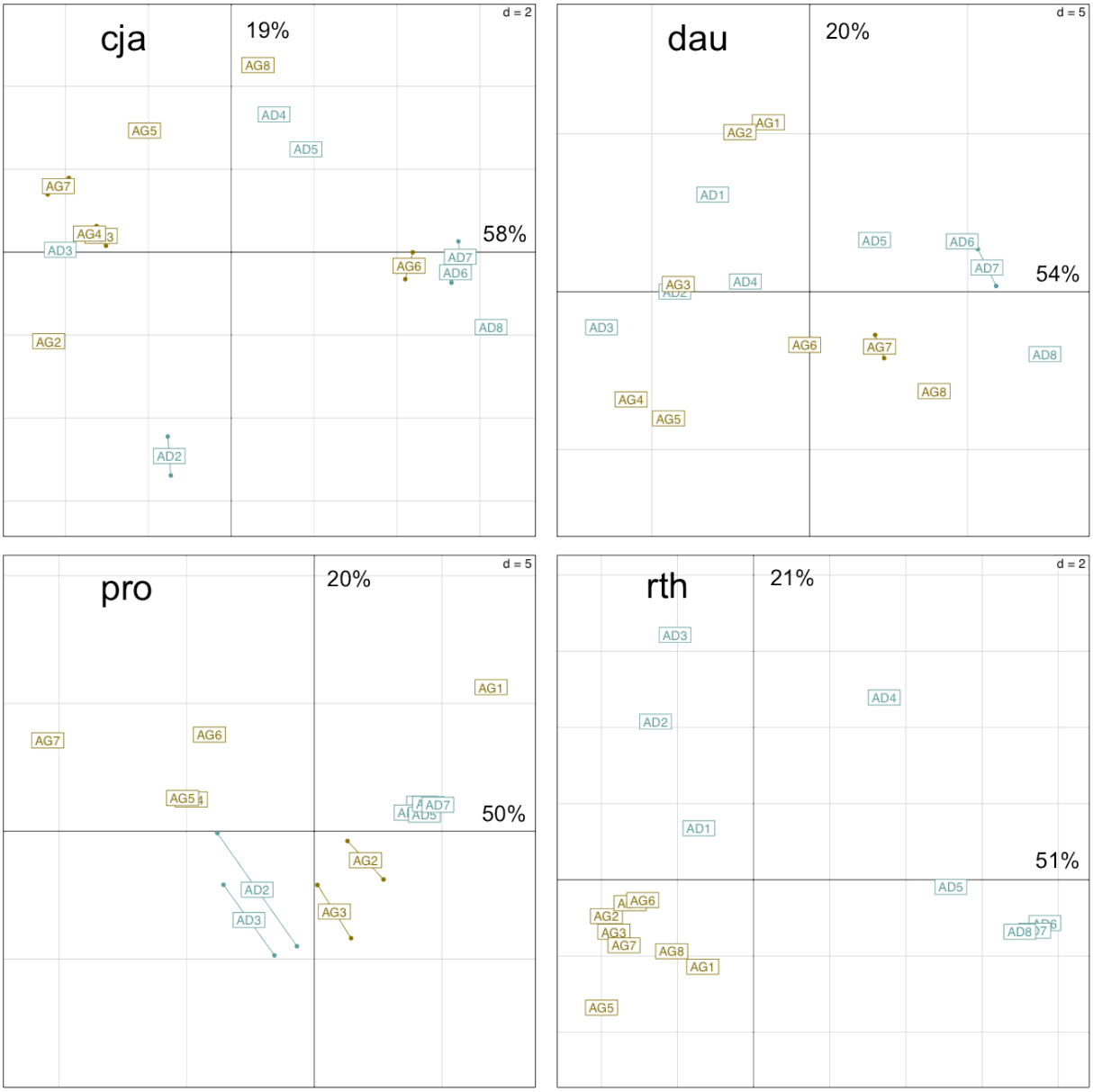


Figure 20 : Analyse en composante principale des profils RISA des échantillons des aisselles (avant traitement).
DAU, CJA, RTH et PRO sont les codes représentant les différents individus. Les temps de prélèvements t1 à t8 sont représentés. En doré sont les échantillons de l'aisselles gauche n'ayant reçu aucune onction, en bleu les échantillons provenant de l'aisselle droite recevant une application cutanée journalière à partir du temps t3 + 1 jour.

En conclusion pour la zone cutanée aisselle, le traitement au déodorant influe sur la quantité de biomasse microbienne échantillonnée car les quantités d'ADN récupérées sont beaucoup moindres dès la 1ère utilisation, suggérant un effet antiseptique. A partir des profils RISA il semble également que l'on voit un effet sur la diversité microbienne, même si la variabilité de cet environnement et/ou le fait que les individus utilisaient du déodorant avant influe sur la structure de la communauté du côté témoin et rend plus

difficile l'analyse. En effet l'individu rth n'utilise pas habituellement de déodorant et il semble que sa communauté n'ait donc pas subi de rupture d'utilisation de produit au préalable de l'expérience. Sur cet individu, l'effet déodorant est très perceptible car la communauté de l'aisselle gauche ne change pas. Pour l'individu pro, les données pré-traitement fluctuent et ce peut être la cause d'un usage préalable de déodorant. Il y a eu un changement des habitudes d'hygiène et cela a pu très vite impacter la communauté.

Evolution de la diversité RISA selon l'environnement pied

La figure 20 nous montre les résultats graphiques de l'analyse ACP des différents profils RISA de chaque individu pour les communautés du pied gauche et du pied droit. Bien que cette figure nous permette de voir globalement l'évolution des profils, elle nécessite des analyses supplémentaires des électrophorégrammes afin d'affirmer la détection d'un effet du produit testé.

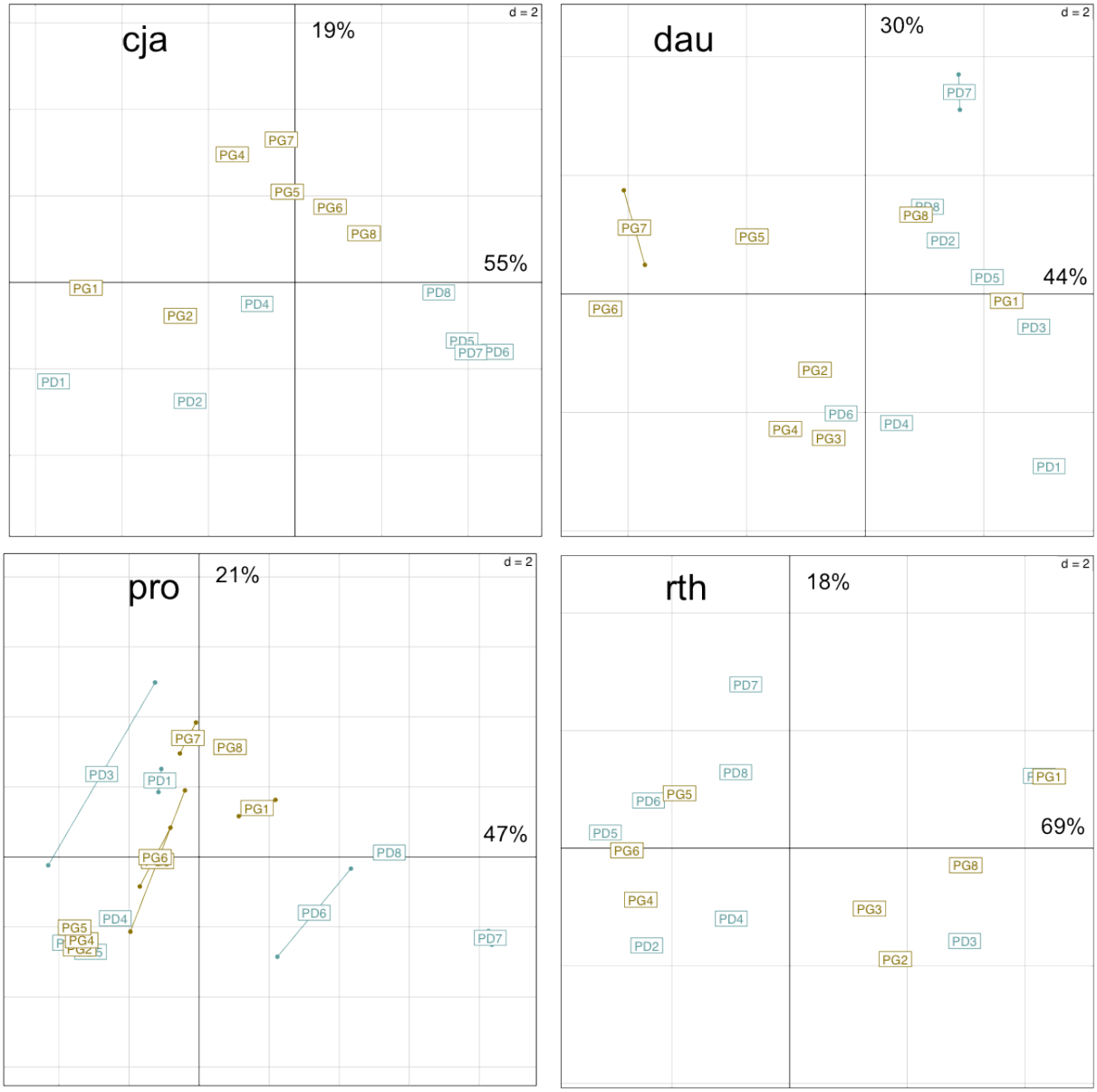


Figure 21 : Analyse en composante principale des profils RISA des échantillons des pieds (avant traitement).
DAU, CJA, RTH et PRO sont les codes représentant les différents individus. Les temps de prélèvements t1 à t8 sont représentés. En doré sont les échantillons du pied gauche n'ayant recu aucune onction, en bleu les échantillons provenant du pied droit recevant une application cutanée journalière à partir du temps t3 + 1 jour.

Les échantillons des zones gauches et droites des 4 individus avant traitement restent relativement stables dans le temps, sauf pour l'individu pro où l'on observe une légère variation des électrophorégrammes (Figures annexes 11 à 16). Les profils RISA des échantillons du côté gauche ne fluctuent pas selon les temps de prélèvement pour les 4 individus. Après traitement, les profils RISA des échantillons droits des 4 individus évoluent légèrement. Une influence du traitement peut être détectée pour les individus

pro et rth, mais pour les 2 autres individus dau et cja, si une évolution des profils RISA semble être observable, la sensibilité de notre outil ne permet pas de différencier une influence du traitement et la variabilité intrinsèque des profils RISA des échantillons (Figures annexes 13 à 15).

Pour l'environnement pied, il semble que la communauté microbienne soit plus stable dans le temps que celle de l'aisselle. Il est possible qu'il y ait un effet de l'application sur la structure de la communauté, mais l'impact est relativement faible et individu-dépendant, l'effet n'a pas été observable pour certains sujets (ie. individus cja et dau).

Evolution de la diversité RISA selon l'environnement front

L'analyse en composante principale des 4 individus ne montre aucune différence de communauté entre les temps t7 et les temps avant traitement du côté où il y a eu une application cutanée. Les temps t1 et t7 se retrouvent souvent à proximité sur les ACP (Figure 21). Comme l'analyse en composante principale tend à maximiser les différences, les échantillons se retrouvent très éloignés sur la représentation graphique, alors que les analyses des électrophorégrammes nous montrent une grande stabilité de cet environnement (Figures annexes 17 à 20). Il n'y a que pour l'individu rth où les profils de communauté présentent une grande diversité de pics par rapport aux profils des autres individus (Figure annexe 20). Cela est inhabituel, d'autant plus que les profils des 3 autres individus concordent avec les études précédentes. Le front, cet environnement sébacé, est généralement dominé par des cellules bactériennes appartenant au genre *propionibacterium* et possède une faible diversité de genres détectés, si l'on se fie aux approches basées sur le séquençage *16S* [76].

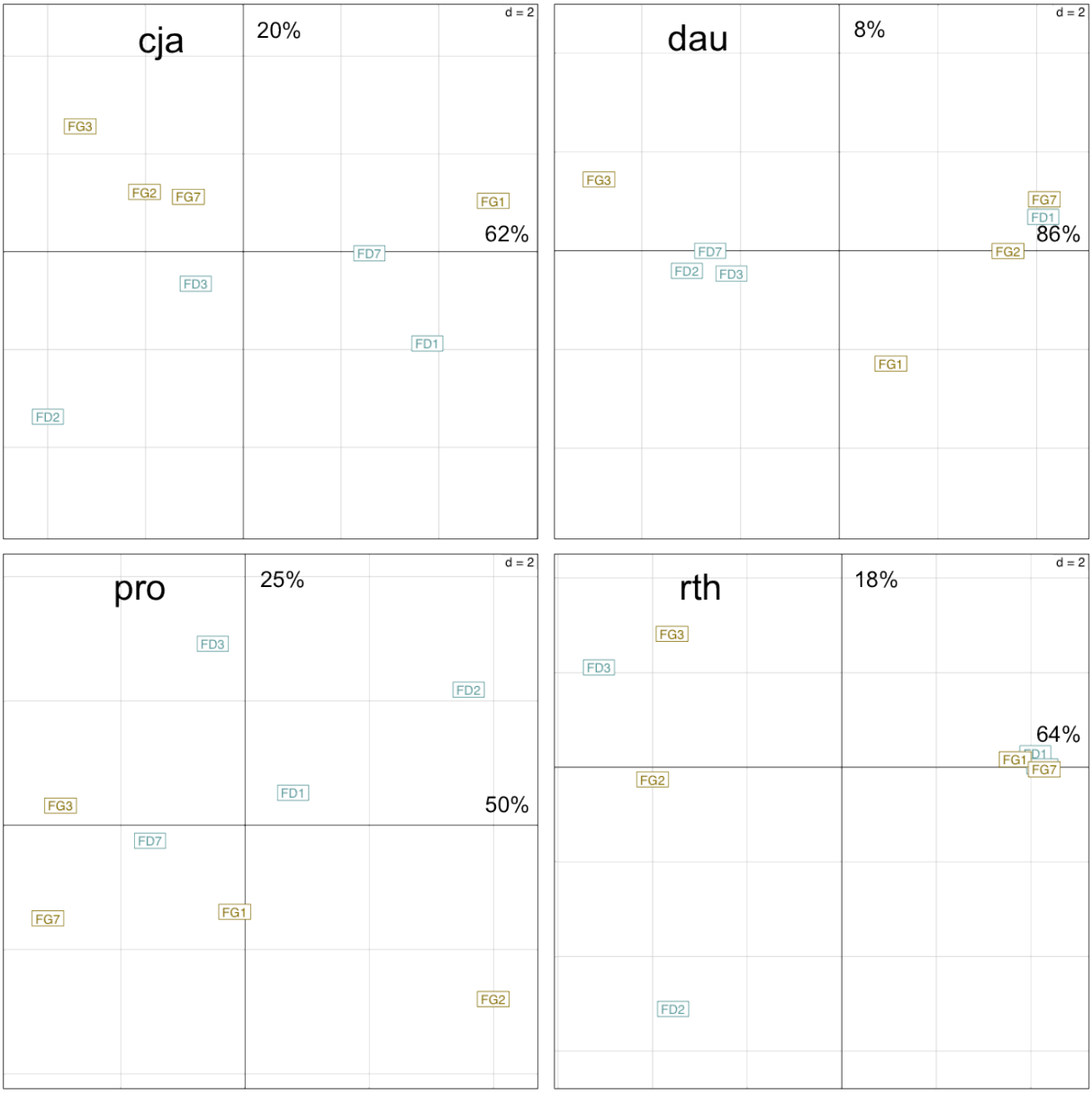


Figure 22 : Analyse en composante principale des profils RISA des échantillons des hémi-fronts.
DAU, CJA, RTH et PRO sont les codes représentant les différents individus.
Les temps de prélèvements t1 à t8 sont représentés. En doré sont les échantillons du côté gauche du front n'ayant reçu aucune onction, en bleu les échantillons provenant du côté droit du front recevant une application cutanée journalière à partir du temps t3 + 1 jour.

En conclusion, la communauté microbienne du front de l'individu rth possède un profil RISA singulier de cet environnement, et sa grande variabilité dans le temps ne semble pas non plus caractéristique. S'il y a un effet de l'application cutanée sur la structure de la communauté, il n'est pas visible par cette méthodologie car il y a beaucoup trop de variations au sein d'un même site de prélèvement. Pour les autres individus, les profils

RISA sont très stables et aucun impact des onctions sur les communautés n'est observable.

Conclusion de l'étude RISA

La technique dite RISA est un outil rapide, de bonne sensibilité pour détecter des variations de structures taxonomiques des communautés microbiennes et a fournit des résultats d'intérêt concernant les microbiotes des différentes zones de la peau humaine. Ces communautés présentent dans le temps des niveaux de stabilité très différents selon les sites explorés. L'aisselle semble abriter une communauté microbienne très instable dans le temps, mais malgré cela, il est possible d'observer que les communautés sont sensibles à l'utilisation du déodorant. Le fait que certains individus utilisaient préalablement au début de l'étude des déodorants a permis de déceler des différences de réaction de leur microbiote.

Pour les communautés du pied on peut observer qu'elles semblent plus stables dans le temps. Il semble qu'il y ait un effet de la crème sur la communauté microbienne du pied chez certains individus. Pour les autres, les effets observés sont faibles et donc difficilement discernables de la variabilité de la technique ou de la variabilité intrinsèque du microbiote.

La communauté du front paraît très stable et possède un profil très similaire entre les individus, sauf pour l'individu RTH. Aucun effet de l'application cutanée n'est détectable quand on compare les microbiotes entre zones traitées et non traitées.

Il apparaît au cours de cette étude que l'application de produits cosmétiques a une influence sur la diversité microbienne dépendant, selon les cas du site d'application, du produit utilisé et du patient. La technologie RISA montre toutefois ses limites en ne permettant pas d'identifier ni les microorganismes impactés positivement ou négativement ni les fonctions microbiennes à l'origine de cette adaptation. C'est la raison qui nous a conduits à favoriser dans une seconde étape le séquençage shot-gun de l'ADN métagénomique extrait en vue d'identifier les microorganismes et leurs fonctions différemment distribuées entre les échantillons prélevés avant et après traitement.

Impact des produits cosmétiques sur le profil métagénomique du microbiote cutané

Grâce à la très rapide évolution des technologies de séquençage haut débit, les problèmes initiaux liés à l'importante quantité d'ADN requise pour un séquençage se sont progressivement résolus. Le séquençage est maintenant possible avec l'ADN métagénomique extrait d'un seul échantillon de peau obtenu selon les protocoles précédemment présentés, à la seule exception des sites les plus secs où la densité bactérienne y est beaucoup plus faible. Ces contingences nous ont contraints à limiter notre étude à 2 sites de la peau qualifiés d'humides, l'aisselle et le pied et le front comme site sébacé. Ces 3 zones sont de plus celles qui font l'objet du plus d'attention de la part des sociétés pharmaceutiques et cosmétiques dont le développement de nouveaux produits pourrait bénéficier d'une connaissance accrue du potentiel fonctionnel de ces différents microbiotes.

L'utilisation d'une approche méthodologique comme la comparaison de profils RISA a permis de mettre en évidence que certains composés sélectionnés appliqués sur la peau entrainaient des modifications taxonomiques au sein du microbiote. C'est par le recours au séquençage massif de l'ADN bactérien extrait que ces modifications taxonomiques ont pu être précisées et les principales fonctions affectées par les traitements déterminées. Si des variations n'ont pu être observées pour certains environnements tels que le front ou certains échantillons provenant du pied, nous allons voir si la technologie de séquençage offre une meilleure sensibilité et permet de détecter certains changements au niveau taxonomique et fonctionnel.

En plus d'apporter une première application technologique, les données collectées dans cette étude ont permis de mieux connaître fondamentalement les spécificités taxonomiques et fonctionnelles des zones cutanées échantillonnées. Comme l'ont démontré les études taxonomiques *16S*, le microbiote cutané humain n'est pas réparti quantitativement et qualitativement de façon uniforme et équivalente sur l'ensemble de la surface du corps mais présente d'importantes différences taxonomiques entre des sites bien différenciés, ces variations inter-sites pouvant dépasser celles entre individus [45]. Ce résultat peut être interprété comme la preuve d'une adaptation par différents microorganismes aux conditions physico-chimiques et/ou biologiques spécifiques qui caractérisent les différents sites de la peau humaine. L'humidité ou au contraire son

absence, la présence ou non de composés sébacés sont très certainement fortement impliqués dans la structuration taxonomique de ces communautés comme l'a montré l'analyse des profils taxonomiques. L'analyse des fonctions potentiellement exprimées par les gènes de ces différents microbiotes est une première étape pour décrypter les mécanismes qui ont permis la colonisation spécifique de ces sites et qui participent ainsi à leur potentiel adaptatif.

Comparaison de la diversité taxonomique du microbiote.

Les fréquences de distributions des 50 premiers genres bactériens détectés d'après l'analyse des métagénomes des microbiotes « Pied », « Aisselle » et « Front » sont disponibles en donnée annexe (tableau annexe 7). La méthode d'annotation utilise les séquences référencées dans le système de classification SEED comme appartenant à un niveau taxonomique précis. Ces séquences peuvent appartenir à des marqueurs phylogénétiques tels que le gène *rrs* mais aussi à diverses fonctions microbiennes associées à un rang taxonomique. Il y a donc un risque potentiel de mal associer des séquences à leur taxonomie originelle, du fait de la méconnaissance de la majorité des génomes d'un environnement. Néanmoins le système de classification « Lowest common ancestor » permet de réduire ce risque en classant des séquences présentes au sein de 2 génomes dans le niveau taxonomique supérieur contenant ces 2 génomes. Les représentations des genres sont exprimées en pourcentage de distribution relatif, ce qui signifie que le nombre de séquences associées à un certain niveau taxonomique est rapporté au nombre de séquences totales annotées d'un jeu de données métagénomique. Cette technique de normalisation permet d'uniformiser les jeux de données, et de ne pas apporter plus de poids statistique à un métagénome qui contiendrait plus de lectures.

Les 3 genres dont les représentants sont majoritairement détectés dans les microbiotes cutanés observés dans le chapitre précédent (séquençage de pools d'ADN provenant de différentes zones cutanées) sont également à nouveau majoritairement détectés d'après l'analyse des séquences des différents métagénomes, même si leur proportion relative varie selon les sites (Figure 22). Confirmant les études taxonomiques d'analyse du gène *rrs*, les zones Aisselle et Pied montrent une prédominance des organismes affiliés aux

genres *Staphylococcus* et *Corynebacterium* par rapport à la zone Front dont les métagénomes révèlent une prédominance de bactéries du genre *Propionibacterium*. La représentation des autres genres bactériens est beaucoup plus faible (Figure 22 et 23).

Les traitements cosmétiques comme d'ailleurs ceux préconisés pour le traitement des pathologies de la peau impliquent des applications répétées sur une base journalière ou hebdomadaire. L'évolution temporelle tant taxonomique que fonctionnelle de la structure du microbiote est donc déterminante pour évaluer l'impact des substances appliquées. Une analyse rapide et globale montre une évolution taxonomique dans le temps du microbiote quel que soit le traitement appliqué, y compris pour les échantillons contrôles. Ce résultat confirme que la peau constitue un écosystème évolutif imposant des changements taxonomiques constants au sein de la structure des communautés bactériennes, composante variable selon le site d'échantillonnage.

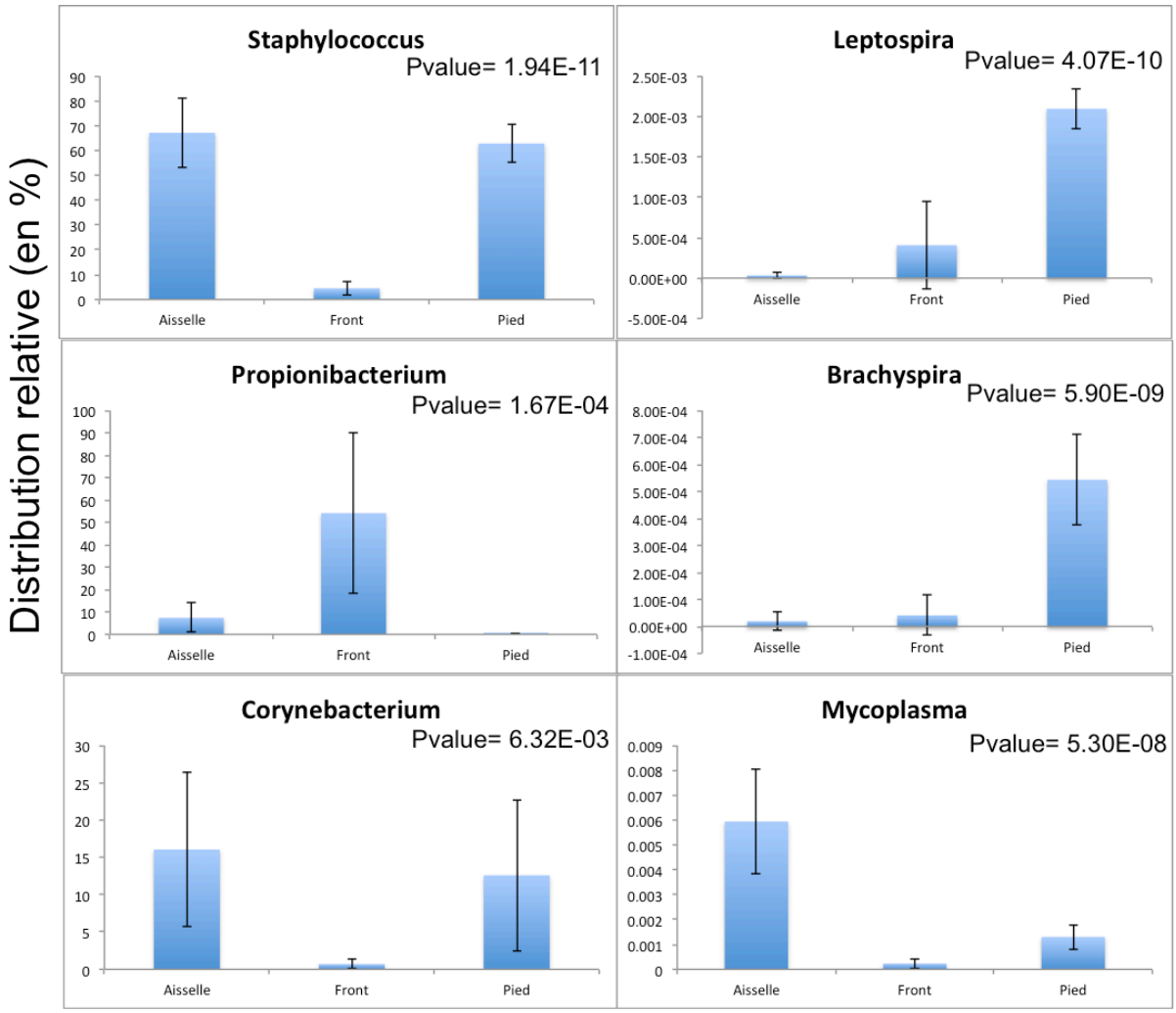


Figure 23 : Distribution relative (en %) des genres majeurs du microbiote cutané (*Staphylococcus*, *Propionibacterium* et *Corynebacterium*) ainsi que des genres statistiquement différents entre les 3 zones cutanées (données basées sur l'annotation MG-RAST, Evalue<10^{-5}).
Les données sont normées avec le nombre de séquences annotées. Un test Anova a été réalisé pour déterminer si les distributions sont différentes entres les environnements (*p-value*<10^{-3}).

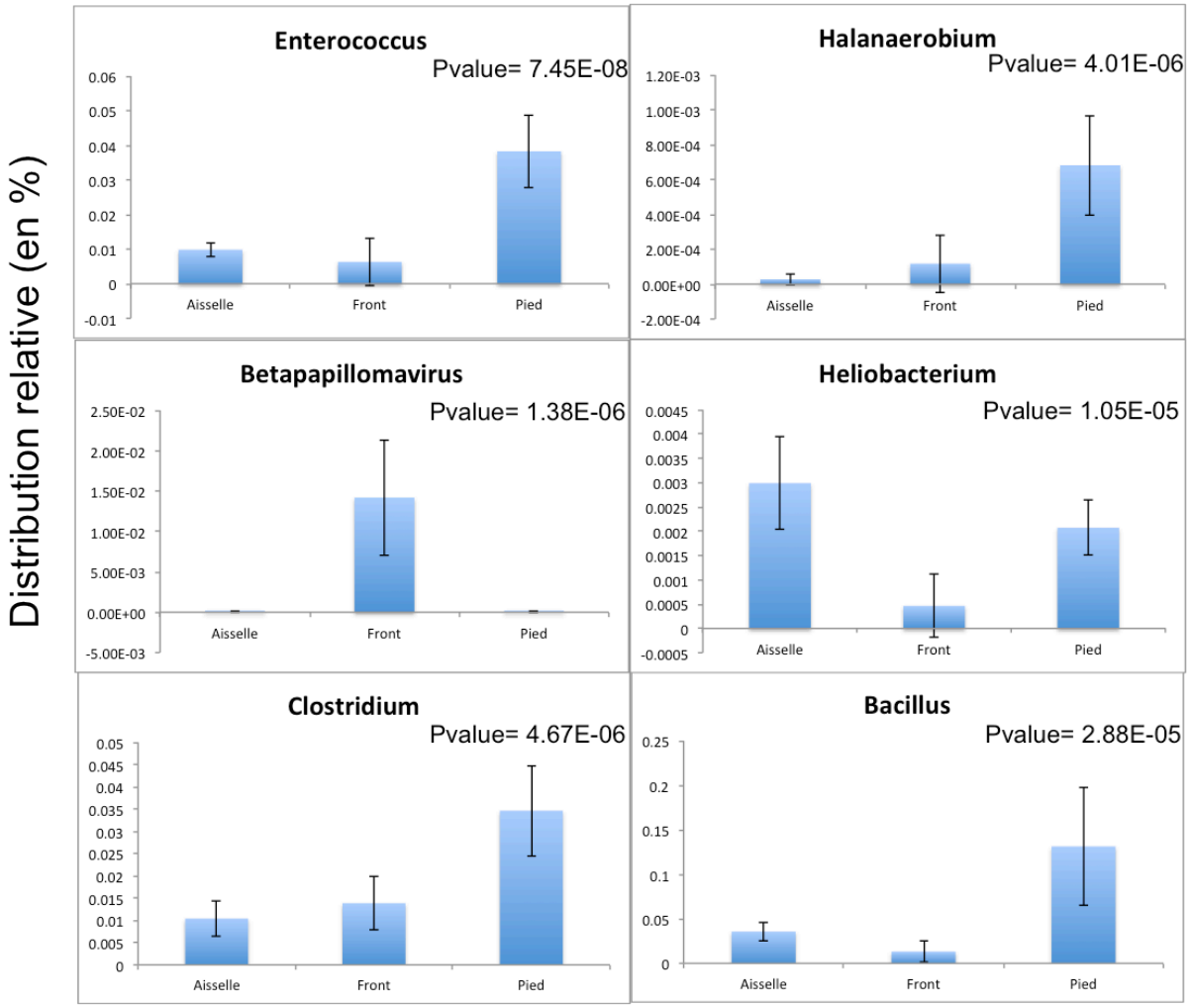


Figure 24 : Distribution relative (en %) des genres statistiquement différents les 3 zones cutanées (données basées sur l'annotation MG-RAST, Evalue<10^{-5}).
Les données sont normées avec le nombre de séquences annotées. Un test Anova a été réalisé pour déterminer si les distributions sont différentes entres les environnements (*p-value* <10^{-3}).

Environnement Pied

Les séquences associées aux genres *Leptospira* et *Brachyspira* sont détectées en très faible quantité sur l'environnement pied relativement aux genres majoritaires mais statistiquement, leur présence est significative et représentative du pied (Figure 22). Ce ne sont pas des genres ayant été référencés comme des colonisateurs habituels du microbiote cutané ce qui laisse planer un doute sur la fiabilité de l'annotation. S'il s'avérait ultérieurement que ces séquences ne qualifient pas des bactéries de ces deux genres *Leptospira* et *Brachyspira*, il n'en demeure pas moins que les microbiotes cutanés des pieds sont composés de microorganismes spécifiques de ces sites. *Enterococcus* est

également un genre dont les séquences affichent un niveau de représentation significativement plus élevé dans les métagénomes extraits du pied (Figure 23). Des microorganismes classés dans l'ordre des *Enterobacteriales* ont été détectés précédemment [90] mais l'association au microbiote cutané de représentants affiliés au genre *Enterococcus* n'est pas un fait commun. L'affiliation de séquences de métagénomes de pieds au genre *Halanaerobium* même à un niveau de représentation relative très faible mais cependant supérieur aux autres sites est surprenante (Figure 23). C'est un genre dont aucun représentant n'a été référencé comme résident cutané. Les organismes cultivés représentatifs de ce genre ont très souvent été isolés de milieux hypersalins [149]. Plus attendue est la détection de séquences affiliées au genre *Clostridium* (pourcentage de représentation significatif de 0,035%) pour lequel des représentants (même si l'affiliation avait été établie au niveau de l'ordre, *Clostridiales*) avaient été détectés par une approche taxonomique directe principalement sur les zones sèches et humides de la peau [76].

Pour l'analyse de l'application cutanée sur les échantillons provenant du pied, les profils de diversité avant traitement sont similaires entre les individus, mais les communautés évoluent différemment après le traitement, avec une baisse faible mais significative de la prédominance de séquences associées au genre *Staphylococcus* et une faible augmentation de la détection de séquences associées à *Corynebacterium* chez l'individu DAU (Figure 24). Pour l'individu RTH, l'évolution de la diversité est beaucoup plus marquée avec une forte augmentation de la détection de séquences associées à *Staphylococcus* qui représentent 90 % de la totalité des séquences après traitement (Figure 25). Les genres mineurs sont différemment distribués entre les échantillons traités des individus RTH et DAU, mais leur pourcentage de représentation est relativement faible comparativement aux 3 genres majeurs et il est difficile d'imputer à ces microorganismes les variations de distribution que l'on observera dans la comparaison fonctionnelle (Tableaux annexes 8 et 9).

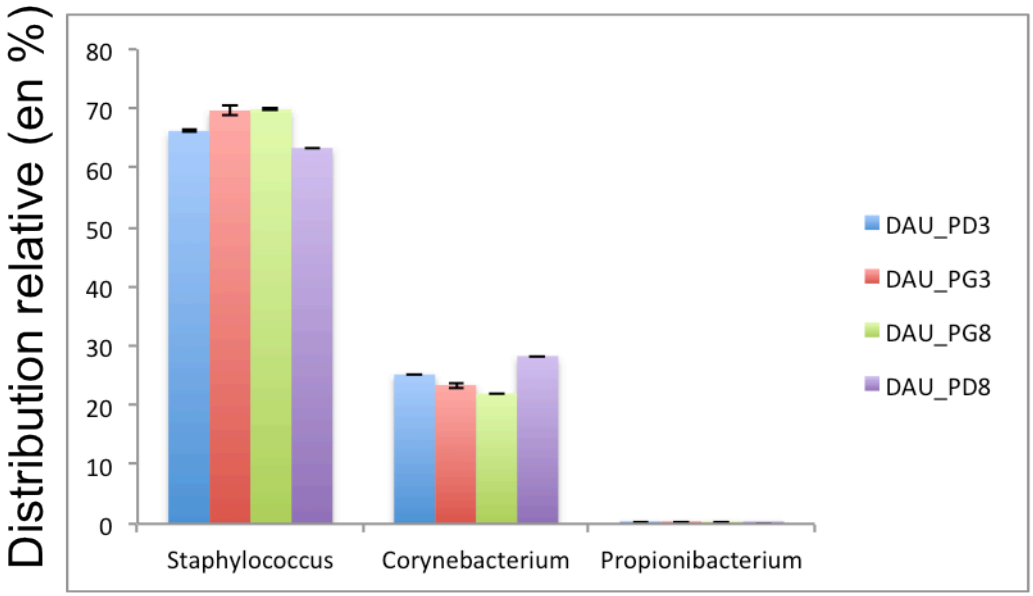


Figure 25 : Distribution relative des 3 genres majeurs bactériens cutanés dans les métagénomes du pied appartenant à l'individu DAU.
DAU PD3: échantillon pied droit au temps t3 (avant traitement) ; DAU PD8: échantillon pied droit au temps t8 (après traitement) ; DAU PG2: échantillon pied gauche au temps t3 ; DAU PG8: échantillon pied gauche au temps t8.
La comparaison des échantillons DAU PD8 aux autres par un test statistique t de Welch nous donne des *p-values* significatives (*Staphylococcus* $8.55*10^{-4}$; *Corynebacterium* $4.16*10^{-4}$; *Propionibacterium* $6.84*10^{-3}$).

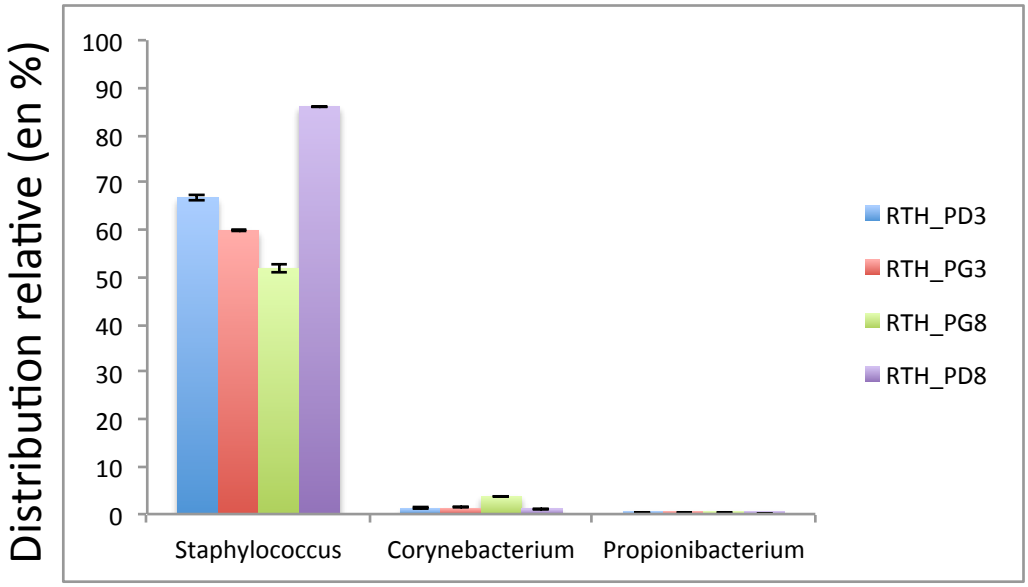


Figure 26 : Distribution relative des 3 genres majeurs bactériens cutanés dans les métagénomes du pied appartenant à l'individu RTH.
RTH PD3: échantillon pied droit au temps t3 (avant traitement) ; RTH PD8: échantillon pied droit au temps t8 (après traitement) ; RTH PG2: échantillon pied gauche au temps t3 ; RTH PG8: échantillon pied gauche au temps t8.

Environnement Aisselle

Cet environnement possède quelques similitudes dans sa distribution taxonomique avec l'environnement pied, comme il était attendu. Néanmoins certaines différences sont à noter comme le fait que moins de genres soient surreprésentés dans cet environnement. Dans les genres statistiquement différents entre les 3 environnements (Figure 22 et 23, p 102 et 103), seules les séquences affiliées aux genres *Heliobacterium* et *Mycoplasma* sont en abondance relative supérieure dans les métagénomes de microbiotes de l'aisselle. Le genre *Heliobacterium* n'est pas référencé dans la littérature comme contenant des représentants faisant partie du microbiote cutané mais ce genre appartient à l'ordre des *Clostridiales* qui a été détecté dans les études précédentes [76]. Les bactéries du genre *Mycoplasma* n'ont pas été décrites comme associées au microbiote cutané même si certaines études basées sur le gène *rrs* rapportent la détection de Firmicutes auxquels appartiennent ces microorganismes. C'est un genre dont plusieurs espèces ont été associées à des pathologies pulmonaires [150] ou sexuellement transmissibles [151], rendant tout à fait plausible la peau comme habitat au moins à titre transitoire de représentants appartenant à ce genre.

La comparaison des évolutions des sites des aisselles traitées et non traitées des 2 volontaires (DAU et RTH) est représentée avec une baisse de détection du genre *Staphylococcus* (Figures 26 et 27). Mais l'amplitude des évolutions des zones traitées est beaucoup plus importante que celles des zones contrôles (Le genre *Staphylococcus* a une distribution relative qui descend en dessous de 10% pour les zones traitées alors que sur les zones contrôles il reste à plus de 45% de représentation relative). Cette perte est compensée par un accroissement de la détection de séquences bactériennes appartenant au genre *Propionibacterium* pour les 2 individus, et également au genre *Corynebacterium* pour l'individu DAU. Ce dernier genre voit sa distribution relative baisser dans les échantillons traités de l'individu RTH (Figure 27). Un grand nombre de genres non dominants changent significativement de distribution entre les métagénomes traités et non traités des 2 individus (Tableaux annexes 10 et 11). Il est intéressant souligner que les métagénomes d'aisselle de l'individu RTH ayant subi un traitement sont les seuls échantillons où les pourcentages de représentation des ces genres mineurs sont importants, même si notre analyse comparative ne les sélectionne pas comme significatifs (données non montrées): 12% des séquences annotées sont

associées au genre *Dermacoccus*, 4% à *Enhydrobacter* et 3% à *Micrococcus*. D'autres genres atteignent au moins 1% de représentation : *Acinetobacter*, *Finegoldia* et *Paracoccus*.

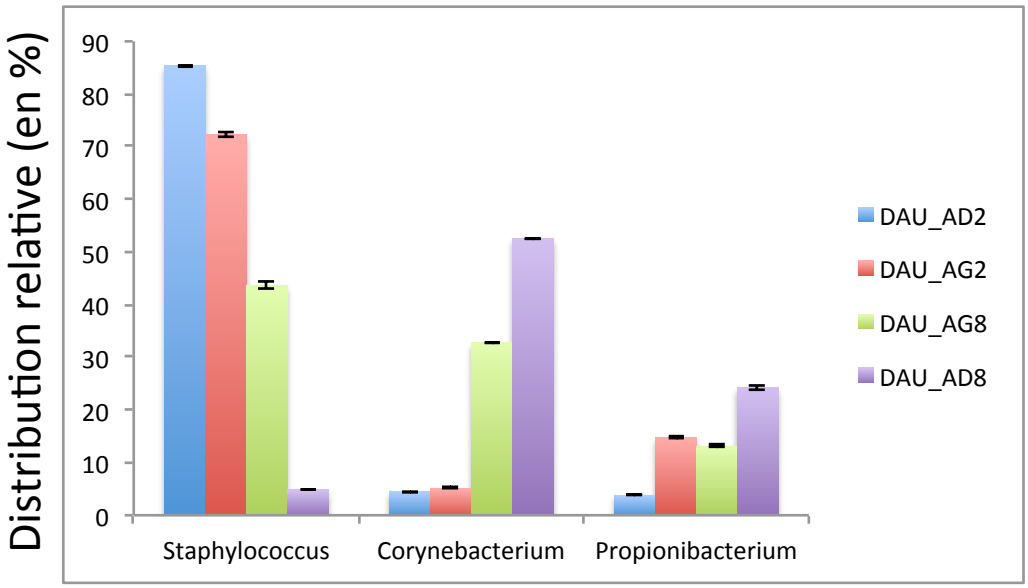


Figure 27 : Distribution relative des 3 genres majeurs bactériens cutanés dans les métagénomes de l'aisselle appartenant à l'individu DAU.
DAU AD2: échantillon aisselle droite au temps t2 (avant traitement) ; DAU AD8: échantillon aisselle droite au temps t8 (après traitement) ; DAU AG2: échantillon aisselle gauche au temps t2 ; DAU AG8: échantillon aisselle gauche au temps t8.
Les écarts types sont calculés à partir des assignations taxonomiques provenant des 2 jeux de données métagénomiques d'un même échantillon (2 séquençages ont été effectués par échantillon).

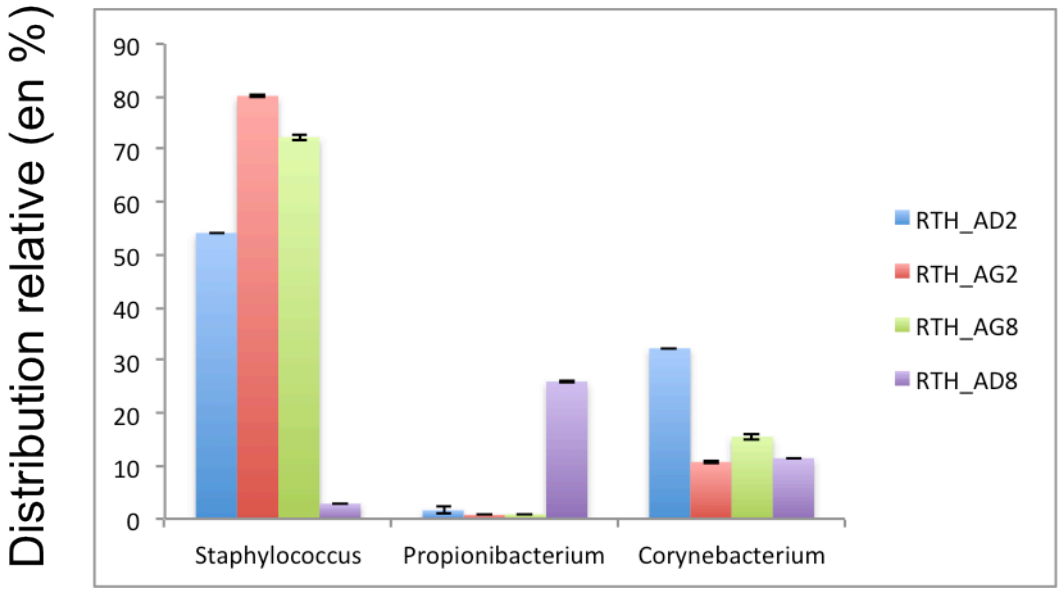


Figure 28 : Distribution relative des 3 genres majeurs bactériens cutanés dans les métagénomes de l'aisselle appartenant à l'individu RTH.
RTH AD2: échantillon aisselle droite au temps t2 (avant traitement) ; RTH AD8: échantillon aisselle droite au temps t8 (après traitement) ; RTH AG2: échantillon aisselle gauche au temps t2 ; RTH AG8: échantillon aisselle gauche au temps t8.
Les écarts types sont calculés à partir des assignations taxonomiques provenant des 2 jeux de données métagénomiques d'un même échantillon (2 séquençages ont été effectués par échantillon).

Environnement Front :

Peu de genres ayant une différence significative de distribution entre les 3 sites étudiés sont majoritaires sur l'environnement Front. Mis à part le genre *Propionibacterium*, peu d'organismes semblent caractériser ce microbiote confirmant les études taxonomiques basées sur l'analyse des gènes *rrs* (cf chapitre 1, « Inventaires améliorés »). Il est toutefois intéressant d'observer que la distribution relative de lectures associées au genre *Betapapillomavirus* est plus importante dans les métagénomes de front. Peu d'études ont été effectuées sur le virome du microbiote cutané, la seule référence disponible citant déjà les papillomavirus comme faisant partie de la microflore cutanée [83]. Il semblerait que le front soit une des zones du corps humain où ces virus se soient implantés.

Des problèmes méthodologiques (forte contamination de la solution d'ADN métagénomique par l'ADN de l'hôte) n'ont pas permis d'estimer la représentation de ces 3 genres sur l'individu RTH. Mais pour l'individu DAU, la prédominance de séquences associées au genre *Propionibacterium* se retrouve dans tous les échantillons, aucun effet significatif de l'onguent n'a été détecté sur les 3 genres majeurs cutanés (Figure 28). Il

est également à noter que malgré les faibles variations et le faible nombre de genres différemment distribués dans les métagénomes de front (Tableau annexe 12), le champignon *Malasseizzia* voit sa détection baisser de 0,6 à 0,2%, ce qui est la plus grosse variation que l'on ait pu détecter sur cette zone. Le fait qu'aucune différence n'ait été observée en RISA mais qu'une différence de proportion du genre *Malasseizia* soit détecté en séquençage est compréhensible, car l'amplification RISA ne se focalisait que sur l'amplification de l'inter-gène *16S-23S*, alors que les génomes d'eucaryotes ne contiennent pas de gènes codant la sous-unité ribosomale 16S mais 18S.

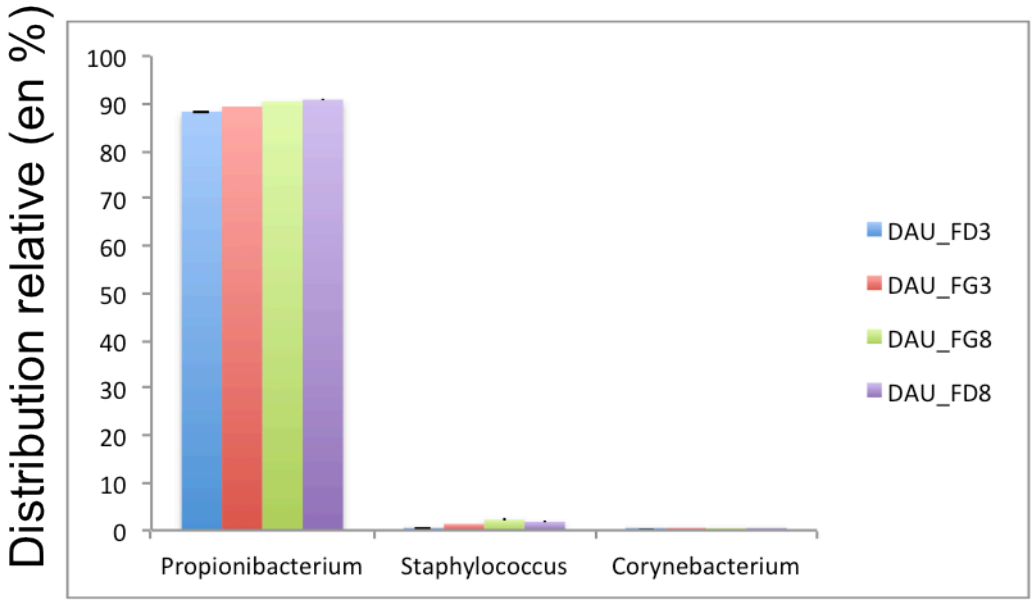


Figure 29 : Distribution relative des 3 genres majeurs bactériens cutanés dans les métagénomes du front appartenant à l'individu DAU.
DAU FD3: échantillon hémi-front droit au temps t3 (avant traitement) ; DAU FD8: échantillon hémi-front droit au temps t8 (après traitement) ; DAU FG2: échantillon hémi-front gauche au temps t3 ; DAU FG8: échantillon hémi-front gauche au temps t8.

Comme expliqué auparavant, d'autres genres sont différemment détectés entre les échantillons mais les pourcentages de représentation de ces genres sont relativement faibles et il est difficile d'imputer les putatifs changements de distributions fonctionnelles qui seront observables à ces génomes. (Tableaux annexes 8 à 12). Néanmoins il est intéressant de constater que l'on retrouve plus de genres différemment

détectés dans les échantillons où un effet des onguents avait été détecté avec la technologie RISA.

Evolution temporelle du potentiel fonctionnel du microbiote.

L'analyse a été compliquée par la présence d'ADN humain contaminant dans les métagénomes du front de l'individu (RTH) que le pipeline d'annotation utilisé n'a pu totalement écarter. Cette difficulté ne nous a toutefois pas empêchés de comparer les distributions fonctionnelles des métagénomes provenant des 3 zones cutanées en vue de tenter d'interpréter la présence de ces organismes d'après les activités qu'ils étaient susceptibles de spécifiquement réaliser sur chacune des zones explorées. Un de nos objectifs était notamment de déterminer si la proximité taxonomique notée entre les microbiotes des environnements aisselle et pied se confirmait au niveau fonctionnel et si les plus fortes disparités taxonomiques notées avec le front se révélaient également dans le cadre des fonctions ou bien si un fort niveau de redondance au sein du microbiote était susceptible de limiter les différences.

Dans l'interprétation des résultats selon le fait que les échantillons aient bénéficié d'un traitement ou non, l'analyse en composante principale des fréquences de distribution fonctionnelle des échantillons des aisselles de chacun des individus montre des variations au sein des microbiotes entre les échantillons traités (D8 et D8S) et les échantillons contrôles (D2(S), G2(S) et G8(S), Figure 29 a-b-c). Mais si l'évolution est bien apparente, les distributions fonctionnelles apparaissent différentes entre les échantillons traités des 2 individus, car les représentations des échantillons sur l'ACP ne se regroupent pas (Figure 29 c). Ce résultat peut être interprété comme une réaction différente selon les individus des microbiotes des aisselles à un traitement à la pierre d'alun. Il est intéressant de corréler ces résultats aux différences de pratique des deux utilisateurs. L'individu DAU utilisait au préalable de l'expérimentation un traitement à la pierre d'alun, pas l'individu RTH. Le fait d'un retour aux conditions « habituelles » pour le microbiote de l'individu DAU et à des conditions nouvelles pour le microbiote de l'individu RTH peut expliquer les différences de distributions fonctionnelles observées.

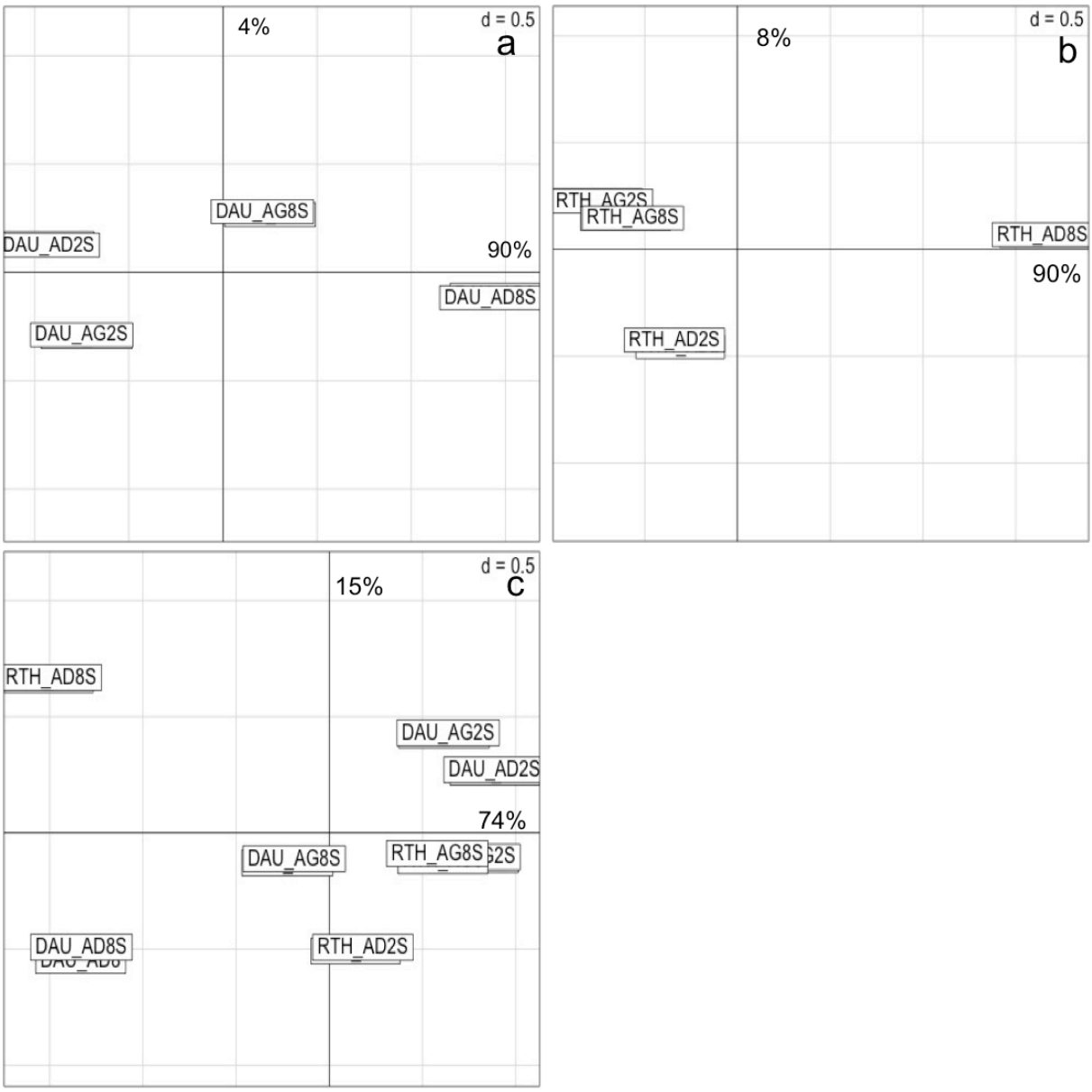


Figure 30 : Analyse en composante principale basée sur l'analyse des distributions fonctionnelles au niveau fonctionnel 3 de l'annotation MG-RAST (Evalue<$10^{-5)}$ des échantillons provenant de la zone cutanée aisselle.
a: Echantillon des aisselles de l'individu DAU ; b: Echantillons des aisselles de l'individu RTH ; c: Echantillons des aisselles des individus DAU et RTH.
Nomenclature des échantillons: A: Aisselles ; 2: les échantillons du temps t2 ; 8: Les échantillons du temps t8 ; D: échantillons droit (avec traitement) ; G: échantillons gauche (contrôle) ; S: Répétition de séquençage de l'échantillon (les résultats de distributions étant très reproductible, les échantillons sans S ne se voient pas sur la représentation graphique car ils se trouvent dessous la répétition de séquençage S).

L'analyse en composante principale des fréquences des séquences métagénomiques assignées à une fonction des microbiotes prélevés sur les pieds montre que les distributions fonctionnelles des échantillons traités de l'individu RTH sont plus différentes que les distributions entre les échantillons contrôles (Figure 30 a). Pour l'individu DAU, il apparaît autant de différences entre tous les groupes de métagénomes, qu'ils proviennent du pied gauche ou droit, avant ou après traitement (Figure 30 b). Ces résultats ne permettent pas d'exclure un effet potentiel du traitement appliqué sur le pied mais montrent aussi une évolution fonctionnelle du microbiote dans le temps et variable selon les individus ce qui rend difficile d'en distinguer l'effet traitement. Sur cette zone cutanée, il a été également observé que les modifications des distributions fonctionnelles ne sont pas les mêmes entre les échantillons traités pour les 2 individus, suggérant une différence dans la réponse fonctionnelle des microbiotes au traitement (Figure 30 c).

L'analyse en composante principale des fréquences des séquences métagénomiques assignées à une fonction des microbiotes du front n'a pas permis de détecter des différences significatives des fonctions bactériennes détectées sur l'individu DAU, ni des modifications de ces profils au cours du temps liées au traitement ou non (Figure 30 d, l'individu RTH n'ayant pas été pris en compte du fait d'un niveau de contamination en ADN humain trop important). Le fait que cet individu comporte beaucoup de contaminations en ADN humain est en désaccord avec les recherches expérimentales menées dans le chapitre 2. Il est donc possible que pour certains individus, la quantité d'ADN humain récupérée soit importante, mais cet effet est dépendant du site de prélèvement car bien que les métagénomes du pied et de l'aisselle du même individu contenaient également des séquences ADN, leur nombre était beaucoup plus faible.

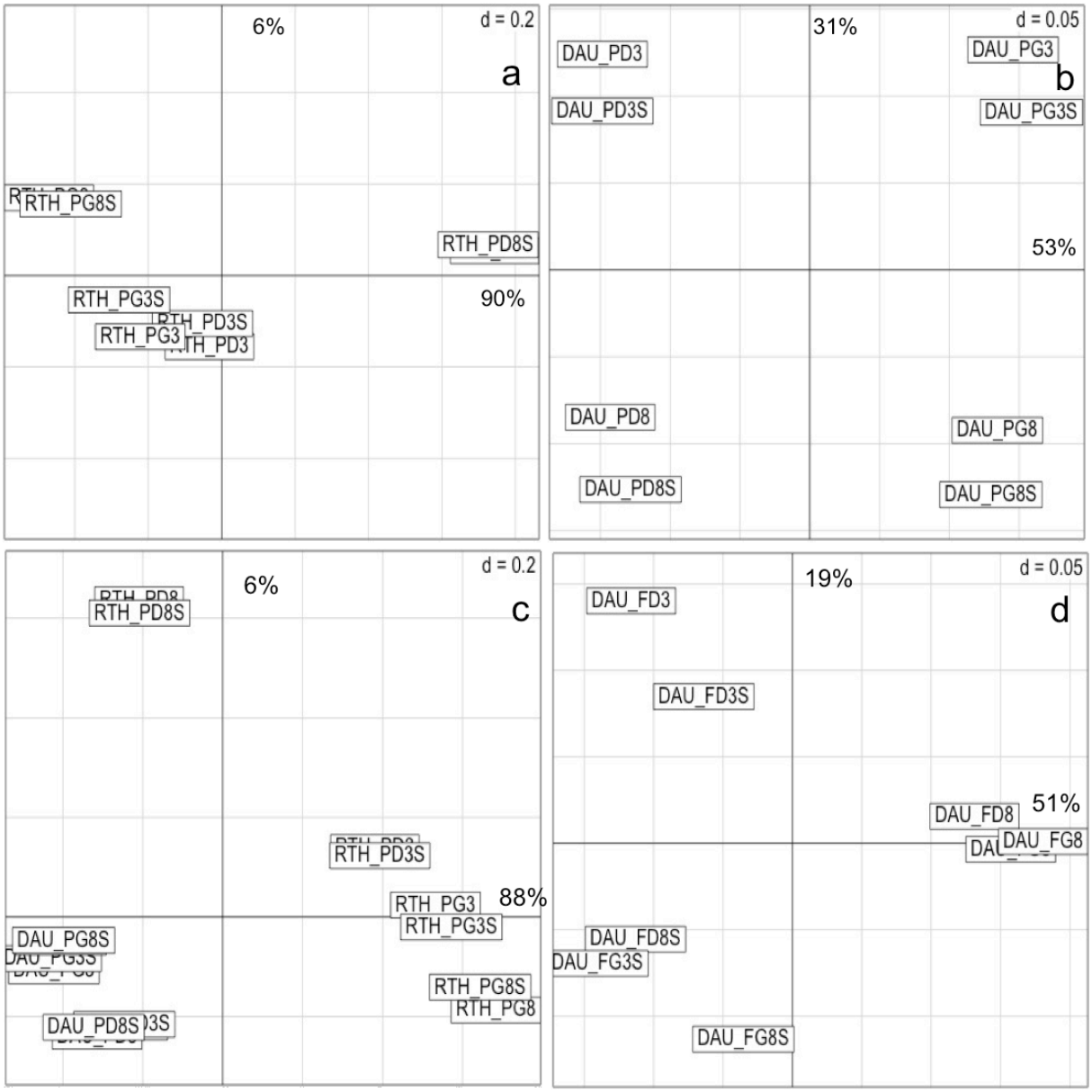


Figure 31 : Analyse en composante principale basée sur l'analyse des distributions fonctionnelles au niveau fonctionnel 3 de l'annotation MG-RAST (Evalue<10^{-5}) des échantillons provenant de la zone cutanée du pied et du front.
a: ACP des échantillons pieds de l'individu RTH ; b: ACP des échantillons pieds de l'individu DAU ; c: ACP des échantillons pieds des individus RTH et DAU ; d: Echantillon du front de l'individu DAU.
Nomenclature des échantillons : P: pieds ; F: front ; 2: les échantillons du temps t2 ; 8: Les échantillons du temps t8 ; D: échantillons du côté droit (traité) ; G échantillons de la zone gauche (contrôle) ; S: Répétition de séquençage de l'échantillon.

Très clairement, notre étude a montré que les sites « pied » et « aisselle », contrairement au site « front » étaient ceux pour lesquels les microbiotes évoluaient le plus au cours du temps et répondaient le plus fortement aux traitements quand on considérait les fonctions bactériennes dominantes détectées dans les séquences des métagénomes.

Une analyse statistique des séquences à l'aide du logiciel STAMP permet de cibler les fonctions les plus affectées par les traitements (y compris l'évolution dans le temps). Cependant, le niveau très élevé des différences dans le nombre de séquences détectées au niveau de chaque site contraint à leur définir des paramètres statistiques spécifiques pour en extraire les fonctions affectées par ces traitements. Les valeurs statistiques *p-value* (valeur permettant de donner un niveau de confiance à la différence entre les distributions observées) est dépendant du nombre d'échantillons, du nombre de séquences à l'intérieur de chaque fonction ainsi que du nombre de fonctions détectées. Ces chiffres étant variables d'une zone à une autre, c'est ainsi que les *p-values* retenues diffèrent entre les sites et individus avec comme exemples (DAU aisselle *p-value* < 10^{-4} tableau annexe 13 ; RTH aisselle *p-value* < 10^{-6} tableau annexe 14 ; DAU pied *p-value* < 10^{-3} tableau annexe15 ; RTH pied *p-value* < 10^{-5} tableau annexe 16 ; DAU front *p-value* < 0,01 Tableau 5). Néanmoins les différences de E-values sélectionnées reflètent quand même l'influence plus ou moins forte que peuvent avoir les traitements sur le microbiote cutané.

Tableau 5 : Fonctions différemment distribuées entre les échantillons du front de l'individu DAU droit temps 8 et les autres échantillons du front.

Level3	DAU FD8: mean rel. freq. (%)	DAU FD8: std. dev. (%)	Autres: mean rel. freq. (%)	Autres: std. dev. (%)	p-values
Ribosome LSU eukaryotic and archaeal	7.18E-04	7.29E-05	2.35E-03	3.91E-04	1.36E-04
Glutathione: Biosynthesis and gamma-glutamyl cycle	2.36E-04	5.03E-05	7.76E-04	1.93E-04	1.96E-03
RNA polymerase I	2.36E-04	5.03E-05	7.56E-04	1.74E-04	1.97E-03
Proteasome subunit alpha archaeal cluster	2.33E-05	2.33E-05	2.75E-04	1.10E-04	3.55E-03
Proteasome eukaryotic	7.68E-04	1.63E-04	2.30E-03	6.36E-04	3.89E-03
Lysine fermentation	6.66E-02	5.75E-04	7.38E-02	3.52E-03	5.38E-03
Melibiose Utilization	2.90E-02	6.63E-04	2.38E-02	1.97E-03	6.24E-03
Selenoprotein O	0.00E+00	0.00E+00	1.17E-04	5.81E-05	6.29E-03
Glycolysis and Gluconeogenesis, including Archaeal enzymes	5.08E-01	5.12E-04	5.22E-01	7.04E-03	6.53E-03
Fatty acid degradation regulons	6.81E-02	4.23E-04	7.42E-02	3.13E-03	6.67E-03
DNA repair, bacterial UmuCD system	4.54E-02	3.86E-04	4.87E-02	1.63E-03	6.82E-03
RNA polymerase II	1.18E-04	2.51E-05	3.69E-04	1.27E-04	6.90E-03
Ribosome SSU eukaryotic and archaeal	4.10E-04	1.95E-04	1.95E-03	4.82E-04	6.96E-03

Fonctions potentiellement ciblées par les onguents

Si les études métagénomiques permettent d'étudier le potentiel fonctionnel des environnements sans *a priori*, l'examen de la composition physico-chimique des onguents appliqués différentes zones traitées peut permettre d'identifier certaines fonctions susceptibles d'être affectées par ces changements de conditions environnementales. Ainsi, pour le traitement à la pierre d'alun, l'effet bactériostatique de ce traitement devrait entrainer une sélection des génomes avec des gènes codant des mécanismes de résistance comme des pompes à efflux permettant d'expulser les ions d'aluminium ou codant la production de molécules chélatrices [145]. En dehors de certaines pompes à efflux comme les ATPases [152] les machineries cellulaires impliquées dans la résistance à l'aluminium n'ont encore été que très peu étudiées.

Le sous-système multiDrugs Resistance efflux pumps au sein de la base SEED représente le mieux les systèmes de pompes à efflux pouvant potentiellement être impliqués dans la résistance à l'aluminium. De façon assez surprenante, l'abondance des séquences codant de telles fonctions est plus faible dans les métagénomes constitués à partir d'échantillons prélevés sur des sites traités par rapport aux autres sites, même si le seuil significatif de différence que nous avons imposé n'est pas atteint (Figure 31).

Le caractère très ubiquiste des pompes à efflux et leur manque de spécificité ne facilitent toutefois pas leur détection dans les jeux de données de séquences métagénomiques. Il est tout à fait envisageable que, du fait d'un niveau trop faible de similarité de séquences, ces mécanismes ne soient pas référencés dans le sous-système utilisé de la base SEED. La forte représentation des pompes à efflux au sein des génomes liée à leurs nombreux rôles pour la cellule peut aussi expliquer que leur implication dans la résistance à la pierre d'alun n'ait pas sélectionné des populations bactériennes particulières dont beaucoup possédaient les mécanismes adéquats. On ne peut non plus exclure la possibilité que les mécanismes de résistance ne soient pas liés à l'efflux de l'aluminium ou encore que son impact sur la communauté soit négligeable et qu'il ne constitue pas ainsi un facteur sélectif.

Les autres domaines fonctionnels potentiellement impactés par le traitement au déodorant sont ceux qui permettent la dégradation de composés provenant de la sueur, justifiant la recherche des gènes associés à la dégradation du lactate (Figure 31). A

nouveau, les résultats observés sont surprenants car pour les 2 individus, le potentiel fonctionnel impliqué dans l'utilisation du lactate augmente dans les métagénomes des microbiotes correspondant aux zones traitées. Ce résultat sur des zones où la production de sueur est censée être moindre pourrait être interprété au moins par un manque d'impact du lactate produit par la sueur sur les bactéries commensales de la peau. Le fait qu'une potentielle source de nutriments ne s'accompagne pas d'une multiplication des microorganismes capables de les utiliser ne pourrait s'expliquer que par un manque de disponibilité du lactate dans la sueur, hypothèse que des études ciblées devraient pouvoir confirmer ou infirmer.

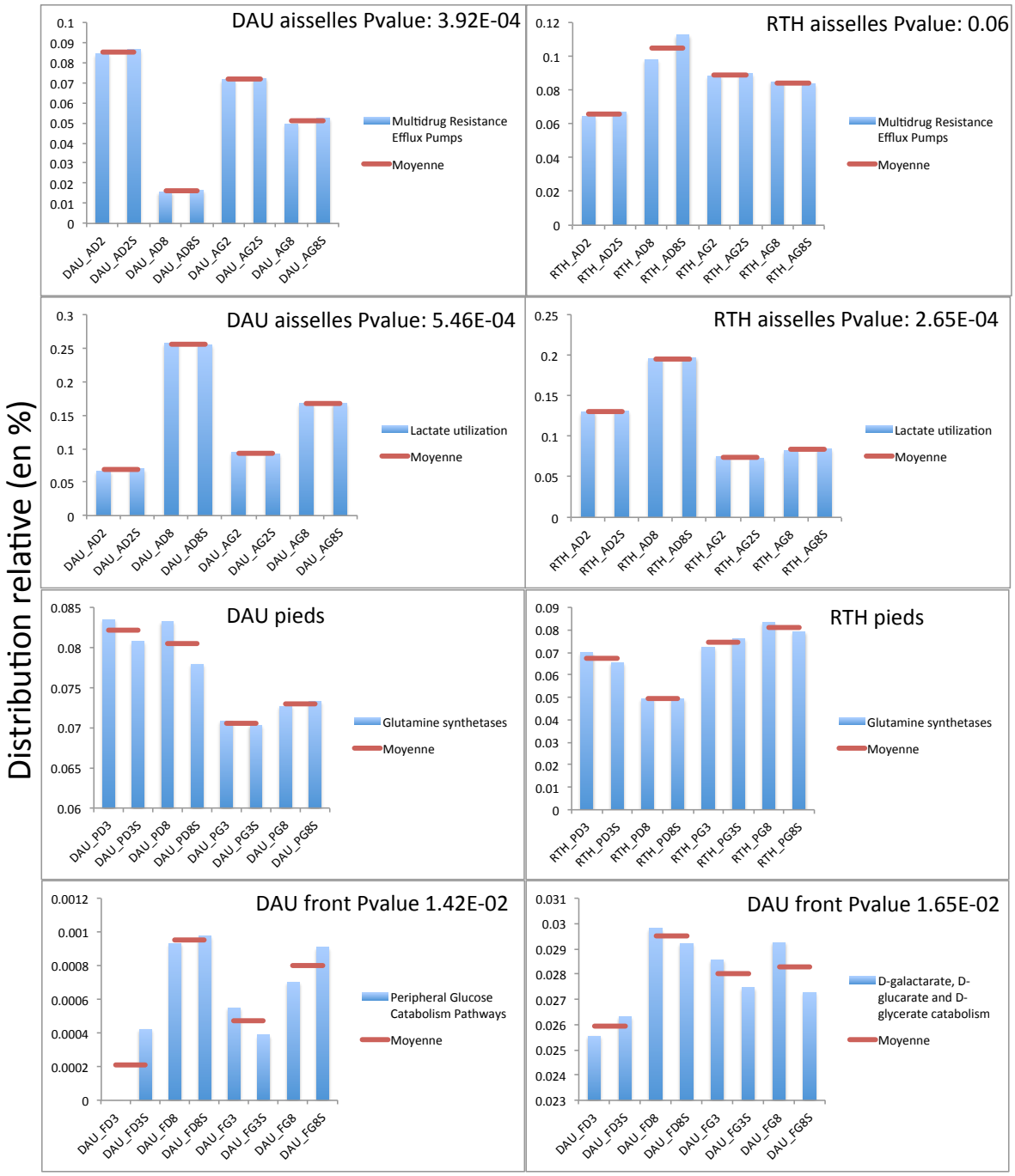


Figure 32 : Distribution relative (en %) de fonctions ayant subi un putatif impact des traitements effectués à la zone cutanée (données basées sur l'annotation MG-RAST, Evalue<10^{-5}).
Les données sont normées avec le nombre de séquences annotées. Un test t de Welch est réalisé pour déterminer si les distributions sont différentes entres les environnements.

Le traitement apporté sur les pieds fait intervenir le N-acétylglucosamine-6-phosphate comme principe actif, molécule largement impliquée dans le métabolisme bactérien ce qui pourrait expliquer le niveau quantitativement équivalent dans les différents

métagénomes des 2 patients des gènes codant la glutamine synthase, enzyme impliquée dans la formation de N-acétylglucosamine-6-phosphate à partir de fructose-6-phosphate et de glutamine [153] (Figure 31) et donc ubiquiste. L'avantage conféré par le traitement aux bactéries dépourvues de l'enzyme ne serait pas suffisant pour leur conférer un réel accroissement de fitness.

Enfin, pour l'environnement front, les polysaccharides contenus dans la formule sont susceptibles d'exercer une pression de sélection sur le potentiel d'utilisation de sources carbonées. Dans le tableau fonctionnel des fonctions différemment distribuées, 2 sous-systèmes D-galactarate, D-glucarate and D-glycerate catabolism et Peripheral Glucose Catabolism Pathways sont associés à la dégradation des sucres qui entrent dans la composition du principe actif de la crème étudiée. Ces fonctions sont effectivement détectées dans les métagénomes extraits des sites traités à des niveaux supérieurs par rapport aux contrôles, la *p-value* associée étant cependant faible et ne dépassant pas la valeur arbitrairement fixée pour l'attribution de différences significatives, expliquant leur absence dans le tableau 5 (*ie. p-value* $< 0{,}01$ Figure 31).

En conclusion les impacts attendus sur la variation quantitative de gènes au sein des microbiotes codant des fonctions bactériennes susceptibles d'être spécifiquement affectées par les traitements appliqués sur 3 sites de la peau n'ont que très minoritairement été mis en évidence. Ceci peut s'expliquer par le manque de connaissances fondamentales sur les mécanismes impliqués, comme c'est le cas pour la réponse à l'aluminium. Notre étude n'a soit alors pas ciblé les bonnes fonctions ou la réponse de celles-ci, quand elles étaient réellement impliquées, a été masquée par une variation quantitative élevée de gènes codant des fonctions pas nécessairement en rapport direct avec une réponse au traitement.

C'est ainsi que l'analyse des séquences des différents métagénomes fait ressortir un grand nombre de gènes dont l'occurrence est statistiquement différente entre sites traités et contrôles, confirmant par là les résultats de l'analyse taxonomique sur un impact des traitements (tableaux annexes 13 à 16 et Tableau 5). Nos résultats montrent toutefois que la réponse peut être moins spécifique qu'escomptée en complément bien entendu, du fait que notre analyse s'était attachée à cibler uniquement les fonctions qui semblaient les plus susceptibles d'être les premières affectées par le traitement. La suite de notre travail a consisté à tenter de trouver une cohérence scientifique à ces fonctions

affectées en fonction des données de la littérature sur la physiologie bactérienne et les interactions potentielles avec l'hôte.

Voies fermentaires

D'un point de vue fondamental, on peut supposer que les différences environnementales entre les 3 sites de la peau ont contraint les microorganismes à utiliser plusieurs types de voies fermentaires en relation avec les caractéristiques physico-chimiques. Sachant que l'environnement peau est plutôt pauvre en oxygène, il semble que la présence de voies fermentaires dans son microbiote soit logique.

Les gènes associés au complexe respiratoire de type I sont plus détectés dans les métagénomes de front que du pied et de l'aisselle (Figure 32). Ce complexe chez les bactéries est uniquement représenté par les NADH déshydrogénases permettant de réoxyder les cofacteurs réduits [154]. Il est intéressant de noter que ce résultat peut être interprété à la lumière de l'analyse taxonomique qui révélait de nombreuses séquences associées au genre *Propionibacterium* avec une présence forte de *Propionibacterium acnes*, organisme utilisant préférentiellement la respiration du fumarate dont les coenzymes sont délivrés par des NADH déshydrogénases [155]. Il y aurait ici a priori une cohérence entre analyse taxonomique et fonctionnelle mais qui nécessiterait d'explorer quels types de métabolisme pour la production d'énergie sont majoritairement utilisés par les microorganismes prédominants des microbiotes des aisselles et des pieds pour expliquer un moindre recours à ces enzymes. De même quelle est l'influence de la présence de ces enzymes dans le potentiel adaptatif des représentants du genre *Propionibacterium* pour coloniser le front.

Une première réponse aux questions ci-dessus est proposée par l'occurrence élevée de séquences liées à la fermentation butanédiolique dans les métagénomes des microbiotes de l'aisselle et du pied (systèmes fonctionnels opéron acéto-lactate et métabolisme de l'acétoïne/butanédiol) (Figure 32). Comme expliqué dans le chapitre précédent, le recours à ces voies métaboliques pourrait s'expliquer par la nécessité de maintenir l'acidité à un niveau en dessous d'un seuil au-delà duquel il deviendrait létal pour un certain nombre de bactéries. L'utilisation de cette fermentation en réponse au caractère létal d'un pH bas a été montré dans de nombreux écosystèmes naturellement acides [131,132]. Le pied et l'aisselle sont des environnements moites où la sueur est responsable

de l'acidité cutanée, même si le front est également un environnement où la sueur acide est sécrétée en grande quantité. D'autres voies fermentaires semblent être préférées par les microorganismes du front, telle la respiration du fumarate comme expliqué dans le paragraphe précédent.

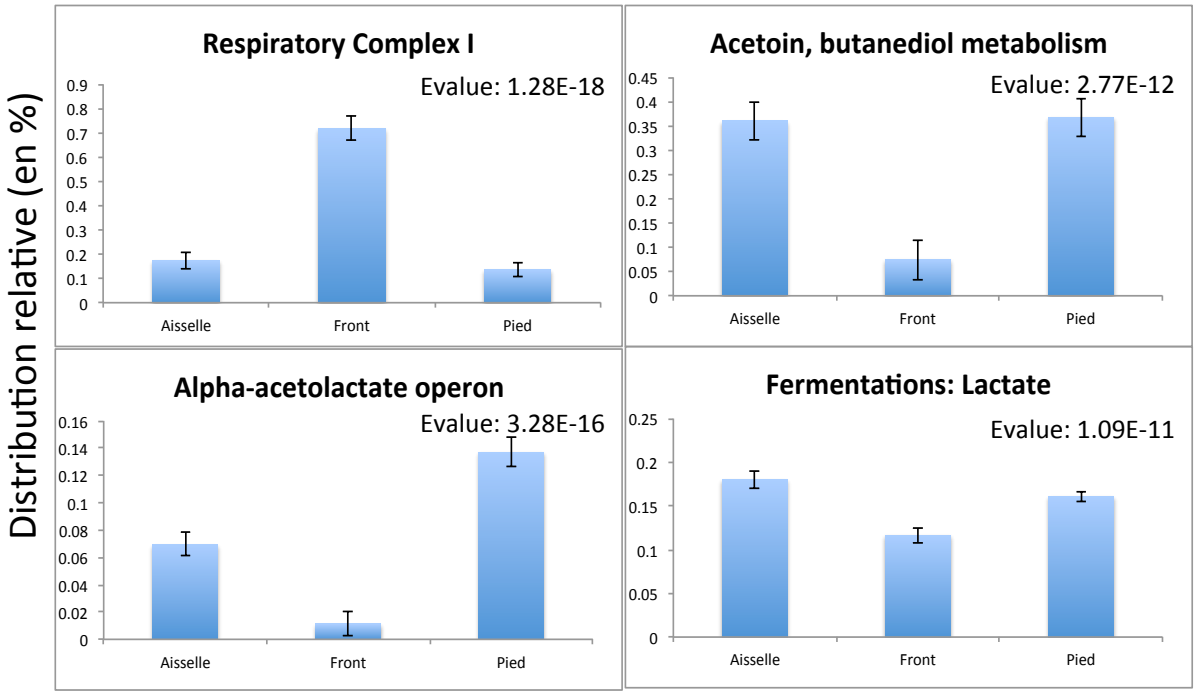


Figure 33 : Distribution relative (en %) de voies fermentaires ayant une différence significative de distributions entre les environnements aisselle, pied et front (données basées sur l'annotation MG-RAST, Evalue<10^{-5}).
Les données sont normées avec le nombre de séquences annotées. Un test Anova est réalisé pour déterminer si les distributions sont différentes entres les environnements (Evalue<10^{-5}).

Suite aux applications cutanées, cette fermentation butanédiolique possède une occurrence significativement plus faible dans les métagénomes extraits des sites traités sous l'aisselle et sous le pied de l'individu DAU par rapport aux contrôles (Figure 33). Dans le cas du pied, l'application du traitement qui s'accompagne d'une augmentation du pH à la surface de la peau ne justifie plus de la part du microbiote le recours à une voie fermentaire qui aurait été sélectionnée dans le seul but d'une stabilisation de l'acidité. Le résultat observé est donc cohérent. Inversement le traitement déodorant de l'aisselle à base de sels d'aluminium (solution très acide [156]) entraine une diminution du pH à la surface de la peau et devrait donc logiquement s'accompagner non d'une baisse mais d'une augmentation du nombre de séquences correspondant à la fermentation butanédiolique. Le résultat observé ne peut alors être expliqué dans le cadre de nos

connaissances actuelles à moins d'envisager un manque d'adaptation des microorganismes cutanés à des pH trop bas ou un effet du traitement sur différents processus métaboliques impactés du fait de la limitation de la disponibilité en eau [157] et en différents nutriments excrétés par la sueur.

Le sous-système de fermentation lactique est très représenté dans les 3 groupes de métagénomes, mais ceux de l'aisselle se caractérisent par un nombre de séquences statistiquement plus élevé (Figure 32). La fermentation lactique catalyse la réaction de production d'énergie par la transformation de différents sucres en acide lactique [158]. Détecter une prédominance des fonctions associées dans les microbiotes des sites les plus exposés à la sueur n'est pas triviale, car le lactate, produit commun de la peau excrété par la sueur, est présent en concentration relativement forte selon la production et la rétention de la sueur [159]. L'explication de la prédominance du potentiel fonctionnel sur les métagénomes de l'aisselle reste quant à elle ouverte. Mais l'on peut se demander si les quantités généralement détectées dans la sueur par les études antérieures proviennent uniquement du corps humain ou d'un mélange avec le produit de fermentation des bactéries cutanées. Une analyse expérimentale favorisant cette fermentation microbienne sur la peau permettrait d'observer si la teneur en acide lactique observée est dépendante du microbiote ou non.

Après traitement, la fermentation lactique est significativement moins représentée dans les métagénomes du microbiote de l'aisselle de l'individu DAU par rapport au contrôle (Figure 33). La perte de ce potentiel peut être attribuée au manque d'activité en eau suite à l'action astringente du traitement.

D'autres voies fermentaires ont changé de distribution suite aux applications cutanées, mais n'avait pas été détecté comme prédominantes dans les métagénomes non traités comparés aux autres zones cutanées.

D'après l'analyse, la fermentation acides mixtes serait la voie prioritaire utilisée par le microbiote du pied de l'individu RTH pour répondre au traitement avec un accroissement du nombre de séquences par rapport aux contrôles (Figure 33). Notre travail constitue le premier report de l'implication de cette voie fermentaire par les bactéries de la peau et il est à noter que ce résultat est cohérent avec la diminution du potentiel d'utilisation de la voie fermentaire butanédiolique justifiant d'autant plus

l'intérêt de travaux futurs du dosage du butanédiol et des produits de la fermentation acides mixtes sur la peau.

Les séquences classées dans le sous-système SEED de fermentation de l'acétyl-CoA en butyrate (le butyrate étant impliqué dans un processus d'atténuation de la réponse inflammatoire cutanée [160]), voie fermentaire utilisée par les bactéries pour réoxyder les cofacteurs réduits [161], est détecté en quantité supérieure dans les métagénomes extraits de l'aisselle traitée de l'individu RTH par rapport au site non traité (Figure 33). Il est intéressant de constater que ces mêmes séquences n'ont pas été détectées chez le second patient, résultat pouvant être interprété comme l'absence de la bactérie correspondante dans une partie de la population ouvrant ainsi une opportunité de développement d'un probiotique atténuant la réponse inflammatoire [162] s'il venait à être possible d'identifier au sein des microbiotes de l'individu RTH le ou les microorganismes dont le génome est pourvu de ces voies métaboliques.

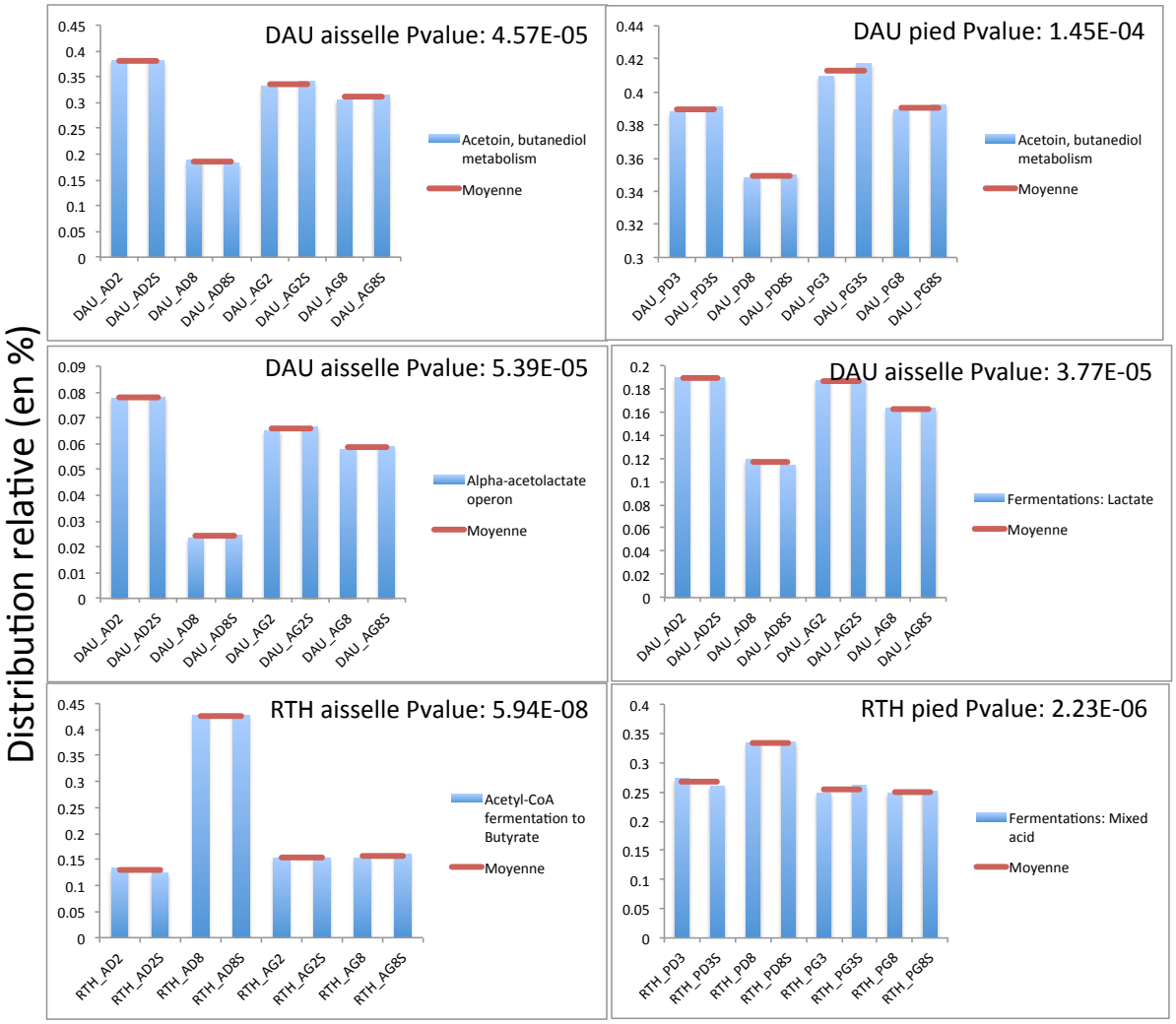


Figure 34 : Distribution relative (en %) de fonctions associées aux voies fermentaires différemment distribuées entre les métagénomes de zones avec traitement comparés aux métagénomes des zones contrôles (données basées sur l'annotation MG-RAST, Evalue<10^{-5}).
Les données sont normées avec le nombre de séquences annotées. Un test t de Welch est réalisé pour déterminer si les distributions sont différentes entres les environnements.

Résistance au stress environnemental

Les séquences classées au sein des systèmes fonctionnels de la classification SEED Potassium homeostasis et sous-système 2-phosphoglycolate salvage sont majoritaires dans les métagénomes provenant du front (Figure 34). Ce résultat pourrait être interprété comme rendant compte de l'adaptation des microorganismes à un site du corps humain généralement moins protégé que ceux recouverts par des vêtements et soumis directement aux conditions extérieures environnementales et à leurs variations. La régulation de l'homéostasie, fonction vitale pour la cellule bactérienne se fait via le

potassium pour réagir aux changements d'osmolarité ou de pH [163]. C'est le système de « potassium uptake » qui permet ainsi à *Staphylococcus aureus* de survivre dans les environnements salins [164] et selon ces auteurs, expliquerait le potentiel de cette bactérie pour coloniser la peau, environnement relativement concentré en sel [164]. La présence de séquences liées au sous-système 2-phosphoglycolate salvage impliqué dans la réparation de l'ADN suite à des stress oxydatifs [165] s'expliquerait également par l'exposition aux rayons UV solaires, inducteurs du stress oxydatif [166] que subissent les bactéries présentes sur le front. C'est toutefois par une recherche de l'expression différentielle de ces gènes bactériens sur des zones cutanées exposées ou non au soleil qu'une telle hypothèse pourrait être confirmée.

Sur la surface du pied c'est cependant la résistance au cadmium qui pourrait être une fonction spécifiquement associée à ces microbiotes (Figure 34). Le cadmium, métal lourd toxique détecté dans la sueur humaine [53] (dont le niveau de production n'est cependant pas le plus élevé sur les pieds [159]) pourrait expliquer ce résultat si sa concentration dans la sueur des pieds était supérieure à ce qu'elle est sur d'autres sites ce qui resterait à démontrer expérimentalement ou pour des individus affectés par une forte sudation au niveau des pieds.

Les métagénomes des microbiotes de l'aisselle et du pied se caractérisent par un niveau supérieur de séquences classées dans le sous-système BlaR1 Family Regulatory Sensor-transducer Disambiguation (figure 34), dont la fonction de régulation a été initialement décrite dans le contrôle de l'expression de gènes de résistance aux beta lactames [167]. Cet opéron peut également réguler l'expression d'une protéine impliquée dans la résistance à la méthicilline [167], résistance très répandue parmi les membres du genre *Staphylococcus* dont les représentants sont majoritaires dans les microbiotes de l'aisselle et du pied (Figure 34), fournissant ainsi un nouvel exemple d'une relation directe possible entre une fonction et un groupe taxonomique donné.

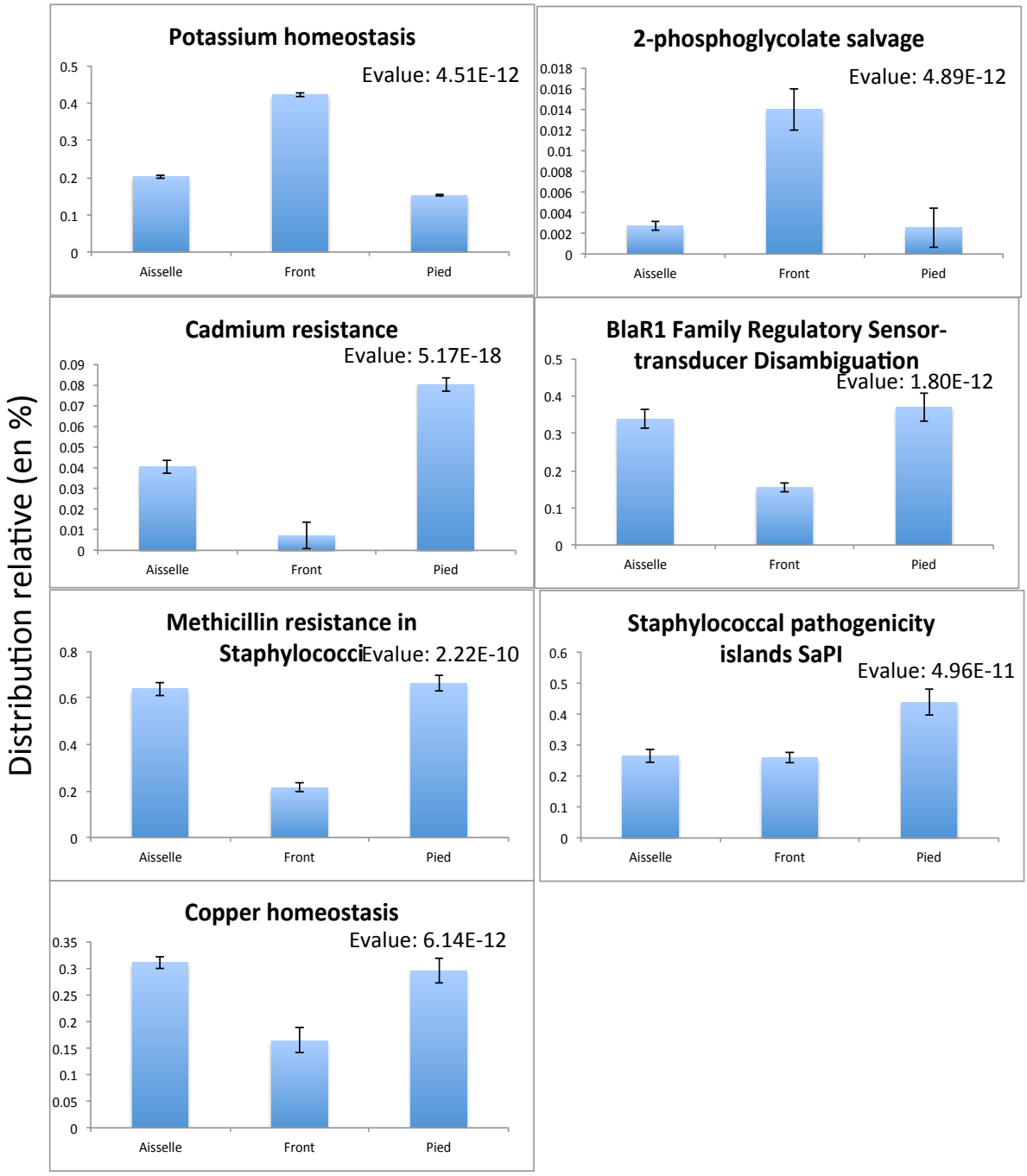


Figure 35 : Distribution relative (en %) de fonctions ayant une différence significative de distributions entre les environnements aisselle, pied et front (données basées sur l'annotation MG-RAST, Evalue<10^{-5}).
Les données sont normées avec le nombre de séquences annotées. Un test Anova est réalisé pour déterminer si les distributions sont différentes entres les environnements (Evalue<10^{-5}).

C'est la même hypothèse qui peut être proposée pour expliciter l'occurrence majoritaire dans les métagénomes provenant de microbiotes de pied de séquences de gènes

associés à l'îlot de pathogénie SaPI qui fait partie d'un groupe de divers éléments génétiques mobiles liés à la pathogénie au sein du genre *Staphylococcus* (Figure 34). De façon surprenante, le site aisselle qui se caractérise aussi par une occurrence majoritaire de staphylocoques ne semble pas présenter dans les génomes composant son microbiote le même niveau de séquences de cet îlot de pathogénie, résultat pouvant être interprété comme une spécialisation taxonomique de la colonisation de la surface cutanée humaine s'exerçant à un niveau infra-générique.

Aisselle et pied se caractérisent aussi par un niveau supérieur de séquences pour des gènes favorisant l'adaptation de leurs microbiotes au cuivre (Copper homeostasis) dont les propriétés antimicrobiennes ont été utilisées par l'industrie pharmaceutique [168] (Figure 34). Sur les zones les plus moites de la peau des concentrations significatives de cuivre (1 à 9,9 µg/ml) y ont été détectées [47] justifiant la détection de fonctions d'adaptation dans les microbiotes concernées mais en tenant compte que ces concentrations dans la sueur sont bien inférieures à celles reconnues pour leur létalité sur les microorganismes [169]. Le suivi de la communauté microbienne lors d'un traitement cutané avec un apport en cuivre comme il est proposé pour des traitements antiseptiques permettrait d'obtenir des éléments de réponse quant à son impact sur le microbiote.

D'un point de vue application, l'occurrence de gènes codant la résistance à différents composés et à des métaux est accrue après traitement. Ce résultat observé notamment sur le site « aisselle » de l'individu DAU est cohérent quand il concerne la résistance au chrome qui est souvent associée à la résistance à l'aluminium (Figure 35). En effet le sous-système SEED impliqué comprend des gènes dont les fonctions sont associées au transport et à l'expulsion du chrome, système fonctionnant par une force proton motrice [170] au niveau d'un complexe membranaire. A défaut d'information sur les mécanismes spécifiques de résistance à l'aluminium et de la généralité des systèmes d'excrétion pour de nombreux métaux il est logique d'émettre l'hypothèse que les systèmes d'exclusion annotés pour le chrome soient aussi actifs pour conférer la résistance à l'aluminium. La vérification d'une telle hypothèse passerait nécessairement par un volet expérimental impliquant le clonage et l'expression de ces mécanismes dans un hôte bactérien.

La résistance à l'arsenic (pompes à efflux ou protéines chélatrices) serait par contre beaucoup moins répandue au sein des génomes des microbiotes de l'aisselle traitée de l'individu DAU (Figure 35) sans qu'il nous soit possible de trouver une explication cohérente à ce résultat. Sur ce même site chez ce patient, le système fonctionnel intégrant le mécanisme de réparation de l'ADN UvrABC [171] est également plus fortement représenté que sur la zone contrôle (Figure 35) résultat qui peut trouver une explication avec la liaison potentiellement délétère de l'aluminium sur l'ADN [145] qui favoriserait les bactéries richement pourvues en mécanismes de réparation. Pour ces 2 fonctions, les tendances sont similaires dans les métagénomes de l'aisselle de l'individu RTH mais la valeur statistique E-value ne rentre pas dans les critères de sélection imposés.

Mais la résistance peut aussi impliquer les processus cellulaires généraux notamment les transporteurs de type ABC réalisant une grande variété de fonctions liées à l'export de différentes molécules de la cellule, dont les composés toxiques [172]. Leur occurrence est accrue dans les microbiotes des aisselles traitées à la pierre d'alun chez les 2 individus (Figure 35) les positionnant alors comme les meilleurs candidats pour conférer aux cellules du microbiote cutané la résistance à l'aluminium pour laquelle les hypothèses alternatives présentées précédemment n'étaient que très peu soutenues par les résultats. La même interprétation peut être proposée avec le sous-système homéostasie du cuivre, dominant dans les métagénomes traités chez l'individu DAU (Figure 35).

Les séquences d'ADN affiliées au sous-système fonctionnel SEED « General Secretion Pathway » sont quantitativement surreprésentées dans les métagénomes des microbiotes extraits des zones aisselles soumises aux traitements de l'individu RTH par rapport aux sites contrôles (Figure 35). Cette fonction fait référence aux systèmes de transport, de translocation et d'excrétion chez les bactéries à coloration de gram négative (protéobactéries)[173] et l'accroissement de la valeur adaptative en présence du stress aluminium qu'elle semble induire peut être interprétée comme leur implication spécifique ou non dans l'excrétion de l'aluminium.

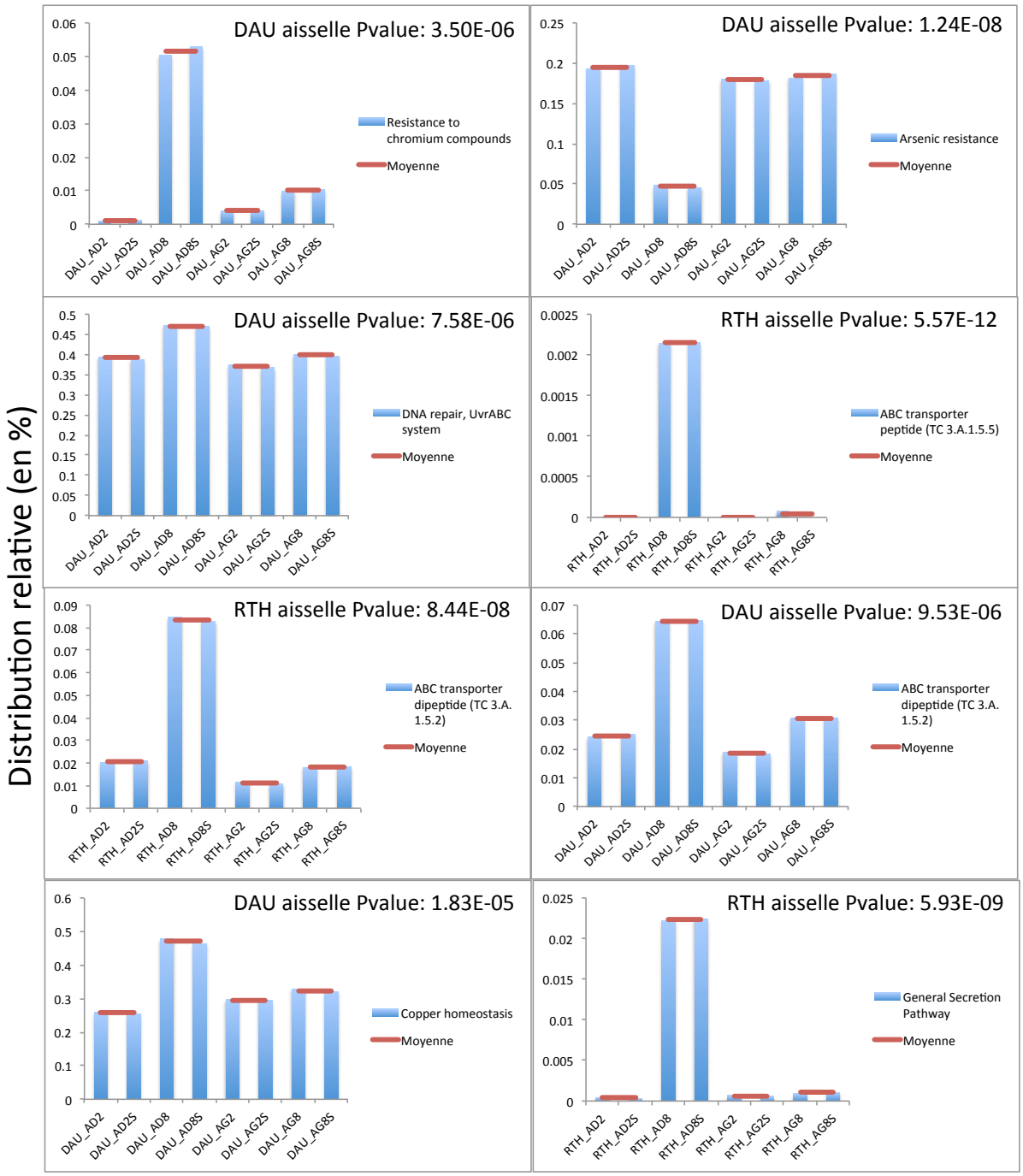


Figure 36 : Distribution relative (en %) de fonctions associées à la résistance bactérienne à différents composés différemment distribuées entre les métagénomes de zones avec traitement comparés aux métagénomes des zones contrôles (données basées sur l'annotation MG-RAST, Evalue<10^{-5}).
Les données sont normées avec le nombre de séquences annotées. Un test t de Welch est réalisé pour déterminer si les distributions sont différentes entres les environnements.

Sources de carbone

Les séquences des gènes associés à l'utilisation du fucose ont plus souvent été détectées dans les métagénomes extraits du front par rapport aux autres métagénomes (Figure 36). On prête beaucoup de vertus thérapeutiques au fucose qui est la seule molécule glyco-conjuguée en conformation L référencée comme étant présente chez les vertébrés [174] ce qui lui a valu beaucoup d'attention. Il a pu être montré sur un modèle murin qu'une application cutanée de fucose contribuait à densifier à nouveau le collagène ralentissant ainsi le vieillissement cutané [175] laissant augurer de possibles applications médicales ou en cosmétique. Si la teneur naturelle en fucose de la peau n'a pas été déterminée nos travaux montrant des différences du potentiel fonctionnel des microbiotes souligne tout l'intérêt qu'il y aurait à en faire un dosage zones par zones. Enfin, si un rôle protecteur et favorable pour la peau venait à être définitivement attribué au fucose toute tentative visant à modifier le microbiote pour limiter la présence ou la fonctionnalité des souches le catabolisant pourrait constituer une piste d'applications pour les industriels du secteur.

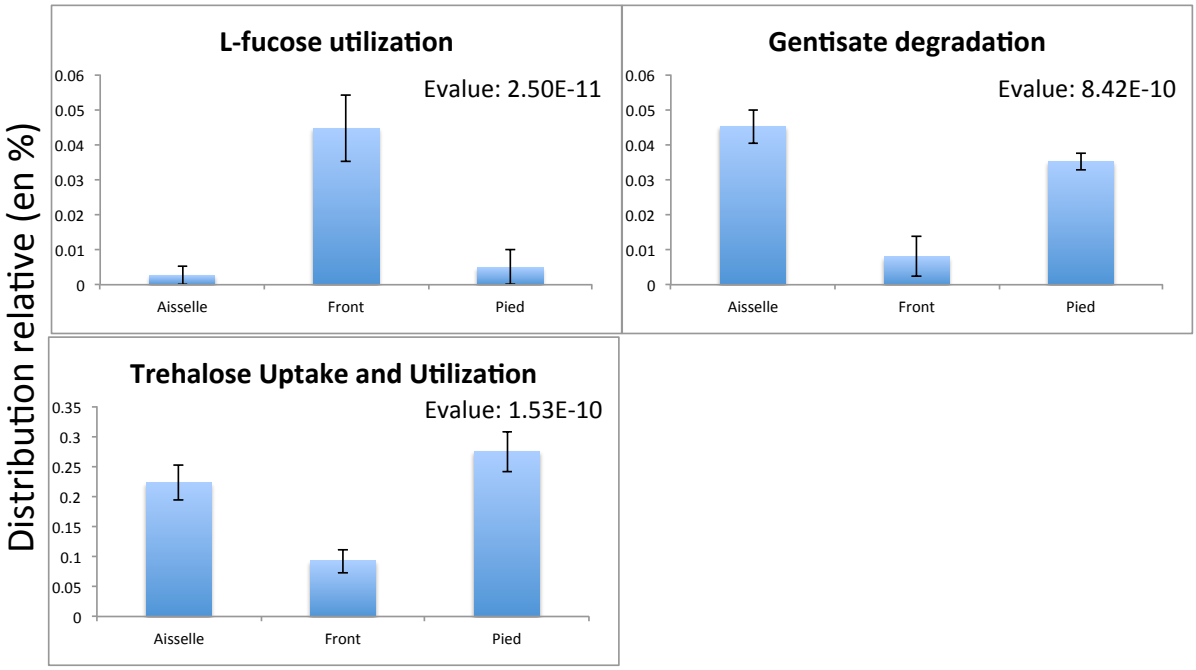


Figure 37 : Distribution relative (en %) de fonctions permettant l'utilisation de différentes sources de carbone ayant une différence significative de distributions entre les environnements aisselle, pied et front (données basées sur l'annotation MG-RAST, Evalue<10^{-5}).
Les données sont normées avec le nombre de séquences annotées. Un test Anova est réalisé pour déterminer si les distributions sont différentes entres les environnements (Evalue<10^{-5}).

Les métagénomes des microbiotes de l'aisselle et à un degré moindre du pied révèlent un potentiel de dégradation du gentisate (Figure 36), substrat aromatique aidant à la dégradation d'autres composés aromatiques [176] mais dont la présence a été rapportée dans l'environnement cutané au travers du méthyl-gentisate, inhibiteur de la mélanogenèse [177]. A nouveau, une action sur la composition du microbiote peut faire partie des options possibles pour traiter l'hyperpigmentation cutanée. Ces mêmes métagénomes se différencient de ceux du front par un nombre supérieur de séquences de gènes associés à la capture et l'utilisation du tréhalose, disaccharide présent chez une grande variété d'organismes mais pas chez les mammifères [178] (Figure 36). La capacité catabolique détectée pourrait être liée à la présence en abondance de souches classées dans le genre *Corynebacterium* (prédominantes dans les microbiotes cutanés du pied et de l'aisselle) chez lesquelles le tréhalose est un composant important de la structure de l'enveloppe[178] qui serait alors une source d'énergie et de carbone pour les autres cellules bactériennes. Le tréhalose est utilisé en cosmétique pour son pouvoir d'hydratation et antioxydant [179]. Si la peau s'avérait en fait productrice de tréhalose son effet bénéfique serait alors limité par ces représentants du microbiote capables de le cataboliser.

Plusieurs fonctions liées à l'assimilation des nutriments carbonés ont été impactées par les traitements appliqués sur la peau.

L'occurrence des séquences classées dans 2 sous-systèmes SEED à savoir, « Lactose and Galactose uptake and utilization » et « Fructose utilization » est moins élevée au sein des microbiotes issus de l'aisselle traitée de l'individu DAU en comparaison de son contrôle (pour l'individu RTH, des deux sous-systèmes seule l'utilisation de fructose est également moins abondante, Figure 37) confortant nos résultats du chapitre 3 rapportant la détection majoritaire de gènes codant de telles fonctions dans les métagénomes de microbiotes des sites humides de la peau (pied et aisselle). Ces données laissent suggérer la présence de ces sucres, lactose, galactose et fructose sur la peau alors qu'ils ne sont pas répertoriés comme entrant dans la composition de la sueur, du sébum ou d'autres parties de la peau. La baisse de l'occurrence observée pourrait trouver son explication avec l'astringence du traitement qui limiterait la libération de

ces sucres entrainant une baisse de fitness des microorganismes adaptés, hypothèse qui ne pourrait être confirmée ou infirmée qu'expérimentalement par dosage des sucres émis par la sueur et tests d'expression de ces gènes en présence ou non des sucres considérés. Toujours sur les mêmes critères de différences du nombre de séquences affiliées entre zones traitées et contrôles, le traitement à la pierre d'alun a un effet positif sur les microorganismes constituant le microbiote de la peau sous l'aisselle de l'individu RTH dont les génomes codent des fonctions liées à l'utilisation et/ou la dégradation de l'inositol, du maltose et maltodextrin, de la taurine et du p-Hydroxybenzoate (Figures 37 et 38). Une hypothèse de changement du milieu ambiant et donc de source de nutriments du fait d'une production atténuée de sueur favorisant un changement des voies métaboliques peut être proposée qui serait potentiellement vérifiable par dosage de ces composés sur la peau avant et après traitement. Le sucre inositol sous sa forme phosphorylée est un messager dans les cellules eucaryotes régulant le calcium intracellulaire [180] qui, avec d'autres messagers secondaires influent sur la différentiation cellulaire des kératinocytes [181]. Les kératinocytes peuvent donc potentiellement être une source de ces molécules, comme la taurine détectée dans l'épiderme et dont le rôle dans l'hydratation des kératinocytes a été montré [182]. La capacité de colonisation du pharynx par *Streptococcus* a été corrélée à la capacité de ce germe à utiliser le maltodextrine [183] suggérant que des propriétés similaires pour la colonisation de la peau puissent se retrouver chez certaines bactéries commensales de la peau. Encore plus hypothétiques sont les justifications d'un accroissement de la capacité à dégrader le composé p-Hydroxybenzoate qui, quoique utilisé abondamment comme conservateur dans une grande variété de produits cosmétiques [184] n'entre pas dans la composition du déodorant utilisé dans notre étude.

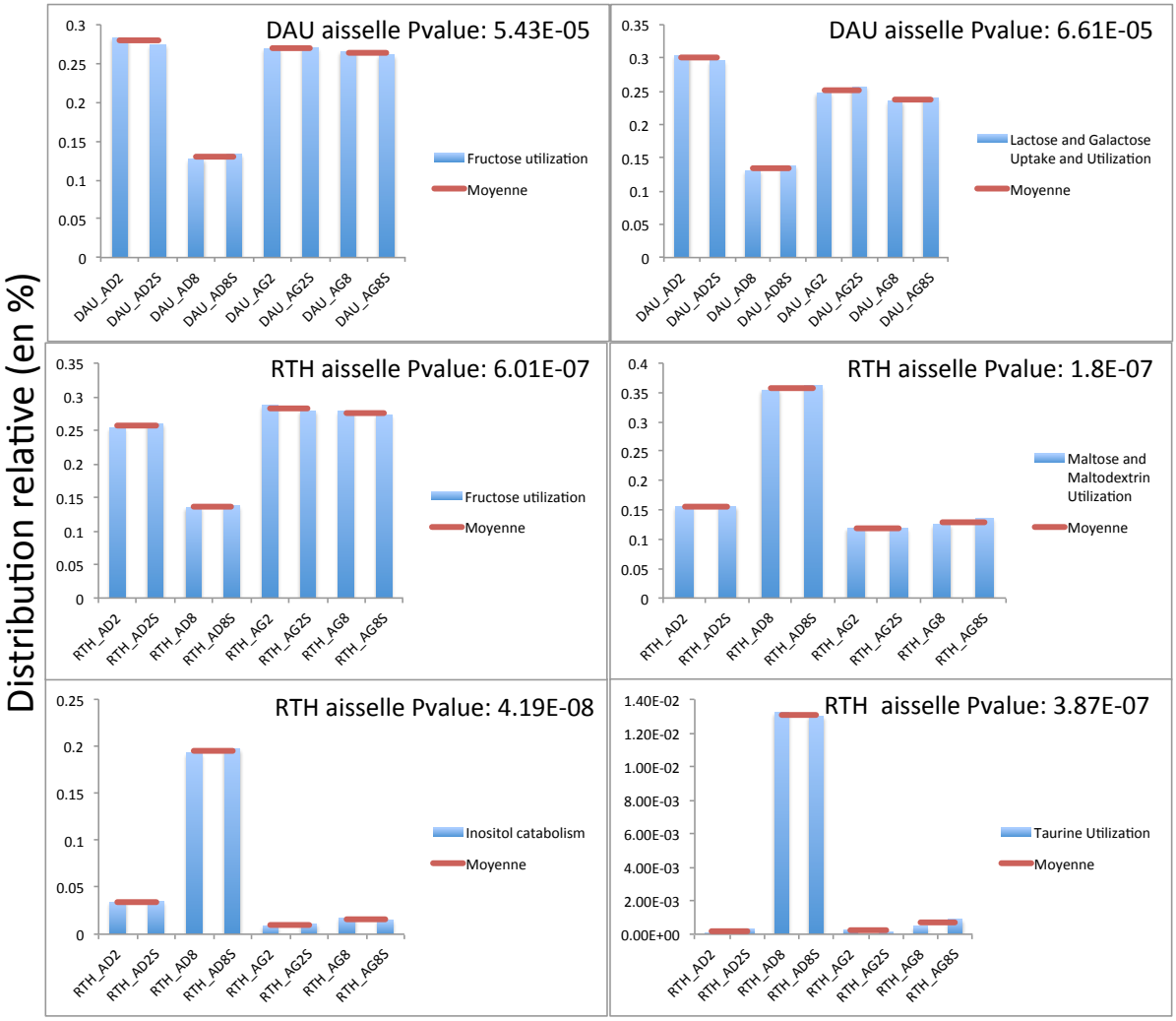


Figure 38 : Distribution relative (en %) de fonctions associées à l'utilisation de différentes sources carbonées différemment distribuées entre les métagénomes de zones avec traitement comparés aux métagénomes des zones contrôles (données basées sur l'annotation MG-RAST, Evalue<10^{-5}).
Les données sont normées avec le nombre de séquences annotées. Un test t de Welch est réalisé pour déterminer si les distributions sont différentes entres les environnements.

Inversement, le microbiote colonisant les pieds de l'individu DAU (Figure 38) montre une diminution du nombre de séquences des gènes affiliés au sous-système fonctionnel de transport et d'utilisation du tréhalose consécutivement au traitement. Il avait été proposé dans le chapitre précédent que les parois des cellules bactériennes affiliées au genre *Corynebacterium* pouvaient constituer une source potentielle de tréhalose. Dans ces metagénomes la proportion relative de séquences de gènes associées au genre *Corynebacterium* augmente de façon significative, ce qui intuitivement nous amène à penser que la teneur en tréhalose augmente également, si les premières hypothèses sont justes. Donc si la disponibilité en tréhalose augmente mais que la proportion relative des

génomes bactériens portant les mécanismes d'utilisation du tréhalose baisse, il est supposable que la présence de ce sucre ne soit pas le facteur environnemental influençant la fitness des bactéries, et que la baisse de proportion relative de cette fonction ne soit qu'un phénomène de co-sélection fonctionnelle sur un génome.

Chez ce même individu DAU, le traitement de son pied s'accompagne d'un accroissement du nombre de séquences de gènes impliqués dans le métabolisme du mannose (Figure 38), quoique ce sucre n'entre pas dans la composition de l'onguent et n'est donc pas sensé exercer une pression élective au sein du microbiote. Par contre il n'est pas exclu que le traitement rende plus disponible pour les bactéries commensales un sucre abondant dans les cellules de l'organisme hôte et impliqué dans le processus de glycosylation des molécules [185]. Une analyse en chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse pourrait potentiellement permettre d'abord de comparer s'il y a bien du mannose dans les échantillons et si les concentrations sont différentes ou non.

L'analyse des séquences des métagénomes du front a également permis de mettre en évidence des fonctions bactériennes impactées par le traitement. Chez l'individu DAU, la réaction du microbiote au traitement se manifeste par un accroissement des fonctions classées dans le sous-système d'utilisation du melibiose (Figure 38), sucre composé d'une unité de galactose et d'une de glucose, réponse cohérente si l'on considère la présence de ces sucres dans le traitement. Toute aussi cohérente serait ainsi la diminution relative des gènes associés à l'utilisation d'acides gras du fait d'une diversification des sources de carbone sur les sites traités (Figure 38).

Le traitement sur le pied chez l'individu RTH provoque un accroissement des séquences métagénomiques de gènes regroupés dans le sous-système SEED du fait de leur implication dans la dégradation de l'arginine et de l'ornithine (Figure 38), 2 acides aminés pouvant être utilisés comme sources de nutriments, ou participant à la synthèse d'autres molécules [186]. Nous ne signalerons ici que le lien qui a pu être fait entre forte concentration en arginase et en ornithine et l'état cancéreux de cellules squameuses faisant de ces molécules des biomarqueurs de la pathologie à défaut d'avoir pu leur attribuer une implication directe [187].

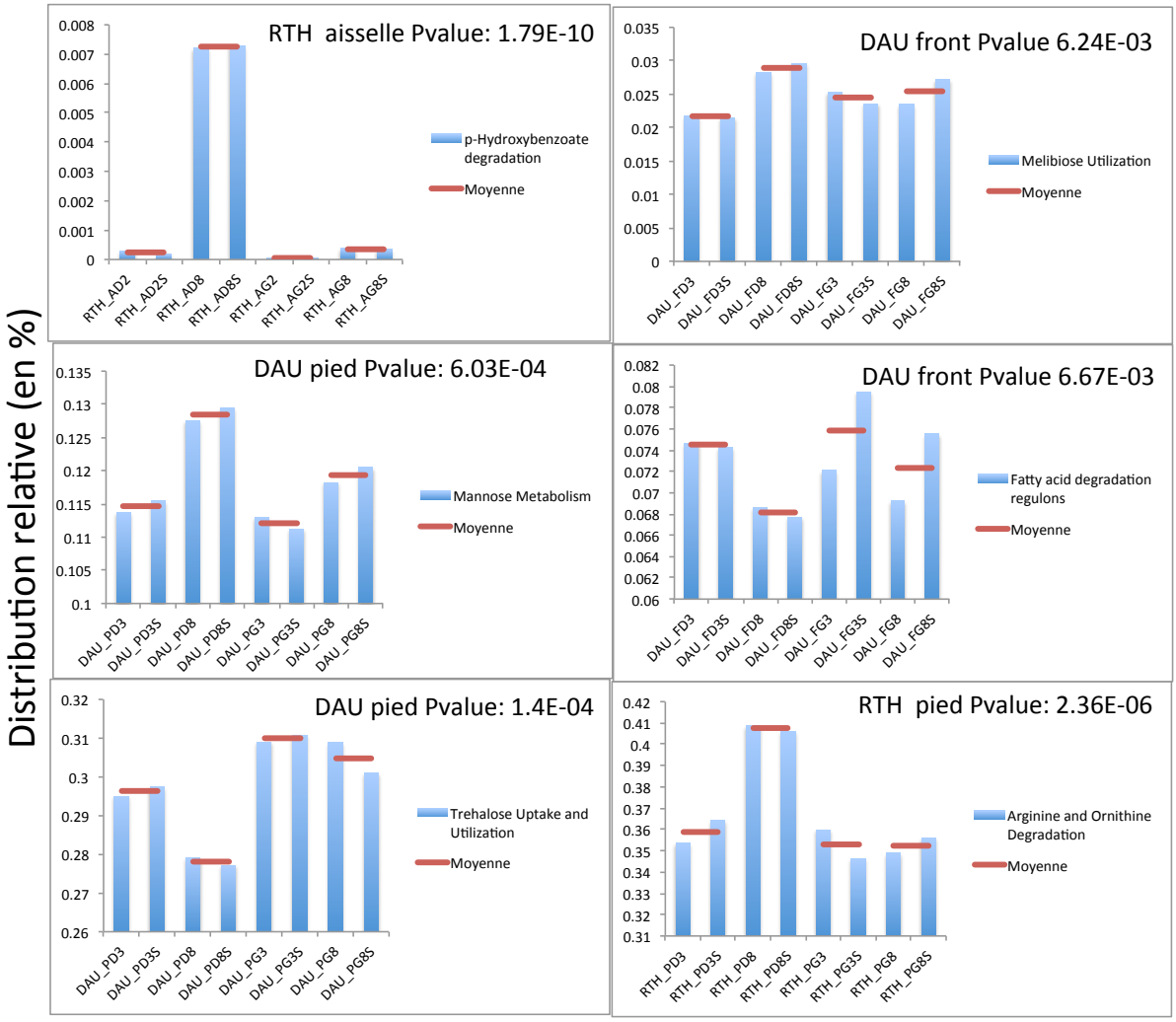


Figure 39 : Distribution relative (en %) de fonctions associées à l'utilisation de différentes sources carbonées différemment distribuées entre les métagénomes de zones avec traitement comparés aux métagénomes des zones contrôles (données basées sur l'annotation MG-RAST, Evalue<10^{-5}).
Les données sont normées avec le nombre de séquences annotées. Un test t de Welch est réalisé pour déterminer si les distributions sont différentes entres les environnements.

Biosynthèse

L'environnement front présente un microbiote dont le séquençage du métagénome révèle un potentiel significatif de synthèse de chorismate (Figure 39), précurseur de la production de métabolites aromatiques comme certains acides aminés tels que la phénylalanine, la tyrosine et le tryptophane. Du fait de son importance capitale pour la cellule cette voie métabolique a été choisie comme cible pour le développement de traitements antimicrobiens [188]. Le niveau élevé de représentation de ces séquences dans

les métagénomes des 3 sites explorés est très important même s'il est le plus élevé sur le front sans qu'il soit vraiment possible d'en apporter une interprétation claire concernant l'adaptation aux tissus cutanés. Les métagénomes des zones cutanées de l'aisselle et du pied révèlent plusieurs voies de biosynthèse représentées au sein de leurs microbiotes telles que celles de synthèse de l'acide lipoïque, puissant antioxydant[189], dont le rôle dans la constitution des déshydrogénases est essentiel (Figure 39). Ces microorganismes producteurs pourraient être alors la cible de traitements visant à favoriser leur multiplication ou l'expression de leurs gènes. Ces mêmes métagénomes révèlent aussi un potentiel de production de polysaccharides (Figure 39) qui pourrait être attribué à des Vibrio mais que l'assignation confère aux représentants du genre *Staphylococcus* ce qui leur permettrait de se protéger du système immunitaire [190] tout comme la production de poly-gamma glutamate par *S. epidermis* qui en plus assure sa survie sous de hautes concentrations salines [191] (Figure 39). Ces derniers résultats concernant ces voies de biosynthèse principalement détectées chez les staphylocoques suggèrent à nouveau un lien entre structure et fonction sans pour autant pouvoir être en mesure d'affirmer que ce sont ces fonctions qui sont responsables du potentiel adaptatif de ces microorganismes sur ces zones qui se caractérisent par rapport au front par une concentration saline plus élevée. Ce n'est que par une approche expérimentale que des réponses scientifiquement étayées pourront être apportées à ces questions même si la cosmétique ne les a pas attendues pour développer des onguents à base de poly-gamma glutamate pour favoriser l'hydratation de la peau [192].

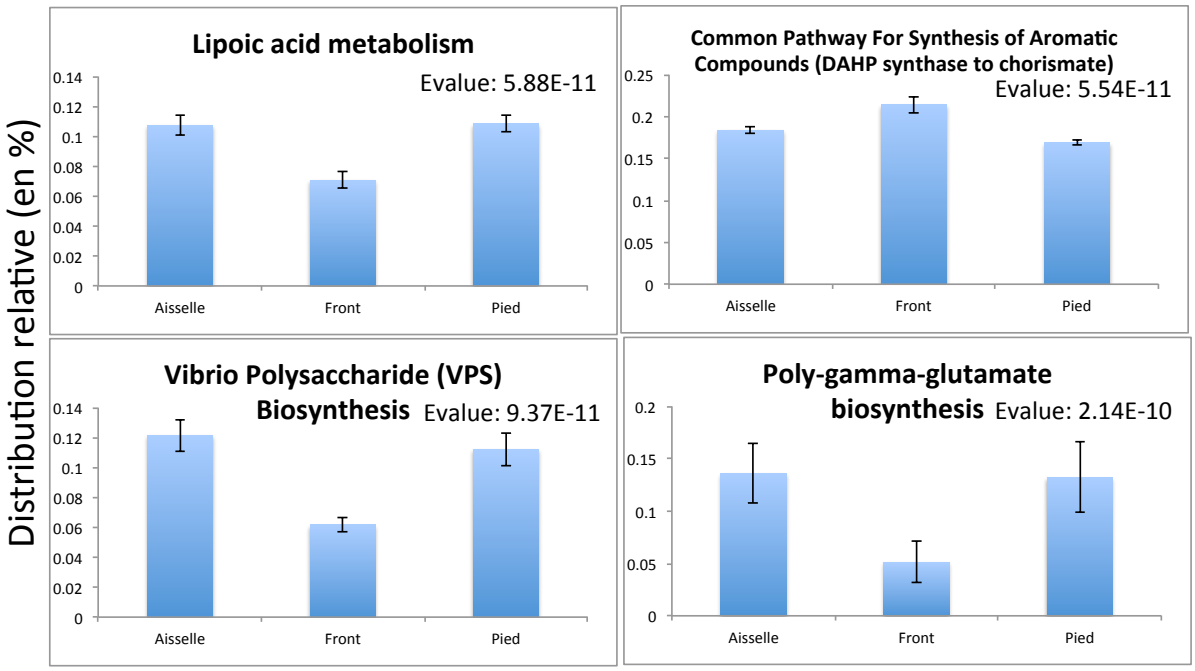


Figure 40 : Distribution relative (en %) de fonctions associées à la biosynthèse de différents composés, différemment distribuées entre les métagénomes de zones avec traitement comparés aux métagénomes des zones contrôles (données basées sur l'annotation MG-RAST, Evalue<10^{-5}).
Les données sont normées avec le nombre de séquences annotées. Un test t de Welch est réalisé pour déterminer si les distributions sont différentes entres les environnements.

Le traitement de l'aisselle de l'individu DAU entraine une diminution du nombre de séquences de gènes codant la biosynthèse d'exopolysaccharides et d'acide mycolique (Figure 40) et conséquemment une réduction du potentiel à former des biofilms qui sont impliqués dans la virulence et l'échappement au système immunitaire [193]. Il sera intéressant d'éventuellement corréler ce résultat à la baisse de représentation relative de génomes du genre *Staphylococcus*, dont des représentants cutanés ont été répertoriés pour exprimer cette capacité [193]. C'est potentiellement par une analyse microscopique de la surface de la peau que pourrait être contrôlée une modification induite par le traitement de la structuration spatiale du microbiote cutané et en particulier la formation en microcolonies. L'acide mycolique est produit majoritairement par des espèces appartenant à l'ordre des Actinomycetales dont fait partie le genre *Corynebacterium* dont il est surprenant de noter que l'augmentation relative de séquences associées au genre *Corynebacterium* suite au traitement s'accompagne d'une baisse du potentiel de synthèse. Des études ultérieures devront définir si les bactéries affiliées à ce taxon pourraient appartenir à la minorité de souches qui ne présentent pas

ce potentiel [194]. Par contre, le potentiel de biosynthèse des lipoprotéines impliquées dans diverses voies d'activités cellulaires essentielles (*ie.* Adhésion, transport, croissance…) [195] semble être accru par le traitement apposé sur le pied de l'individu DAU (Figure 40). Serait-ce la simple multiplication bactérienne induite par l'apport d'eau et de N-acétylglucosamine qui explique ce résultat est une hypothèse qui pourrait être simplement prise en compte par l'étude microscopique de la densité cellulaire microbienne sur la peau avant et après traitement.

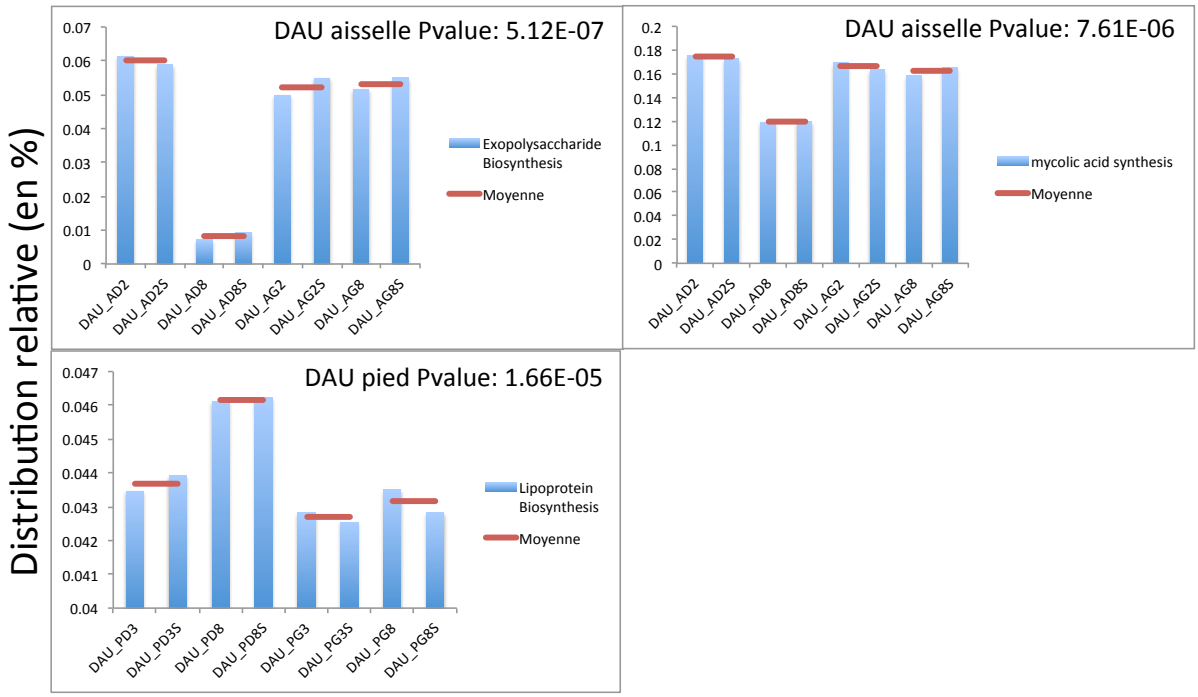


Figure 41 : Distribution relative (en %) de fonctions associées à la biosynthèse de composés différemment distribuées entre les métagénomes de zones avec traitement comparés aux métagénomes des zones contrôles (données basées sur l'annotation MG-RAST, Evalue<10^{-5}).
Les données sont normées avec le nombre de séquences annotées. Un test t de Welch est réalisé pour déterminer si les distributions sont différentes entres les environnements.

Dans le chapitre précédent, il avait été observé que les systèmes de capture du fer pourraient être particulièrement bien représentés au sein des génomes des bactéries de microbiotes de la peau, tels que des pathogènes [196]. L'analyse fonctionnelle confirme ce résultat avec la détection sur les 3 zones cutanées étudiées d'un nombre élevé de séquences classées au sein des systèmes fonctionnels Heme, hemin uptake and

utilization systems in Gram Negatives pour l'environnement front, et Siderophore Anthrachelin pour l'aisselle et le pied (Figure 41). Toutefois, les stratégies des microbiotes pour capturer le fer semblent différer selon les sites sébacés et les environnements moites avec sur le front une incohérence entre le mécanisme le plus abondant qui concernerait les protéobactéries alors que la taxonomie révèle la présence dominante de représentants du genre *Propionibacterium* dont *P. acnes*. Un problème d'annotation lié au manque de génomes de références pourrait être à l'origine de ces résultats surprenants.

Mais après le traitement au déodorant chez l'individu RTH, comment interpréter (Figure 42) un accroissement des fonctions classées dans le système SEED « Siderophore achromobactin » ou une baisse de celles du sous-système « Heme, hemin uptake and utilization systems in GramPositives » si ce n'est par une fluctuation du microbiote sans lien avec ces fonctions précises?

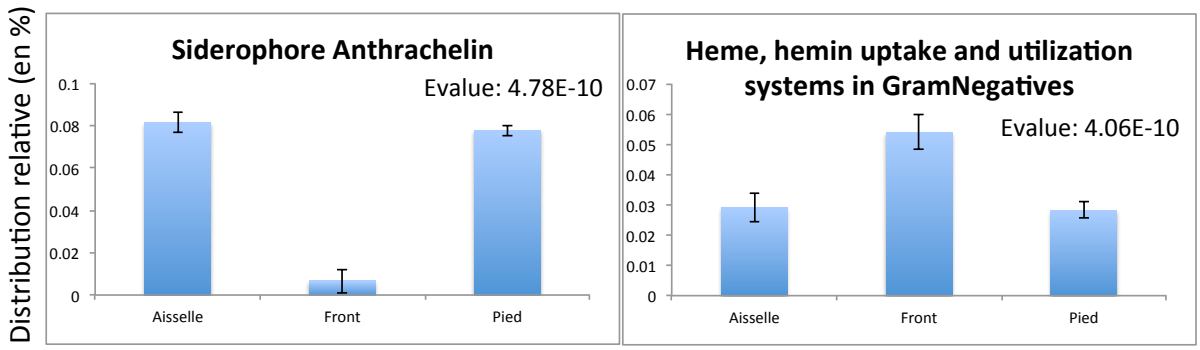


Figure 42 : Distribution relative (en %) de fonctions associées à la biosynthèse de différents composés, différemment distribuées entre les métagénomes de zones avec traitement comparés aux métagénomes des zones contrôles (données basées sur l'annotation MG-RAST, Evalue<10^{-5}).
Les données sont normées avec le nombre de séquences annotées. Un test t de Welch est réalisé pour déterminer si les distributions sont différentes entres les environnements.

Divers

Différentes fonctions diffèrent par leur distribution avant et après traitement. Ces fonctions ne peuvent être classées dans des processus globaux mais peuvent avoir un impact sur l'état de santé de la peau. Néanmoins leur présence est quelquefois difficilement explicable. Par exemple est-il possible d'attribuer un véritable potentiel de sélection à la fonction de mobilité [197] des cellules bactériennes du fait de l'observation

d'un accroissement de ces séquences liées au sous-système fonctionnel « Bacterial chemotaxis » dans le microbiote de l'aisselle traitée chez l'individu RTH (Figure 42)? Pareillement il semble à l'heure actuelle difficile de corréler directement l'apport du traitement (eau + NADG-6P) à une augmentation de la disponibilité en acétaldéhyde qui permettrait d'expliquer l'accroissement du nombre de séquences codant l'acétaldéhyde déshydrogénase qui catalyse la réaction de transformation de l'acétaldéhyde en acétate [198] et qui apparait dans les sous-systèmes Cinnamic acid degradation et Biphenyl degradation surreprésentés dans les métagénomes du microbiote du pied traité de l'individu DAU (Figure 42). Des flux gazeux d'émission d'acétaldéhyde ont été détectés lors de mesures de composés émis par une peau [199], il est donc probable que la peau et/ou les communautés microbiennes de la peau produisent et soient des sources potentielles. Par contre notre étude soulève la question de l'impact exact du traitement sur la quantité d'acétaldéhyde présente dans la peau du fait de son effet carcinogène au niveau du tube digestif avec la mise en cause des communautés microbiennes comme potentiels producteurs d'acétaldéhyde [200]. Si le traitement permet de transformer l'acétaldéhyde en acétate, alors le traitement pourrait s'avérer potentiellement bénéfique pour prévenir d'un cancer cutané. Au contraire, l'augmentation du potentiel fonctionnel de l'enzyme comme une réponse à une libération accrue d'acétaldéhyde suite au traitement signifierait sa nocivité.

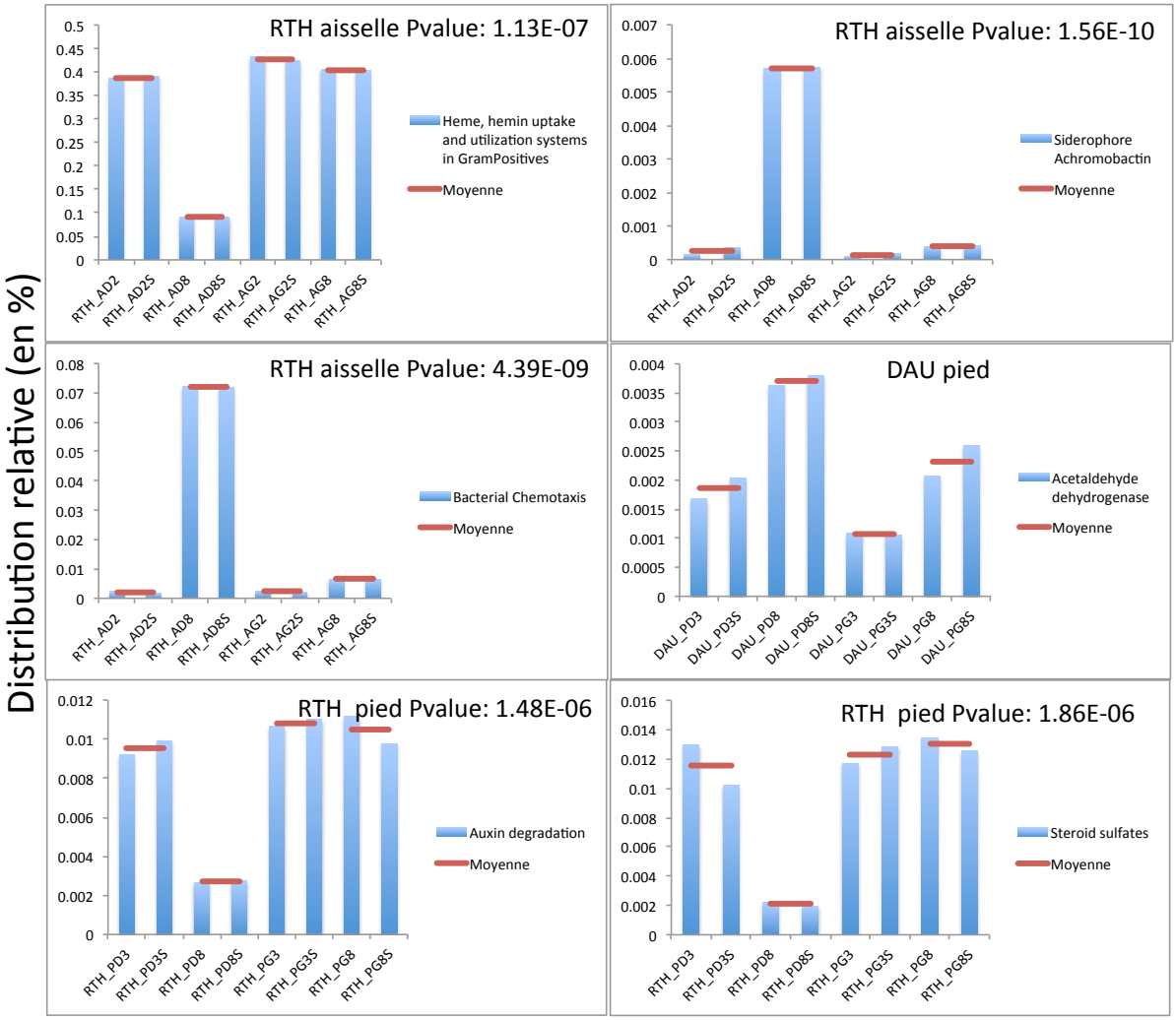


Figure 43 : Distribution relative (en %) de fonctions diverses différemment distribuées entre les métagénomes de zones avec traitement comparés aux métagénomes des zones contrôles (données basées sur l'annotation MG-RAST, Evalue<10^{-5}).
Les données sont normées avec le nombre de séquences annotées. Un test t de Welch est réalisé pour déterminer si les distributions sont différentes entres les environnements.

Le sous-système Auxin degradation et le sous-système steroid sulfates sont moins détectés dans les métagénomes des échantillons ayant reçu un traitement que dans les autres métagénomes de la zone pied. A l'intérieur du sous-système de dégradation de l'auxine, ce sont seulement les gènes codant la peroxydase qui ont été détectés.

Des gènes catalysant la réaction de transformation du peroxyde d'hydrogène, responsable du stress oxydatif en eau [201] (sous-système Auxin degradation) ont vu leur occurrence décroître suite au traitement sur le pied chez l'individu RTH (Figure 42). Une diminution du potentiel de réduction du peroxyde d'hydrogène, potentiellement délétère pour la peau [202] pourrait là aussi démontrer un effet négatif du traitement. On ne peut toutefois exclure la possibilité que la diminution du potentiel soit le fait d'une

baisse effective de la concentration en peroxyde d'hydrogène indiquant alors un effet positif du traitement.

Nous n'avons par contre trouvé aucune explication à l'observation d'une diminution dans ces mêmes métagénomes des séquences de gènes classés dans le sous-système steroid sulfates impliquant des sulfatases. Ces enzymes ont toutefois un rôle très important dans la formation de la barrière lipidique en permettant la formation de cholestérol et en favorisant la desquamation par la baisse du taux de cholestérol sulfate [203]. Comment influe la communauté microbienne de par son potentiel enzymatique sur la formation de la barrière protectrice de la peau et quel rôle pourraient avoir les traitements sur son potentiel fonctionnel et sur l'état de santé de la peau sont des questions qui restent à prendre en compte.

Autre résultat qui demandera des vérifications expérimentales est l'accroissement des séquences dans les métagénomes du microbiote prélevé sur le pied soumis au traitement chez l'individu RTH des gènes codant des sortases (Figure 41), enzymes liant les protéines à l'enveloppe cellulaire de la cellule [204]. La sélection de ces enzymes est-elle le fait d'activités cellulaires décuplées par l'apport d'eau et de NAGD6-P ou leur occurrence accrue n'est-elle que fortuite du fait d'une multiplication des représentants du genre *Staphylococcus* riches en sortases [205] ? Nos résultats montrent toutefois la difficulté d'interprétation à un niveau plus général car chez l'individu DAU les traitements sur les différents sites se traduisent par une baisse de représentation des *Staphylococcus* que confirme la diminution du nombre de séquences relatives aux îlots de pathogénie SaPI de *Staphylococcus* (Figure 43).

Enfin la prise en compte des séquences d'ADN classées dans les sous-systèmes SEED associés aux phages « Phage entry and exit » et « Phage intron » montre chez l'individu RTH que le nombre de ces séquences augmente suite au traitement sur le pied (Figure 43). L'hypothèse d'une infection transitoire par des bactériophages serait renforcée par la détection d'un accroissement du nombre de séquences dans le sous-système contenant des protéines de stress (Figure 43). Cependant les assignations taxonomiques ne montrent pas un accroissement majeur de séquences phagiques mais l'hypothèse d'une infection qui aurait touchée spécifiquement l'individu RTH permettrait d'expliquer les différences notées entre les 2 individus.

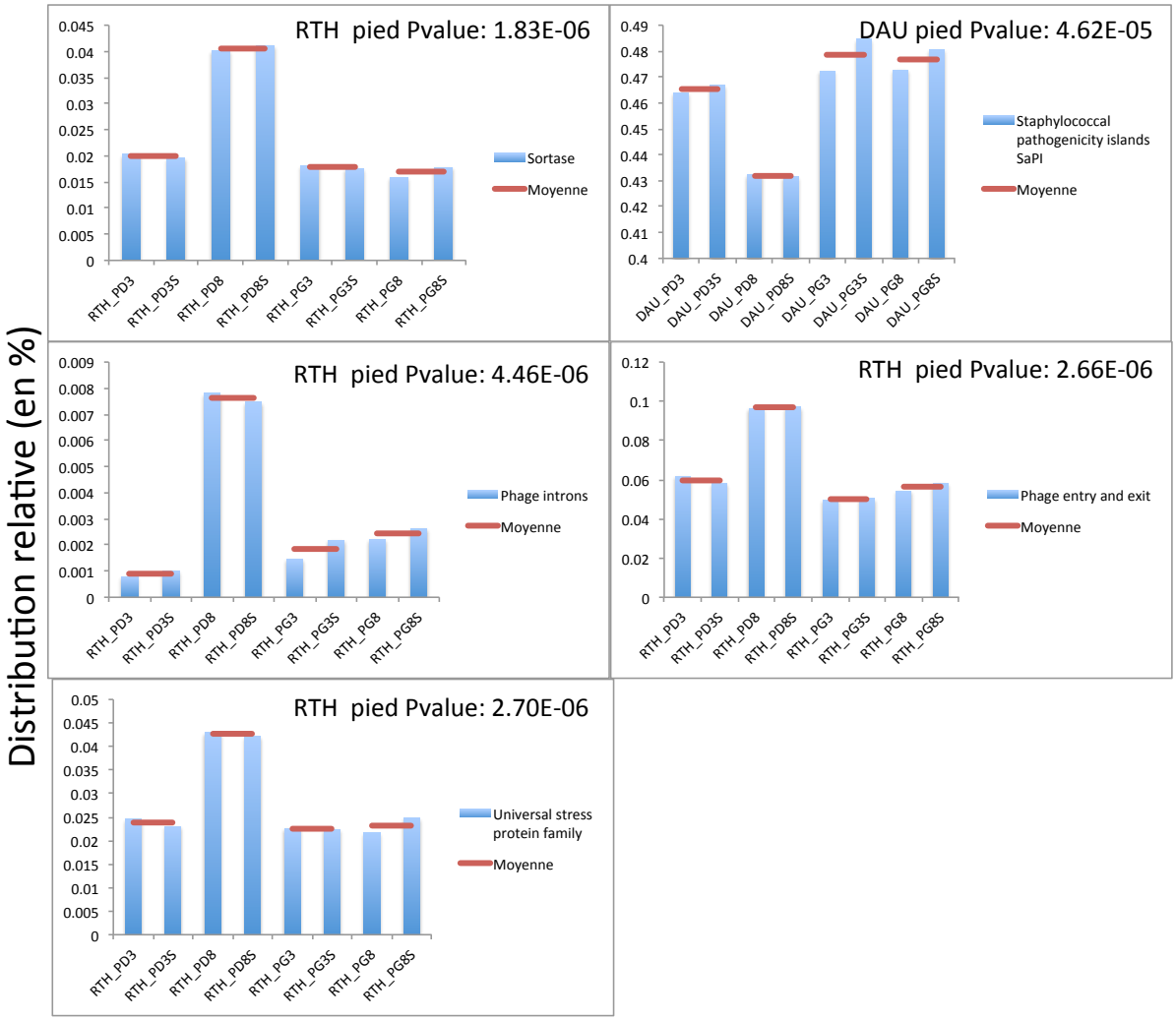


Figure 44 : Distribution relative (en %) de fonctions diverses différemment distribuées entre les métagénomes de zones avec traitement comparés aux métagénomes des zones contrôles (données basées sur l'annotation MG-RAST, Evalue<10^{-5}).
Les données sont normées avec le nombre de séquences annotées. Un test t de Welch est réalisé pour déterminer si les distributions sont différentes entres les environnements.

Conclusion

Ce travail de thèse constitue une réelle démonstration de la vitesse à laquelle progressent les nouvelles technologies de séquençage à haut débit de l'ADN. S'il est courant dans la littérature de trouver des données comparant les plateformes sur le nombre de lectures effectuées par séquençage, leur longueur et leur qualité (en termes de taux d'erreurs) [206], il est plus rare que le facteur quantité d'ADN matrice nécessaire soit pris en compte. En effet, pour le plus grand nombre d'applications, y compris dans les différents domaines de la microbiologie et en particulier celui de la métagénomique, l'ADN qui est extrait est rarement en quantités limitantes et les expérimentateurs n'avaient aucun problème à se conformer aux exigences imposées par les sociétés réalisant ces prestations. Le microbiote de la peau humaine constituait une de ces exceptions du fait d'une surface d'échantillonnage nécessairement limitée d'autant plus qu'il a vite été montré qu'à l'hétérogénéité physico-chimique à la surface du corps correspondait une diversité des communautés microbiennes. De plus, la densité cellulaire quelle que soit la zone considérée, plus faible que celle dans de très nombreux écosystèmes contribue à ce que les quantités d'ADN purifié extraites d'échantillons cutanés demeurent faibles. Mais les progrès récents réalisés sur les plateformes de séquençage ont permis de diminuer les quantités d'ADN nécessaires jusqu'à des valeurs compatibles avec ce qui pouvait être extrait d'un échantillon de microbiote prélevé sur certains sites cutanés référencés (humide ou sébacé).

Il a de ce fait été possible de changer le niveau des questionnements scientifiques susceptibles d'être abordés concernant les microbiotes cutanés avec la prise en compte de facteurs comme l'évolution dans le temps des communautés sur chacun des sites en fonction de traitements adaptés pour chacune de ces zones et en en différenciant l'effet propre à chaque individu. Précédé d'une approche rapide et peu couteuse qui détecte les changements majeurs de la structure taxonomique des communautés, le séquençage de l'ADN a pu être réservé aux échantillons les plus pertinents pour en déterminer un profil taxonomique et fonctionnel afin de comprendre les mécanismes de colonisation, et d'adaptation à ces écosystèmes biotiques dont la physico-chimie a pu être modifiée par les traitements. Globalement, les approches d'analyse de profils RISA et de séquences métagénomiques montrent une régionalisation des structures taxonomiques et

fonctionnelles des microbiotes des différents sites cutanés avec pour chacun, des évolutions plus ou moins marquées en fonction des traitements cosmétiques qui impactent les microbiotes et des individus.

Confirmant les travaux antérieurs, ces analyses montrent que les différents sites à la surface du corps humain différenciés par leurs propriétés physico-chimiques hébergent des microbiotes taxonomiquement différents. L'analyse des métagénomes révèle ainsi sur chaque site la présence de bactéries classées dans des genres non encore répertoriés comme colonisateurs de la peau par des approches de séquençage de produits PCR du gène *rrs*. Cependant, l'approche utilisée d'association par similarité de séquences métagénomiques à celles présentes dans les bases de données pour les affilier à un genre bactérien justifierait une confirmation expérimentale par d'autres approches du fait du niveau élevé d'incertitudes liées à cette technique bioinformatique.

En dépit de ces limitations, il ne fait aucun doute de l'impact qu'ont pu avoir les traitements cosmétiques sur les microbiotes des 3 sites cutanés des 2 patients tant au niveau taxonomique que fonctionnel. Nécessairement limitée en termes de nombre d'échantillons pouvant être traités, cette étude préliminaire révèle l'intérêt qu'aurait pu avoir le recours à un nombre supérieur de patients pour que statistiquement puissent être catégorisés les différents effets liés aux zones traitées, aux traitements et aux individus. Le décryptage du potentiel fonctionnel des microbiotes a clairement mis en évidence les différences entre régions moites et régions sébacées de la peau et identifié la salinité et l'acidité comme deux facteurs importants pour la structuration des microbiotes. Ces travaux visant à expliquer les fonctions microbiennes détectées et leur évolution quantitative suivant les traitements en fonction des données abiotiques du milieu cutané (intégrant sa composition physico-chimique modifiée par l'apport des produits cosmétiques) ont souligné les lacunes restant à combler sur les connaissances chimiques de ces milieux. Il ne fait guère de doute que la solidité des hypothèses proposées aurait été renforcée par une meilleure connaissance de la composition chimique de la peau, de la sueur.

L'accroissement de la valeur adaptative (fitness) d'un microorganisme est généralement la résultante d'un nombre important de facteurs codés par différents gènes, à l'exception de cas extrêmes comme peuvent l'être la présence d'un composé toxique dans le milieu (un antibiotique par exemple) qu'un gène de résistance seul permet de contrer.

Il devient ainsi très délicat de relier directement, comme nous avons tenté de le faire l'accroissement d'un nombre de séquences et donc potentiellement du nombre de cellules portant ces gènes aux seules fonctions codées par ces gènes. C'était toutefois une des seules options possible basée sur le suivi de fonctions que le traitement aurait pu (du) impacter et sur celles dont l'occurrence a été effectivement accrue ou réduite par le traitement pour essayer d'en trouver une justification.

La difficulté des études des écosystèmes cutanés tient au fait à ces interactions évolutives entre l'hôte et son microbiote que vient encore complexifier l'apport d'un traitement cosmétique. Néanmoins, même si elles compliquent sérieusement l'interprétation des résultats, si elles rendent difficile l'établissement d'une relation directe entre traitement et variation du niveau d'occurrence d'une fonction (sans parler du niveau d'expression du gène qui n'a pas été considéré ici), ces interactions sont fondamentales et méritent une attention toute particulière pour établir l'apport du microbiote pour la peau.

A plusieurs reprises nous avons montré que l'accroissement ou la baisse d'occurrence des séquences dans les métagénomes pouvait être interprétée soit positivement soit négativement pour la santé de la peau et même plus généralement pour la santé de l'individu. L'approche métagénomique combinée au séquençage massif qui a permis la mise en place d'une première analyse taxonomique et fonctionnelle des microbiotes cutanés en montre ainsi ou au moins en confirme toute l'importance. Elle révèle aussi les lacunes qu'il reste à combler et nous nous sommes efforcés de proposer, pour certaines de ces interrogations, des pistes expérimentales susceptibles de faire progresser les connaissances tant sur le volet fondamental des relations microbiote-hôte que sur l'impact plus appliqué des différents traitements proposés.

Une conclusion importante de notre étude concerne les différences de réaction du microbiote sur les différents sites. Les microbiotes des aisselles apparaissent très fluctuants dans le temps tant au niveau taxonomique que fonctionnel et les 2 individus ont présenté des réponses contrastées au traitement à la pierre d'alun comme par le comportement des représentants du genre *Corynebacterium* connus pour leur capacité à produire des molécules malodorantes [156]. Si le déodorant peut être efficace pour un des patients, va-t-il avoir un effet contraire pour l'autre individu ? Les microbiotes du pied semblent plus stables dans le temps que ceux des aisselles, leurs réactions au traitement

riche en N acétyl glucosamine-6-P et en eau est très disparate entre les deux individus mais les changements moins prononcés que ceux subis par les microbiotes des aisselles traités à la pierre d'alun. Enfin, la communauté microbienne qui colonise le front semble être très stable dans le temps et assez peu impactée tant taxonomiquement que fonctionnellement par la crème Unimaturon.

En conclusion, c'est un bilan positif qui peut être tiré d'une étude qui se voulait démonstratrice du potentiel que représentent les nouvelles approches d'écologie microbienne basées sur la métagénomique et le séquençage haut débit. A défaut de fournir des réponses définitives (et même au contraire en accroissant le champ des questions) notre étude montre que la prise en compte d'une diversité bactérienne qui va bien au-delà de celle perçue par l'approche classique basée sur l'isolement *in vitro* ouvre tout un nouveau pan de recherches intégrant les interactions du microbiote avec son hôte. Au niveau fondamental les travaux à venir vont permettre de mieux décrypter leurs interactions ce qui permettra d'en accroître les applications médicales ou cosmétiques au-delà d'un empirisme qui a encore beaucoup trop cours aujourd'hui.

Car ces travaux sont en effet novateurs d'un point de vue des applications puisqu'aucune méthode basée sur la culture *in vitro* ou l'exploitation de l'ADN bactérien extrait visant à déterminer l'effet des applications cosmétiques ou pharmaceutiques sur le microbiote cutané n'a pour l'instant fait l'objet d'une protection par dépôt de brevet. Seuls seraient protégés les travaux en rapport avec des traitements anti-microbiens en vue d'éviter l'infection des blessures cutanées [207], ou encore l'utilisation en traitement oral de protéines microbiennes pour obtenir des effets photoprotecteurs sur la peau [208]. C'est donc tout un nouveau champ d'applications industrielles pour la cosmétique qui s'ouvre avec la prise en compte des effets positifs ou négatifs des produits développés sur les microbiotes de la peau.

Conclusion générale

La peau des êtres humains est un organe particulièrement complexe et son interaction avec le monde microbien qui la colonise l'est encore d'avantage. La prise en compte des microorganismes sur et à l'intérieur de la peau a été initiée il y a déjà plusieurs années par les techniques de microbiologie traditionnelles basées sur à la culture *in vitro*. C'est cependant avec les approches d'étude de l'ADN microbien extrait directement de cellules récoltées sur la peau et sans le recours à la culture (approche métagénomique au sens large) que des avancées considérables sur l'inventoriage du microbiote cutané ont été obtenues [45]. Chaque centimètre carré de peau héberge un microbiote avec un niveau de biodiversité plus ou moins important avec à la surface du corps humain la délimitation de zones à l'intérieur desquelles les microbiotes présentent une importante variabilité taxonomique [109]. Cette diversité microbienne et les variations entre les zones résultent de la multitude de paramètres physico-chimiques qui caractérisent la peau et plus spécifiquement chacune de ces régions du corps. Ceux-ci dépendent bien sûr de l'hôte, les facteurs génétiques contribuant à façonner une structure taxonomique du microbiote. Ils vont également dépendre de la composition chimique des composés produits plus ou moins intensément par la peau (sueur, sébum…) qui vont interagir avec les différents éléments apportés par l'environnement extérieur (pollution atmosphérique, applications volontaires ou accidentelles de produits divers et variés sur la peau). Le microbiote transmis par la mère est également un facteur façonnant le microbiote cutané d'un individu. Enfin, à ces interactions déjà très complexes entre l'hôte, le milieu extérieur et le microbiote les lois de l'écologie (association, exclusion etc.) vont s'appliquer pour régir les relations entre microorganismes et façonner les structures taxonomiques qui pourront être observées avec plus ou moins de précision suivant les outils utilisés.

Mais l'observation de la diversité taxonomique au sein de ces microbiotes ne permet pas de comprendre les mécanismes de l'adaptation qui ont permis leur constitution et *a fortiori* si ces communautés vont influer positivement ou négativement le fonctionnement de la peau. C'est par une approche de séquençage direct qu'un premier décryptage des fonctions assurées par le microbiote cutané dans son ensemble a pu être

obtenu ce qui a permis de formuler les premières hypothèses sur l'écologie de ces microorganismes et leur impact sur leur environnement.

Mais nos travaux ont montré que l'obtention de ces informations n'est pas triviale et le caractère novateur de nos études tient d'abord au fait que des limites technologiques liées aux particularités de l'écosystème peau (la faible densité bactérienne) et aux conditions de séquençage de l'ADN (fortes quantités requises) ont pu être dépassées. Ce travail de thèse est appelé à faire date de par les protocoles d'extraction et de purification qui sont proposés et qui permettent d'aborder les questions conceptuelles jusque là ignorées faute d'outils appropriés. Nul doute qu'avec l'optimisation des protocoles de séquençage de nouvelles problématiques pourront rapidement être considérées comme le montrent déjà nos plus récents travaux qui explorent spécifiquement chacune des zones de la peau quand seul le microbiote total (cumul des échantillons) était accessible quelques mois plus tôt.

Mais cette dernière approche n'a cependant pas été dépourvue d'intérêt car elle a permis de comparer le microbiote de la peau à celui d'autres écosystèmes environnementaux et d'en dégager déjà les fonctions microbiennes qui en font sa spécificité.

En prenant en compte les limites sur les conclusions que nous pouvions porter, nous avons décidé de cumuler plusieurs séries d'extractions et de décrire fonctionnellement le microbiote présent sur plusieurs zones cutanées comme un tout, en comparant avec des données métagénomiques environnementales disponibles.

C'est ainsi qu'il a pu être mis en évidence les prédispositions du microbiote cutané à utiliser des sources carbonées telles que le fructose ou les triglycérides ou qu'ont pu être formulées des hypothèses sur les principaux facteurs structurant le microbiote cutané tels que le pH ou la teneur en fer, les potentiels fonctionnels correspondants pouvant être considérés comme directement responsables de la réponse adaptative des constituants du microbiote à ces pressions environnementales.

Ces travaux ont cependant gagné en fiabilité quand les approches de séquençage de l'ADN ont pu être pu appliquées à l'ADN métagénomique extrait de chacune des zones différenciées de la peau que sont le pied, l'aisselle et le front. La cohérence de la structuration taxonomique en regard de celle fonctionnelle a pu alors être recherchée avec des résultats parfois contradictoires. Ceux–ci pourraient s'expliquer par la redondance fonctionnelle sans que toutefois puisse être écartée des artefacts liés aux

approches d'analyse des séquences. Ces mêmes réserves sur les méthodologies nous conduisent à considérer avec prudence les résultats montrant que le microbiote du front serait constitué de bactéries ayant dans leur génome un potentiel plus important en activité lipasique que les autres zones alors qu'aisselles et pieds hébergent un microbiote bien adapté à l'utilisation des composés présents dans la sueur. A notre surprise ces fonctions ne sont pas celles qui créent les plus fortes disparités entre les microbiotes peut-être lié au fait que les 3 zones cutanées ne se différencient que par la proportion avec laquelle sueur et produits sébacés sont excrétés. Inversement, les fonctions présentant les plus fortes spécificités sur chacun des sites (en termes d'occurrence quantitative), qui donc devraient conférer un avantage notable aux bactéries qui les expriment sont plus difficilement interprétables. Ces résultats mériteraient d'être confirmés et la spécificité de chacune de ces fonctions pour un environnement donné établie par de nouvelles expérimentations combinant analyses de l'ADN, potentiellement des transcrits et dosages physico-chimiques de la composition de la peau sur ces différents sites.

A ces investigations très fondamentales, s'est ajouté un volet appliqué que justifiait le financement de la thèse dans le cadre d'un contrat CIFRE avec la société LibraGen. La peau fait en effet l'objet de beaucoup d'attention de la part des sociétés de cosmétique qui proposent une gamme de produits très diversifiés pour les différentes zones du corps qui ont été explorées dans le cadre de notre travail. Hors s'il est maintenant de plus en plus admis l'importance pour la santé des différents microbiotes en relation avec le corps humain, celui du tube digestif, celui de la peau, il est tout aussi reconnu que les produits cosmétiques développés et proposés n'ont jamais fait l'objet d'études sérieuses de l'impact qu'ils pourraient avoir sur les différents microbiotes concernés. C'est avec la perspective de jeter les bases de travaux qui sont appelés à devenir à moyen terme la norme en cosmétique qu'ont été développées les derniers travaux présentés dans ce travail de thèse. On peut en effet penser que règlementairement un produit devra faire la preuve sinon de son efficacité en favorisant des fonctions du microbiote qui auront été reconnues comme favorables à l'état de la peau et de la santé du consommateur tout au moins de l'absence d'effets délétères. Mais ces mêmes données concernant l'impact du produit cosmétique pourraient être utilisées comme argument marketing (si naturellement il est favorable) en soutien du produit et de ses effets visibles sur l'hôte. Trois produits ciblant le front, l'aisselle et le pied ont été sélectionnés et appliqués sur

deux patients qui se sont vus appliquer les protocoles de récupération de leurs microbiotes pour analyse par séquençage précédée cependant d'une approche préliminaire pour en limiter quantités de travail et coûts. Le chapitre 4 présente le détail des résultats observés qui révèlent la fluctuation dans le temps et selon l'individu de leurs microbiotes tant au niveau taxonomique que fonctionnel et surtout l'impact des produits cosmétiques appliqués surtout au niveau des aisselles et des pieds. Comme précédemment des fonctions microbiennes ont vu leur distribution quantitative évoluer soit positivement soit négativement. Tout comme précédemment également des hypothèses ont pu être proposées pour expliquer ces modifications. Si l'exploitation des données était déjà extrêmement complexe pour expliciter le potentiel adaptatif des bactéries sur la peau sans traitement, l'ajout d'un paramètre que représente l'application d'un produit biologiquement actif contribue encore à accroître le niveau de difficultés. Il ne fait guère de doute que les conclusions proposées pourront être confortées ou le plus souvent infirmées par les expérimentations futures, plus abouties, plus précises. Nos travaux ont cependant le mérite de démontrer l'intérêt des approches métagénomiques pour répondre à des thématiques d'intérêt tant fondamental qu'appliqué concernant un organe, la peau qui nous est si important tant fonctionnellement que psychologiquement. Nos travaux ouvrent un nouveau champ d'études, ils proposent des hypothèses qui sont autant de pistes à suivre pour des travaux qui ne manqueront pas de se développer.

Il faudra du temps pour que le volume d'études consacrées au microbiote intestinal par les approches métagénomiques soit atteint pour les microbiotes cutanés. Un même niveau d'avancées scientifiques est en droit d'être attendu pour un environnement, la peau qui est somme toute plus facile à explorer que les différentes zones du colon maintenant que sont résolus les principaux problèmes méthodologiques. S'il faut afficher un haut niveau d'ambition à un travail de thèse je conclurai celui-ci en revendiquant la paternité de l'expression « 3ème génome humain » pour les microbiotes cutanés puisque d'autres avant moi n'ont pas hésité à qualifier celui du tube digestif de second génome.

Références :

1. Brasier, M., Green, O., Lindsay, J. & Steele, A. Earth's oldest (approximately 3.5 Ga) fossils and the 'Early Eden hypothesis': questioning the evidence. *Orig Life Evol Biosph* **34,** 257–269 (2004).
2. Whitman, W. B., Coleman, D. C. & Wiebe, W. J. Prokaryotes: the unseen majority. 6578 (1998).
3. Lerat, E., Daubin, V., Ochman, H. & Moran, N. A. Evolutionary origins of genomic repertoires in bacteria. *PLoS Biol.* **3,** e130 (2005).
4. Curtis, T. P., Sloan, W. T. & Scannell, J. W. Estimating prokaryotic diversity and its limits. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99,** 10494–10499 (2002).
5. CHASE, H. H., DAVIS, J. B. & RAYMOND, R. L. Mycobacterium paraffinicum n. sp., a bacterium isolated from soil. *Appl Microbiol* **4,** 310–315 (1956).
6. LeChevallier, M. W., Seidler, R. J. & Evans, T. M. Enumeration and characterization of standard plate count bacteria in chlorinated and raw water supplies. *Appl. Environ. Microbiol.* **40,** 922–930 (1980).
7. Venter, J. C. *et al.* Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. *Science* **304,** 66–74 (2004).
8. Liu, Y.-J. *et al.* Bacillus oceani sp. nov., a new slightly halophilic bacterium, isolated from a deep sea sediment environment. *Antonie Van Leeuwenhoek* **104,** 829–836 (2013).
9. Tyson, G. W. *et al.* Community structure and metabolism through reconstruction of microbial genomes from the environment. *Nature* **428,** 37–43 (2004).
10. Sorokin, D. Y., Tourova, T. P., Lysenko, A. M. & Muyzer, G. Diversity of culturable halophilic sulfur-oxidizing bacteria in hypersaline habitats. *Microbiology (Reading, Engl.)* **152,** 3013–3023 (2006).
11. Stetter, K. O. Extremophiles and their adaptation to hot environments. *FEBS Lett.* **452,** 22–25 (1999).
12. Arumugam, M. *et al.* Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature* **473,** 174–180 (2011).
13. Peiffer, J. A. & Ley, R. E. Exploring the maize rhizosphere microbiome in the field: A glimpse into a highly complex system. *Commun Integr Biol* **6,** e25177 (2013).
14. Calvo-Polanco, M., Molina, S., Zamarreño, A. M., García-Mina, J. M. & Aroca, R. The symbiosis with the arbuscular mycorrhizal fungus Rhizophagus irregularis drives root water transport in flooded tomato plants. *Plant Cell Physiol.* (2014). doi:10.1093/pcp/pcu035
15. Karamanou, M., Poulakou-Rebelakou, E., Tzetis, M. & Androutsos, G. Anton van Leeuwenhoek (1632-1723): father of micromorphology and discoverer of spermatozoa. *Rev. Argent. Microbiol.* **42,** 311–314 (2010).
16. Alain, K. & Querellou, J. Cultivating the uncultured: limits, advances and future challenges. *Extremophiles* **13,** 583–594 (2009).
17. Clardy, J., Fischbach, M. A. & Walsh, C. T. New antibiotics from bacterial natural products. *Nat Biotech* **24,** 1541–1550 (2006).
18. Cho, J. C. & Tiedje, J. M. Bacterial species determination from DNA-DNA hybridization by using genome fragments and DNA microarrays. *Appl. Environ. Microbiol.* **67,** 3677–3682 (2001).
19. Drancourt, M. *et al.* 16S Ribosomal DNA Sequence Analysis of a Large Collection of Environmental and Clinical Unidentifiable Bacterial Isolates. *J. Clin. Microbiol.* **38,** 3623–3630 (2000).

20. Denamur, E. & Matic, I. Evolution of mutation rates in bacteria. *Mol. Microbiol.* **60,** 820–827 (2006).
21. Sun, S., Ke, R., Hughes, D., Nilsson, M. & Andersson, D. I. Genome-Wide Detection of Spontaneous Chromosomal Rearrangements in Bacteria. *PLoS ONE* **7,** e42639 (2012).
22. Paul, J. H. Microbial gene transfer: an ecological perspective. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **1,** 45–50 (1999).
23. Amann, R., Ludwig, W. & Schleifer, K. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 143–169 (1995).
24. Evstigneeva, A., Raoult, D., Karpachevskiy, L. & La Scola, B. Amoeba co-culture of soil specimens recovered 33 different bacteria, including four new species and Streptococcus pneumoniae. *Microbiology (Reading, Engl.)* **155,** 657–664 (2009).
25. Schneegurt, M. A., Dore, S. Y. & Kulpa, C. F., Jr. Direct extraction of DNA from soils for studies in microbial ecology. *Curr Issues Mol Biol* **5,** 1–8 (2003).
26. Nocker, A., Burr, M. & Camper, A. K. Genotypic microbial community profiling: a critical technical review. *Microb. Ecol.* **54,** 276–289 (2007).
27. Chen, K. & Pachter, L. Bioinformatics for Whole-Genome Shotgun Sequencing of Microbial Communities. *PLoS Computational Biology* e24 (2005).
28. Simon, C. & Daniel, R. Achievements and new knowledge unraveled by metagenomic approaches. 265–276 (2009).
29. Delmont, T. O., Robe, P., Clark, I., Simonet, P. & Vogel, T. M. Metagenomic comparison of direct and indirect soil DNA extraction approaches. 397–400 (2011).
30. Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. & Lipman, D. J. Basic local alignment search tool. 403–410 (1990).
31. Harrington, E. D. *et al.* Quantitative assessment of protein function prediction from metagenomics shotgun sequences. *PNAS* **104,** 13913–13918 (2007).
32. Schloss, P. D. & Handelsman, J. Toward a Census of Bacteria in Soil. *PLoS Comput Biol* **2,** e92 (2006).
33. Qin, J. *et al.* A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* **464,** 59–65 (2010).
34. Turnbaugh, P. J. *et al.* A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature* **457,** 480–484 (2009).
35. Zhu, B., Wang, X. & Li, L. Human gut microbiome: the second genome of human body. *Protein Cell* **1,** 718–725 (2010).
36. Vieira, A. T., Teixeira, M. M. & Martins, F. S. The Role of Probiotics and Prebiotics in Inducing Gut Immunity. *Front Immunol* **4,** 445 (2013).
37. Turnbaugh, P. J. *et al.* The Human Microbiome Project. *Nature* **449,** 804–810 (2007).
38. Christensen, G. J. M. & Brüggemann, H. Bacterial skin commensals and their role as host guardians. *Benef Microbes* 1–15 (2013). doi:10.3920/BM2012.0062
39. Mosteller, R. D. Simplified calculation of body-surface area. *N. Engl. J. Med.* **317,** 1098 (1987).
40. Cunsolo, V. *et al.* Poppea's bath liquor: the secret proteome of she-donkey's milk. *J Proteomics* **74,** 2083–2099 (2011).
41. McGrath, J. A. & Uitto, J. in *Rook's Textbook of Dermatology* (Tony Burns MB, Stephen Breathnach, Neil Cox Bsc & Christopher Griffiths Bsc) 1–53 (Wiley-Blackwell, 2010).
42. Kanitakis, J. Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin. *European Journal of Dermatology* **12,** 390–401 (2002).

43. Poirier, J. *Feuillets d'histologie humaine fascicule 7: Peau et phaneres seins organes des sens*. (Librairie Maloine S A Editeur, 1971).
44. Taris, A., Prost-Squarcioni, C., Heller, M. & Fraitag, S. *Histologie moléculaire de l'épiderme*. (Inter-Mede,, 2000).
45. Grice, E. A. & Segre, J. A. The skin microbiome. 244–253 (2011).
46. Krueger, G. G. & Stingl, G. Immunology/Inflammation of the Skin—A 50-Year Perspective. *J Invest Dermatol* **92,** 32S–53S (1989).
47. Wilson, M. *Microbial Inhabitants Of Humans: Their Ecology And Role In Health And Disease*. (Cambridge University Press, 2004).
48. Wilkes, G. L., Brown, I. A. & Wildnauer, R. H. The biomechanical properties of skin. *CRC Crit Rev Bioeng* **1,** 453–495 (1973).
49. Williams, A. *Transdermal and Topical Drug Delivery: From Theory to Clinical Practice*. (Pharmaceutical Press, 2003).
50. *The Regional Anatomy of the Human Integument with Special Reference to the Distribution of Hair Follicles, Sweat Glands and Melanocytes. Philosophical Transactions of the Royal Society of London*. (Royal Society, 1967).
51. Taylor, N. A. & Machado-Moreira, C. A. Regional variations in transepidermal water loss, eccrine sweat gland density, sweat secretion rates and electrolyte composition in resting and exercising humans. *Extreme Physiology & Medicine* **2,** 4 (2013).
52. Pinson, E. A. Evaporation from Human Skin with Sweat Glands Inactivated. *Am J Physiol* **137,** 492–503 (1942).
53. Sears, M. E., Kerr, K. J. & Bray, R. I. Arsenic, Cadmium, Lead, and Mercury in Sweat: A Systematic Review. *Journal of Environmental and Public Health* **2012,** (2012).
54. Picardo, M., Ottaviani, M., Camera, E. & Mastrofrancesco, A. Sebaceous gland lipids. *Dermato-endocrinology* **1,** 68 (2009).
55. Greene, R. S., Downing, D. T., Pochi, P. E. & Strauss, J. S. Anatomical variation in the amount and composition of human skin surface lipid. *J. Invest. Dermatol.* **54,** 240–247 (1970).
56. Eckhart, L., Lippens, S., Tschachler, E. & Declercq, W. Cell death by cornification. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* doi:10.1016/j.bbamcr.2013.06.010
57. Nestle, F. O., Di Meglio, P., Qin, J.-Z. & Nickoloff, B. J. Skin immune sentinels in health and disease. *Nature Reviews Immunology* (2009). doi:10.1038/nri2622
58. Janeway, C. A. Approaching the Asymptote? Evolution and Revolution in Immunology. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **54,** 1–13 (1989).
59. Martinon, F., Mayor, A. & Tschopp, J. The inflammasomes: guardians of the body. *Annu. Rev. Immunol.* **27,** 229–265 (2009).
60. Lai, Y. & Gallo, R. L. AMPed up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense. *Trends Immunol.* **30,** 131–141 (2009).
61. Albanesi, C., Scarponi, C., Giustizieri, M. L. & Girolomoni, G. Keratinocytes in inflammatory skin diseases. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* **4,** 329–334 (2005).
62. Nickoloff, B. J. & Turka, L. A. Immunological functions of non-professional antigen-presenting cells: new insights from studies of T-cell interactions with keratinocytes. *Immunol. Today* **15,** 464–469 (1994).
63. Foster, C. A. *et al.* Human epidermal T cells predominantly belong to the lineage expressing alpha/beta T cell receptor. *J. Exp. Med.* **171,** 997–1013 (1990).
64. Merad, M., Ginhoux, F. & Collin, M. Origin, homeostasis and function of Langerhans cells and other langerin-expressing dendritic cells. *Nat. Rev. Immunol.* **8,**

935–947 (2008).
65. Fukunaga, A., Khaskhely, N. M., Sreevidya, C. S., Byrne, S. N. & Ullrich, S. E. Dermal Dendritic Cells, and not Langerhans Cells, Play an Essential Role in Inducing an Immune Response. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **180,** 3057 (2008).
66. Fredricks, D. N. Microbial Ecology of Human Skin in Health and Disease. *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings* 167–169 (2001).
67. Mathieu, A., Vogel, T. M. & Simonet, P. The future of skin metagenomics. *Res. Microbiol.* (2013). doi:10.1016/j.resmic.2013.12.002
68. Chiller, K., Selkin, B. A. & Murakawa, G. J. Skin microflora and bacterial infections of the skin. *J Investig Dermatol Symp Proc* 170–174 (2001).
69. Gao, Z., Tseng, C., Pei, Z. & Blaser, M. J. Molecular analysis of human forearm superficial skin bacterial biota. *PNAS* 2927 –2932 (2007).
70. Dessinioti, C. & Katsambas, A. D. The role of Propionibacterium acnes in acne pathogenesis: facts and controversies. *Clin Dermatol* 2–7 (2010).
71. Cogen, A. L. *et al.* Staphylococcus epidermidis Antimicrobial δ-Toxin (Phenol-Soluble Modulin-γ) Cooperates with Host Antimicrobial Peptides to Kill Group A Streptococcus. *PLoS ONE* e8557 (2010).
72. Leyden, J. J., McGinley, K. J., Hölzle, E., Labows, J. N. & Kligman, A. M. The Microbiology of the Human Axilla and Its Relationship to Axillary Odor. *J Investig Dermatol* **77,** 413–416 (1981).
73. Handelsman, J., Rondon, M. R., Brady, S. F., Clardy, J. & Goodman, R. M. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. *Chem Biol.* R245–249 (1998).
74. Eisen, J. A. Environmental Shotgun Sequencing: Its Potential and Challenges for Studying the Hidden World of Microbes. *PLoS Biol* **5,** e82 (2007).
75. Olsen, G. J., Lane, D. J., Giovannoni, S. J., Pace, N. R. & Stahl, D. A. Microbial ecology and evolution: a ribosomal RNA approach. *Annu Rev Microbiol* 337–365 (1986).
76. Grice, E. A. *et al.* Topographical and Temporal Diversity of the Human Skin Microbiome. *Science* 1190 –1192 (2009).
77. Costello, E. K. *et al.* Bacterial Community Variation in Human Body Habitats Across Space and Time. *Science* 1694 –1697 (2009).
78. Kuczynski, J. *et al.* Experimental and analytical tools for studying the human microbiome. *Nature Reviews Genetics* 47–58 (2011).
79. Gonzalez, J. M., Portillo, M. C., Belda-Ferre, P. & Mira, A. Amplification by PCR artificially reduces the proportion of the rare biosphere in microbial communities. *PLoS ONE* **7,** e29973 (2012).
80. Thomas, W. R., Smith, W.-A. & Hales, B. J. The allergenic specificities of the house dust mite. *Chang Gung Med J.* 563–569 (2004).
81. Paulino, L. C., Tseng, C.-H., Strober, B. E. & Blaser, M. J. Molecular Analysis of Fungal Microbiota in Samples from Healthy Human Skin and Psoriatic Lesions. *Journal of Clinical Microbiology* 2933–2941 (2006).
82. Probst, A. J., Auerbach, A. K. & Moissl-Eichinger, C. Archaea on Human Skin. *PLoS ONE* **8,** e65388 (2013).
83. Foulongne, V. *et al.* Human skin microbiota: high diversity of DNA viruses identified on the human skin by high throughput sequencing. *PLoS ONE* e38499 (2012).
84. Dominguez-Bello, M. G. *et al.* Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *PNAS* (2010).
85. Capone, K. A., Dowd, S. E., Stamatas, G. N. & Nikolovski, J. Diversity of the Human Skin Microbiome Early in Life. *Journal of Investigative Dermatology* 2026–2032 (2011).

86. Fierer, N. *et al.* Forensic identification using skin bacterial communities. *PNAS* 6477 –6481 (2010).
87. Toivanen, P., Vaahtovuo, J. & Eerola, E. Influence of Major Histocompatibility Complex on Bacterial Composition of Fecal Flora. *Infect Immun* **69,** 2372–2377 (2001).
88. Hufeldt, M. R., Nielsen, D. S., Vogensen, F. K., Midtvedt, T. & Hansen, A. K. Variation in the Gut Microbiota of Laboratory Mice Is Related to Both Genetic and Environmental Factors. *Comp Med* **60,** 336–342 (2010).
89. Blaser, M. J. *et al.* Distinct cutaneous bacterial assemblages in a sampling of South American Amerindians and US residents. *ISME J* **7,** 85–95 (2013).
90. Fierer, N., Hamady, M., Lauber, C. L. & Knight, R. The influence of sex, handedness, and washing on the diversity of hand surface bacteria. *PNAS* 17994–17999 (2008).
91. Staudinger, T., Pipal, A. & Redl, B. Molecular analysis of the prevalent microbiota of human male and female forehead skin compared to forearm skin and the influence of make-up. *Journal of Applied Microbiology* 1381–1389 (2011).
92. Meadow, J. F., Bateman, A. C., Herkert, K. M., O'Connor, T. K. & Green, J. L. Significant changes in the skin microbiome mediated by the sport of roller derby. *PeerJ* **1,** e53 (2013).
93. Chen, Y. E. & Tsao, H. The skin microbiome: Current perspectives and future challenges. *Journal of the American Academy of Dermatology* **69,** 143–155.e3 (2013).
94. Polat, M. *et al.* Efficacy of erythromycin for psoriasis vulgaris. *Clinical and Experimental Dermatology* **32,** 295–297 (2007).
95. Baker, B. S. The role of microorganisms in atopic dermatitis. *Clinical and Experimental Immunology* 1–9 (2006).
96. Gao, Z., Tseng, C., Strober, B. E., Pei, Z. & Blaser, M. J. Substantial Alterations of the Cutaneous Bacterial Biota in Psoriatic Lesions. *PLoS ONE* e2719 (2008).
97. Kong, H. H. *et al.* Temporal shifts in the skin microbiome associated with atopic dermatitis disease flares and treatment. *Genome Research* (2012).
98. Simon, C. & Daniel, R. Metagenomic Analyses: Past and Future Trends. *Appl. Environ. Microbiol.* **77,** 1153–1161 (2011).
99. Peterson, J. *et al.* The NIH Human Microbiome Project. *Genome Research* 2317–2323 (2009).
100. Claesson, M. J. *et al.* Gut microbiota composition correlates with diet and health in the elderly. *Nature* 178–184 (2012).
101. Jones, B. V., Begley, M., Hill, C., Gahan, C. G. M. & Marchesi, J. R. Functional and comparative metagenomic analysis of bile salt hydrolase activity in the human gut microbiome. *PNAS* **105,** 13580–13585 (2008).
102. Erickson, A. R. *et al.* Integrated Metagenomics/Metaproteomics Reveals Human Host-Microbiota Signatures of Crohn's Disease. *PLoS ONE* **7,** e49138 (2012).
103. Gao, Q. & Garcia-Pichel, F. Microbial ultraviolet sunscreens. *Nat Rev Microbiol.* 791–802 (2011).
104. Grice, E. A. *et al.* A diversity profile of the human skin microbiota. *Genome Research* 1043 –1050 (2008).
105. Delmont, T. O. *et al.* Accessing the Soil Metagenome for Studies of Microbial Diversity. *Appl Environ Microbiol* 1315–1324 (2011).
106. Griffiths, R. I., Whiteley, A. S., O'Donnell, A. G. & Bailey, M. J. Rapid method for coextraction of DNA and RNA from natural environments for analysis of ribosomal DNA- and rRNA-based microbial community composition. *Appl Environ Microbiol* 5488 (2000).
107. Gao, Z., Perez-Perez, G. I., Chen, Y. & Blaser, M. J. Quantitation of Major Human

Cutaneous Bacterial and Fungal Populations. *Journal of Clinical Microbiology* 3575–3581 (2010).
108. Fierer, N., Jackson, J. A., Vilgalys, R. & Jackson, R. B. Assessment of Soil Microbial Community Structure by Use of Taxon-Specific Quantitative PCR Assays. *Appl Environ Microbiol.* 4117–4120 (2005).
109. Costello, E. K. *et al.* Bacterial Community Variation in Human Body Habitats Across Space and Time. *Science* **326,** 1694 –1697 (2009).
110. Case, R. J. *et al.* Use of 16S rRNA and rpoB Genes as Molecular Markers for Microbial Ecology Studies. at <http://aem.asm.org>
111. Binga, E. K., Lasken, R. S. & Neufeld, J. D. Something from (almost) nothing: the impact of multiple displacement amplification on microbial ecology. *ISME journal* 233–241 (2008).
112. Yilmaz, S., Allgaier, M. & Hugenholtz, P. Multiple displacement amplification compromises quantitative analysis of metagenomes. *Nature Methods* 943–944 (2010).
113. Kim, K.-H. & Bae, J.-W. Amplification Methods Bias Metagenomic Libraries of Uncultured Single-Stranded and Double-Stranded DNA Viruses. *Appl Environ Microbio* (2011).
114. Meyer, F. *et al.* The metagenomics RAST server - a public resource for the automatic phylogenetic and functional analysis of metagenomes. *BMC Bioinformatics* 386 (2008).
115. Huson, D. H., Auch, A. F., Qi, J. & Schuster, S. C. MEGAN analysis of metagenomic data. 377–386 (2007).
116. Overbeek, R. *et al.* The Subsystems Approach to Genome Annotation and its Use in the Project to Annotate 1000 Genomes. *Nucl. Acids Res.* **33,** 5691–5702 (2005).
117. Parks, D. H. & Beiko, R. G. Identifying biologically relevant differences between metagenomic communities. *Bioinformatics* 715 –721 (2010).
118. Mages, I. S., Frodl, R., Bernard, K. A. & Funke, G. Identities of Arthrobacter spp. and Arthrobacter-Like Bacteria Encountered in Human Clinical Specimens. *Journal of Clinical Microbiology* 2980–2986 (2008).
119. Imirzalioglu, C., Hain, T., Hossain, H., Chakraborty, T. & Domann, E. Erythema caused by a localised skin infection with Arthrobacter mysorens. *BMC Infectious Diseases* 352 (2010).
120. Brown-Elliott, B. A., Brown, J. M., Conville, P. S. & Wallace, R. J. Clinical and Laboratory Features of the Nocardia spp. Based on Current Molecular Taxonomy. *Clinical Microbiology Reviews* 259–282 (2006).
121. Fournier, P.-E. & Raoult, D. Suicide PCR on skin biopsy specimens for diagnosis of rickettsioses. *J Clin Microbio* 3428–3434 (2004).
122. Bagwell, C. E., Hixson, K. K., Milliken, C. E., Lopez-Ferrer, D. & Weitz, K. K. Proteomic and Physiological Responses of Kineococcus radiotolerans to Copper. *PLoS ONE* e12427 (2010).
123. McLeod, M. P. *et al.* The complete genome of Rhodococcus sp. RHA1 provides insights into a catabolic powerhouse. *PNAS* 15582 –15587 (2006).
124. Delmont, T. O. *et al.* Metagenomic mining for microbiologists. *ISME journal* 1837–1843 (2011).
125. Peng, X. *et al.* Characterization of the mannitol catabolic operon of Corynebacterium glutamicum. *Applied Microbiology and Biotechnology* 1375–1387 (2011).
126. Fahr, C. & Schauer, R. Detection of Sialic Acids and Gangliosides with Special Reference to 9-O-Acetylated Species in Basaliomas and Normal Human Skin. *Journal of*

Investigative Dermatology **116,** 254–260 (2001).
127. Vimr, E. R., Kalivoda, K. A., Deszo, E. L. & Steenbergen, S. M. Diversity of Microbial Sialic Acid Metabolism. *Microbiol Mol Biol Rev* 132–153 (2004).
128. Freinkel, R. K. & Traczyk, T. N. Lipid Composition and Acid Hydrolase Content of Lamellar Granules of Fetal Rat Epidermis. *Journal of Investigative Dermatology* 295–298 (1985).
129. Radner, F. P., Grond, S., Haemmerle, G., Lass, A. & Zechner, R. Fat in the skin. *Dermatoendocrino* 77–83 (2011).
130. Ji, X.-J., Huang, H. & Ouyang, P.-K. Microbial 2,3-butanediol production: A state-of-the-art review. *Biotechnology Advances* 351–364 (2011).
131. Van Houdt, R., Aertsen, A. & Michiels, C. W. Quorum-sensing-dependent switch to butanediol fermentation prevents lethal medium acidification in Aeromonas hydrophila AH-1N. *Research in Microbiology* 379–385 (2007).
132. Moons, P. *et al.* Integrated regulation of acetoin fermentation by quorum sensing and pH in Serratia plymuthica RVH1. *Appl Environ Microbiol* 3422–3427 (2011).
133. Casiano-Colon, A. & Marquis, R. E. Role of the arginine deiminase system in protecting oral bacteria and an enzymatic basis for acid tolerance. *Applied and environmental microbiology* 1318–1324 (1988).
134. Thurlow, L. R. *et al.* Functional modularity of the arginine catabolic mobile element contributes to the success of USA300 methicillin-resistant Staphylococcus aureus. *Cell Host Microbe* **13,** 100–107 (2013).
135. Schmid-Wendtner, M.-H. & Korting, H. C. The pH of the Skin Surface and Its Impact on the Barrier Function. *Karger* 296–302 (2006).
136. Fluhr, J. W. *et al.* Stratum Corneum Acidification in Neonatal Skin: Secretory Phospholipase A2 and the Sodium/Hydrogen Antiporter-1 Acidify Neonatal Rat Stratum Corneum. *J Invest Dermatol* 320–329 (2004).
137. Choi, E.-H. *et al.* Stratum Corneum Acidification Is Impaired in Moderately Aged Human and Murine Skin. *J Invest Dermato* 2847–2856 (2007).
138. Cookson, B. Five decades of MRSA: controversy and uncertainty continues. *The Lancet* 1291–1292 (2011).
139. Bonomo, R. A. *et al.* Topical triple-antibiotic ointment as a novel therapeutic choice in wound management and infection prevention: a practical perspective. *Expert Rev Anti Infect The* 773–782 (2007).
140. Hammer, N. D. & Skaar, E. P. Molecular Mechanisms of Staphylococcus aureus Iron Acquisition. *Annual Review of Microbiology* **65,** 129–147 (2011).
141. Ranjard *et al.* A soil microscale study to reveal the heterogeneity of Hg(II) impact on indigenous bacteria by quantification of adapted phenotypes and analysis of community DNA fingerprints. *FEMS Microbiol. Ecol.* **31,** 107–115 (2000).
142. Panaro, N. J. *et al.* Evaluation of DNA Fragment Sizing and Quantification by the Agilent 2100 Bioanalyzer. *Clinical Chemistry* **46,** 1851–1853 (2000).
143. James, A. G., Austin, C. J., Cox, D. S., Taylor, D. & Calvert, R. Microbiological and biochemical origins of human axillary odour. *FEMS Microbiology Ecology* **83,** 527–540 (2013).
144. Alzomor, A. K., Moharram, A. S. & Al Absi, N. M. Formulation and evaluation of potash alum as deodorant lotion and after shaving astringent as cream and gel. *International Current Pharmaceutical Journal* **3,** (2014).
145. Piña, R. G. & Cervantes, C. Microbial interactions with aluminium. *Biometals* **9,** 311–316 (1996).
146. Komatsuzawa, H. *et al.* The gate controlling cell wall synthesis in Staphylococcus

aureus. *Mol. Microbiol.* **53,** 1221–1231 (2004).
147. Barry, T., Colleran, G., Glennon, M., Dunican, L. K. & Gannon, F. The 16s/23s ribosomal spacer region as a target for DNA probes to identify eubacteria. *Genome Res.* **1,** 51–56 (1991).
148. Klappenbach, J. A., Dunbar, J. M. & Schmidt, T. M. rRNA Operon Copy Number Reflects Ecological Strategies of Bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **66,** 1328–1333 (2000).
149. Abdeljabbar, H. *et al.* Halanaerobium sehlinense sp. nov., an extremely halophilic, fermentative, strictly anaerobic bacterium from sediments of the hypersaline lake Sehline Sebkha. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **63,** 2069–2074 (2013).
150. Waller, J. L. *et al.* Detection and characterization of Mycoplasma pneumoniae during an outbreak of respiratory illness at a university. *J. Clin. Microbiol.* (2013). doi:10.1128/JCM.02810-13
151. Sethi, S., Singh, G., Samanta, P. & Sharma, M. Mycoplasma genitalium: an emerging sexually transmitted pathogen. *Indian J. Med. Res.* **136,** 942–955 (2012).
152. Beris, F. S. *et al.* The ATPase activity of the G2alt gene encoding an aluminium tolerance protein from Anoxybacillus gonensis G2. *J. Microbiol.* **49,** 641–650 (2011).
153. Sacoman, J. L. & Hollingsworth, R. I. Synthesis and evaluation of an N-acetylglucosamine biosynthesis inhibitor. *Carbohydr. Res.* **346,** 2294–2299 (2011).
154. Friedrich, T., Steinmüller, K. & Weiss, H. The proton-pumping respiratory complex I of bacteria and mitochondria and its homologue in chloroplasts. *FEBS Letters* **367,** 107–111 (1995).
155. Brzuszkiewicz, E. *et al.* Comparative genomics and transcriptomics of Propionibacterium acnes. e21581 (2011).
156. Kanlayavattanakul, M. & Lourith, N. Body malodours and their topical treatment agents. *Int J Cosmet Sci* **33,** 298–311 (2011).
157. Kieft, T. L., soroker, E. & firestone, M. K. Microbial biomass response to a rapid increase in water potential when dry soil is wetted. *Soil Biology and Biochemistry* **19,** 119–126 (1987).
158. Martinussen, J., Solem, C., Holm, A. K. & Jensen, P. R. Engineering strategies aimed at control of acidification rate of lactic acid bacteria. *Current Opinion in Biotechnology* **24,** 124–129 (2013).
159. Patterson, M. J., Galloway, S. D. & Nimmo, M. A. Variations in regional sweat composition in normal human males. *Exp. Physiol.* **85,** 869–875 (2000).
160. Chakravortty, D. *et al.* The inhibitory action of butyrate on lipopolysaccharide-induced nitric oxide production in RAW 264.7 murine macrophage cells. *Journal of Endotoxin Research* **6,** 243–247 (2000).
161. Morrison, D. J. *et al.* Butyrate production from oligofructose fermentation by the human faecal flora: what is the contribution of extracellular acetate and lactate? *Br. J. Nutr.* **96,** 570–577 (2006).
162. Wang, Y. *et al.* Staphylococcus epidermidis in the human skin microbiome mediates fermentation to inhibit the growth of Propionibacterium acnes: implications of probiotics in acne vulgaris. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **98,** 411–424 (2014).
163. Cui, C. & Adler, J. Effect of mutation of potassium-efflux system, KefA, on mechanosensitive channels in the cytoplasmic membrane of Escherichia coli. *J. Membr. Biol.* **150,** 143–152 (1996).
164. Gründling, A. Potassium uptake systems in Staphylococcus aureus: new stories about ancient systems. *MBio* **4,** e00784–00713 (2013).
165. Pellicer, M. T., Nuñez, M. F., Aguilar, J., Badia, J. & Baldoma, L. Role of 2-

Phosphoglycolate Phosphatase of Escherichia coli in Metabolism of the 2-Phosphoglycolate Formed in DNA Repair. *J. Bacteriol.* **185,** 5815–5821 (2003).
166. Wenk, J. *et al.* UV-induced oxidative stress and photoaging. *Curr. Probl. Dermatol.* **29,** 83–94 (2001).
167. Hackbarth, C. J. & Chambers, H. F. blaI and blaR1 regulate beta-lactamase and PBP 2a production in methicillin-resistant Staphylococcus aureus. *Antimicrob. Agents Chemother.* **37,** 1144–1149 (1993).
168. Creaven, B. S. *et al.* Synthesis and antimicrobial activity of copper(II) and silver(I) complexes of hydroxynitrocoumarins: X-ray crystal structures of [Cu(hnc)2(H2O)2] · 2H2O and [Ag(hnc)] (hncH = 4-hydroxy-3-nitro-2H-chromen-2-one). *Polyhedron* **24,** 949–957 (2005).
169. Grey, B. & Steck, T. R. Concentrations of Copper Thought To Be Toxic to Escherichia coli Can Induce the Viable but Nonculturable Condition. *Applied and Environmental Microbiology* **67,** 5325–5327 (2001).
170. Ramírez-Díaz, M. I. *et al.* Mechanisms of bacterial resistance to chromium compounds. *Biometals* **21,** 321–332 (2008).
171. Truglio, J. J., Croteau, D. L., Van Houten, B. & Kisker, C. Prokaryotic nucleotide excision repair: the UvrABC system. *Chem. Rev.* **106,** 233–252 (2006).
172. Dawson, R. J. P. & Locher, K. P. Structure of a bacterial multidrug ABC transporter. *Nature* **443,** 180–185 (2006).
173. Desvaux, M., Parham, N. J., Scott-Tucker, A. & Henderson, I. R. The general secretory pathway: a general misnomer? *Trends in Microbiology* **12,** 306–309 (2004).
174. Péterszegi, G., Fodil-Bourahla, I., Robert, A. M. & Robert, L. Pharmacological properties of fucose. Applications in age-related modifications of connective tissues. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **57,** 240–245 (2003).
175. Fodil-Bourahla, I., Bizbiz, L., Schoevaert, D., Robert, A. M. & Robert, L. Effect of L-fucose and fucose-rich oligo- and polysaccharides (FROP-s) on skin aging: penetration, skin tissue production and fibrillogenesis. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **57,** 209–215 (2003).
176. Xu, Y., Wang, S.-H., Chao, H.-J., Liu, S.-J. & Zhou, N.-Y. Biochemical and molecular characterization of the gentisate transporter GenK in Corynebacterium glutamicum. *PLoS ONE* **7,** e38701 (2012).
177. Dooley, T. Topical skin depigmentation agents. *J Dermatol treat* **8,** 275–283 (1997).
178. Elbein, A. D., Pan, Y. T., Pastuszak, I. & Carroll, D. New insights on trehalose: a multifunctional molecule. *Glycobiology* **13,** 17R–27R (2003).
179. Hyde, K. D., Bahkali, A. H. & Moslem, M. A. Fungi—an unusual source for cosmetics. *Fungal Diversity* **43,** 1–9 (2010).
180. Berridge, M. J. & Irvine, R. F. Inositol phosphates and cell signalling. *Nature* **341,** 197–205 (1989).
181. Bikle, D. D., Xie, Z. & Tu, C.-L. Calcium regulation of keratinocyte differentiation. *Expert Review of Endocrinology & Metabolism* **7,** 461–472 (2012).
182. Janeke, G. *et al.* Role of taurine accumulation in keratinocyte hydration. *J. Invest. Dermatol.* **121,** 354–361 (2003).
183. Shelburne, S. A. *et al.* Maltodextrin Utilization Plays a Key Role in the Ability of Group A Streptococcus To Colonize the Oropharynx. *Infection and Immunity* **74,** 4605–4614 (2006).
184. Karpuzoglu, E., Holladay, S. D. & Gogal, R. M., Jr. Parabens: potential impact of low-affinity estrogen receptor binding chemicals on human health. *J Toxicol Environ Health B*

Crit Rev **16,** 321–335 (2013).
185. Alton, G. *et al.* Direct utilization of mannose for mammalian glycoprotein biosynthesis. *Glycobiology* **8,** 285–295 (1998).
186. Cunin, R., Glansdorff, N., Piérard, A. & Stalon, V. Biosynthesis and metabolism of arginine in bacteria. 314–352 (1986).
187. Gökmen, S. S., Aygit, A. C., Ayhan, M. S., Yorulmaz, F. & Gülen, S. Significance of arginase and ornithine in malignant tumors of the human skin. *J. Lab. Clin. Med.* **137,** 340–344 (2001).
188. Zhai, H., Chan, H. P., Hui, X. & Maibach, H. I. Skin decontamination of glyphosate from human skin in vitro. *Food and Chemical Toxicology* **46,** 2258–2260 (2008).
189. Packer, L., Witt, E. H. & Tritschler, H. J. Alpha-lipoic acid as a biological antioxidant. *Free Radical Biology and Medicine* **19,** 227–250 (1995).
190. Vuong, C. *et al.* Polysaccharide intercellular adhesin (PIA) protects Staphylococcus epidermidis against major components of the human innate immune system. *Cell. Microbiol.* **6,** 269–275 (2004).
191. Kocianova, S. *et al.* Key role of poly-γ-dl-glutamic acid in immune evasion and virulence of Staphylococcus epidermidis. *Journal of Clinical Investigation* **115,** 688–694 (2005).
192. Bajaj, I. & Singhal, R. Poly (glutamic acid) – An emerging biopolymer of commercial interest. *Bioresource Technology* **102,** 5551–5561 (2011).
193. Vuong, C. *et al.* A Crucial Role for Exopolysaccharide Modification in Bacterial Biofilm Formation, Immune Evasion, and Virulence. *J. Biol. Chem.* **279,** 54881–54886 (2004).
194. Collins, M. D., Burton, R. A. & Jones, D. Corynebacterium amycolatum sp. nov. a new mycolic acid-less Corynebacterium species from human skin. *FEMS Microbiology Letters* **49,** 349–352 (1988).
195. Babu, M. M. *et al.* A Database of Bacterial Lipoproteins (DOLOP) with Functional Assignments to Predicted Lipoproteins. *J. Bacteriol.* **188,** 2761–2773 (2006).
196. Otto, B. R., Verweij-van Vught, A. M. J. J. & Maclaren, D. M. Transferrins and Heme-Compounds as Iron Sources for Pathogenic Bacteria. *Critical Reviews in Microbiology* **18,** 217–233 (1992).
197. Wadhams, G. H. & Armitage, J. P. Making sense of it all: bacterial chemotaxis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5,** 1024–1037 (2004).
198. Auchter, M., Arndt, A. & Eikmanns, B. J. Dual transcriptional control of the acetaldehyde dehydrogenase gene ald of Corynebacterium glutamicum by RamA and RamB. *J. Biotechnol.* **140,** 84–91 (2009).
199. Sekine, Y., Toyooka, S. & Watts, S. F. Determination of acetaldehyde and acetone emanating from human skin using a passive flux sampler—HPLC system. *Journal of Chromatography B* **859,** 201–207 (2007).
200. Kurkivuori, J. *et al.* Acetaldehyde production from ethanol by oral streptococci. *Oral Oncol.* **43,** 181–186 (2007).
201. Winterbourn, C. C. The biological chemistry of hydrogen peroxide. *Meth. Enzymol.* **528,** 3–25 (2013).
202. Keyse, S. M. & Tyrrell, R. M. Heme oxygenase is the major 32-kDa stress protein induced in human skin fibroblasts by UVA radiation, hydrogen peroxide, and sodium arsenite. *PNAS* **86,** 99–103 (1989).
203. Akiyama, M. & Shimizu, H. An update on molecular aspects of the non-syndromic ichthyoses. *Experimental Dermatology* **17,** 373–382 (2008).
204. Marraffini, L. A., Dedent, A. C. & Schneewind, O. Sortases and the art of anchoring

proteins to the envelopes of gram-positive bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **70,** 192–221 (2006).
205. Melvin, J. A. *et al.* Staphylococcus aureus Sortase A Contributes to the Trojan Horse Mechanism of Immune Defense Evasion with Its Intrinsic Resistance to Cys184 Oxidation. *Biochemistry* **50,** 7591–7599 (2011).
206. Metzker, M. L. Sequencing technologies — the next generation. *Nat Rev Genet* **11,** 31–46 (2010).
207. Lukash, K. *et al.* Pharmaceutical Composition Containing Fungicide, Bacteriostatic Sulfonamide and Antibacterial Substance for Topical Using. (2007).
208. Breton, L., Bjuro-Frants, I. & Genish, O. Photoprotective Composition for Skin Designated for Oral Administration. (2008).
209. Gao, Z., Tseng, C., Pei, Z. & Blaser, M. J. Molecular analysis of human forearm superficial skin bacterial biota. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104,** 2927 –2932 (2007).

Annexes

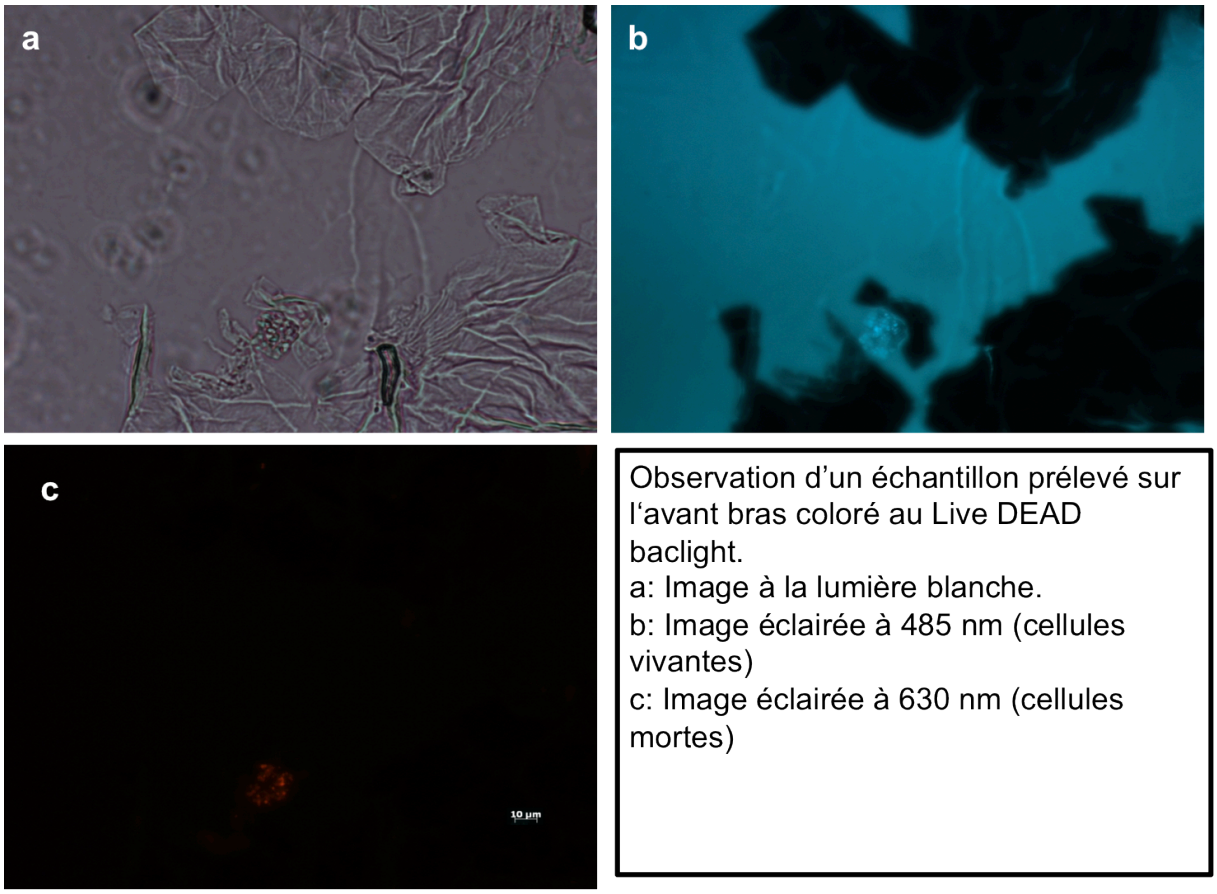
Tableau annexe 1 : Méthode de prélèvement cutané

Méthode de prélèvement cutané	
Solution de prélèvement	Composition (concentrations, référence produits…) : Solution de NaCl 0,15M et Tween20 à 0,1% Stérilisation de la solution par autoclavage. Lors de l'utilisation, distribution en tubes Falcon 50 mL stériles
Matériel utilisé	Bandes de gaze préalablement découpées, ensachées et stérilisées par autoclavage. Tubes Falcon 50 mL stériles
Mode opératoire	Volume de solution utilisé : Très faible volume utilisé (de l'ordre de 1 mL) pour humidifier la gaze Port de gants Oui, gants non stériles, non poudrés. Changement de gants entre chaque échantillon. Type de frottement, durée, nombre de répétitions : Le type de frottement (intensité) est un critère subjectif. Néanmoins 2 passages sont effectués, le premier avec une gaze humidifiée frottée assez fort, puis un 2eme passage avec une gaze sèche pour récupérer les squames restants. Volume final récupéré : Gazes placées en fond de tube Traitement de l'échantillon : suspension conservée en l'état ou centrifugation : Au moment de l'extraction d'ADN, les échantillons (gazes) sont immergés dans des volumes de tampon de prélèvement Congélation des échantillons (gaze en tube falcon) -20°C

Tableau annexe 2 : Extraction ADN avec les méthodes de lyse enzymatique ou de lyse physique.

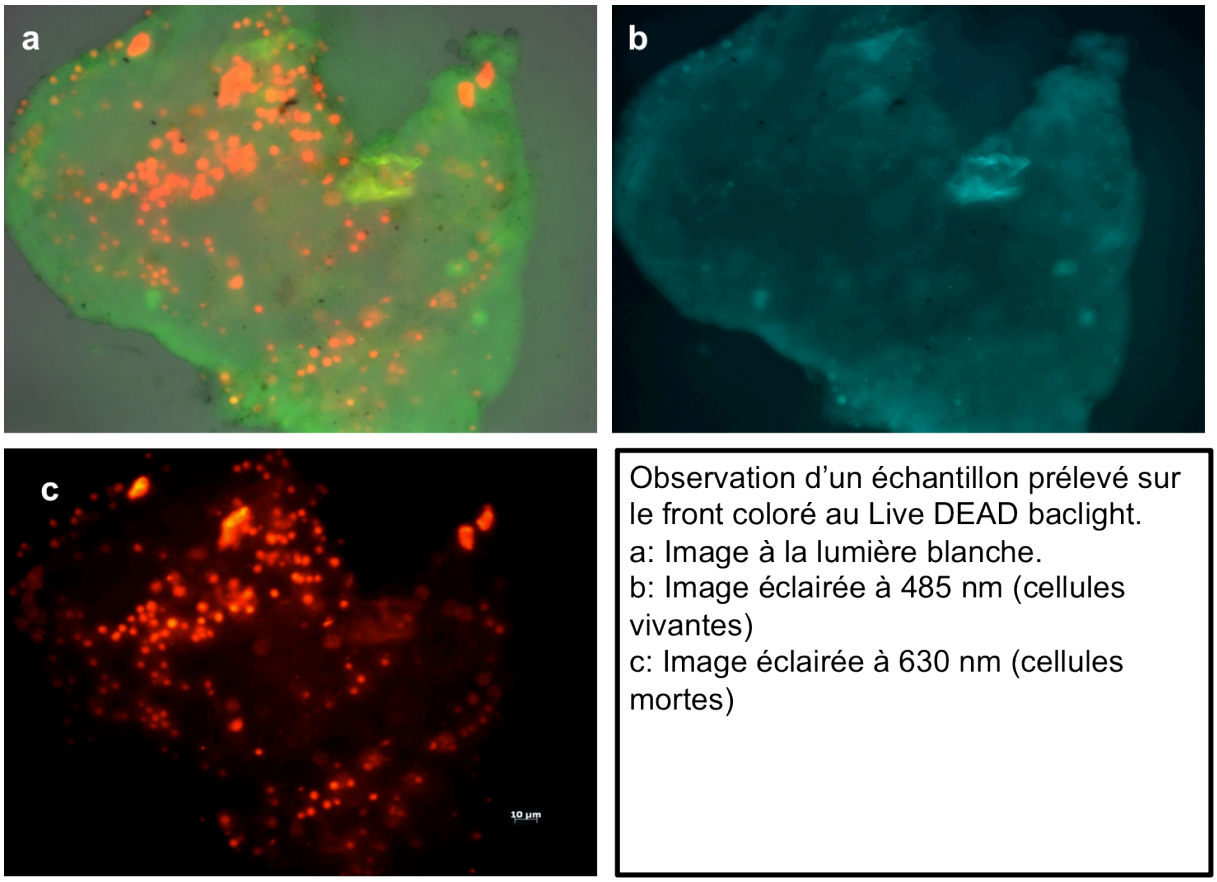
Méthode d'extraction d'ADN avec lyse physique	
Matériel utilisé	Système de Bead-Beating Bead beater FastPrep®24 MP BIO 101 Solution de tampon d'extraction d'ADN, Vf = 400ml : 100mM tris HCL [pH 8] (40 ml, 1M tris HCL pH8) 100 mM sodium EDTA [pH 8] (80 ml, 0,5M EDTA) 100mM phosphate buffer [pH 8] (37,6ml, 1M K2HPO4 ; 2,4 ml 1M KH2PO4) 1,5 M NaCl (120 ml, 5M NaCl) 1% CTAB (4g) H_20 qsp 400 ml Si pH trop acide, le remonter avec solution KOH
Extraction des cellules de la gaze	Remplir le falcon contenant l'échantillon avec la solution de prélèvement. Agiter fortement manuellement et récupérer la solution en essorant les gazes dans un nouveau Falcon. Afin de bien essorer une pipette 10 ml (ou autre instrument stérile) est utilisée afin de bien extraire le contenu de la gaze. Refaire l'essorage 2 fois
Lyse enzymatique	Ajout de 5ml de tampon d'extraction. Ajout de 25 µl mutanolysine (concentration finale 50U/ml) 25µl de lysostaphine (concentration finale 0,01mg/ml) une pincée d'achromopeptidase et de lysoszyme Incubation 1h à 37°C Ajout 2µl proteinase K, 30 min à 37°C Ajout 2 ml SDS 4X température ambiante >1h30 Ajout de phénol puis séparation-précipitation classique.
Lyse physique	Griffiths et al. modifié, meilleur rendement avec ce protocole **Une fois l'échantillon culotté :** Resuspendre le culot avec le tampon d'extraction. Remettre l'équivalent du volume dans lequel le culot « baignait » (car le culot est instable il est toujours difficile de pouvoir enlever complètement le surnageant). Aliquoter dans tube bead beating BIO101 (Lysing Matrix tubes Lysing Matrix E). Volume Max 700 µl. Répartir dans plusieurs tubes si nécessaire (2 tubes sont généralement nécessaires pour 1 échantillon). Ajouter 700 µl de phénol isoamyl alcool (1 :1 :1).

	Conditions de vitesse du bead-beater : 5,5 m/s pendant 30s. Centrifugation 10 min 4°C 11 000 rpm Récupérer le surnageant. Volume Max à récupérer: 700 µl. Généralement 600 µl. Ajouter 1/10 NaCl 5M et 2/1 Ethanol absolu préalablement refroidi. Agiter doucement les tubes afin d'homogénéiser (20 allers retours) et laisser précipiter overnight. Centrifugation 30 min 4°C 12 000 rpm. Jeter le surnageant et laisser sécher le culot. Plus une goutte d'éthanol ne doit être présent (AMA sèche au SpeedVac 15 min 35°C mais si pas l'appareil 2h à l'air libre).
Purification	Purification des échantillons : kit GE HealthCare Illustra GFX PCR DNA and gel band purification kit Volume final de récupération : 60 µl.
Indicateur de succès de manip	Quantification par fluorescence (appareil Qbit) car les faibles rendements et concentrations ne permettent pas un dosage spectrophotométrique. Les rendements sont très variables d'une zone à l'autre, et d'un individu à l'autre pour une même zone prospectée (jusqu'à un facteur 10). Pour certaines zones prospectées, le fait que les quantités d'ADN ne soient pas quantifiables ne constitue pas pour autant un signe d'un échec de l'extraction, et ne remettent pas en cause la suite du processus.



Observation d'un échantillon prélevé sur l'avant bras coloré au Live DEAD baclight.
a: Image à la lumière blanche.
b: Image éclairée à 485 nm (cellules vivantes)
c: Image éclairée à 630 nm (cellules mortes)

Figure annexe 1 : Observation microscopique d'un échantillon prélevé à l'avant bras (X500).



Observation d'un échantillon prélevé sur le front coloré au Live DEAD baclight.
a: Image à la lumière blanche.
b: Image éclairée à 485 nm (cellules vivantes)
c: Image éclairée à 630 nm (cellules mortes)

Figure annexe 2 : Observation microscopique d'un échantillon prélevé sur le front (X500).

Tableau annexe 3 : Numéros d'accessions des métagénomes environnementaux.

Oceans						
4441573.3	4441574.3	4441576.3	4441577.3	4441591.3	4441660.3	4443716.3
4443697.3	4443713.3	4443714.3	4443725.3	4443729.3	4443688.3	
Deep oceans						
4441619.3	4441656.4	4441620.3	4441663.3	4442503.3	4442500.4	
Soils						
4441091.3	4446153.3					
http://metasoil.univ-lyon1.fr for metagenomes corresponding to Rothamsted Park Grass soil experiment.						
Phosphorus removing sludges						
4441092.3	4441093.3					
Acid Mine Drainage Biofilms						
4441137.3	4441138.3					
Singapore indoor polluted airs						
4447940.3	4447941.3					
Human feces						
4447940.3	4447941.3	4440616.3	4440611.3	4440939.3	4440943.3	4440452.7.
4440825.3	4440595.4	4440460.5	4440942.3	4440614.3	4440613.3	
Chicken Cecum						
4440283.3	4440284.3					
Mouse cecum						
4440463.3	4440464.3					
Cow rumen						
4441679.3	4441680.3					
Yellowstone						
4453438.3	4453437.3	4453439.3	4453440.3	4453441.3	4453513.3	4453442.3
453443.3						
Skin						
4474011.3	4474012.3	4474013.3	4474014.3			

Tableau annexe 4 : Les 53 fonctions différemment distribuées dans les métagénomes de peaux par rapport aux 65 autres environnements.

MG-RAST level 3 subsystem	P-value	Peau: Moyenne de fréquence relative ± standard deviation (%)	Autre environnements: Moyenne de fréquence relative ± standard deviation (%)
Alpha-acetolactate operon	4,36E-30	0,08 ±0,03	00
Cannabinoid biosynthesis	3,77E-25	0,05 ±0,01	0,010
Triacylglycerol metabolism	1,70E-24	0,18 ±0,02	0,02 ±0,02
Glutathione analogs: mycothiol	2,80E-24	0,2 ±0,05	0,01 ±0,02
Multi-subunit cation antiporter	3,14E-24	0,42 ±0,15	0,02 ±0,03
Biofilm formation in Staphylococcus	1,46E-22	0,23 ±0,12	0 ±0,01
Adhesins in Staphylococcus	2,41E-22	0,3 ±0,13	0,01 ±0,02
Petrobactin-mediated iron uptake system	9,86E-22	0,05 ±0,03	00
Methicillin resistance in Staphylococci	2,19E-20	0,48 ±0,13	0,11 ±0,04

D-Alanyl Lipoteichoic Acid Biosynthesis	5,18E-18	0,04 ±0,02	00
Lactate utilization	2,57E-15	0,26 ±0,02	0,07 ±0,04
Bacitracin Stress Response	1,50E-14	0,05 ±0,03	0 ±0,01
Cytolysin and Lipase operon in Vibrio	1,52E-14	0,03 ±0,02	00
Toxin-Antitoxin MT1	1,20E-13	0,01 ±0,01	00
Anaerobic Oxidative Degradation of L-Ornithine	2,17E-13	0,09 ±0,07	0 ±0,01
SecY2-SecA2 Specialized Transport System	3,15E-13	0,08 ±0,03	0 ±0,01
Teicoplanin-resistance in Staphylococcus	1,95E-12	0,02 ±0,02	00
Siderophore Anthrachelin	3,76E-12	0,03 ±0,02	00
CoA disulfide thiol-disulfide redox system	1,38E-11	0,02 ±0,01	00
Mannitol Utilization	3,32E-11	0,23 ±0,01	0,07 ±0,04

Fructose utilization	8,73E-11	0,33 ±0,05	0,07 ±0,07
Prophage lysogenic conversion modules	1,38E-10	0,03 ±0,01	0 ±0,01
Acetoin, butanediol metabolism	2,23E-10	0,32 ±0,07	0,14 ±0,04
Teichoic and lipoteichoic acids biosynthesis	2,94E-10	0,31 ±0,1	0,08 ±0,06
Pyruvate Alanine Serine Interconversions	1,03E-09	0,37 ±0,04	0,19 ±0,05
Glycine and Serine Utilization	2,20E-09	0,87 ±0,05	0,54 ±0,09
CBSS-196164.1.peg.461	2,20E-09	0,19 ±0,02	0,06 ±0,04
Menaquinone and Phylloquinone Biosynthesis	3,08E-09	0,2 ±0,03	0,08 ±0,03
Dihydroxyacetone kinases	8,51E-09	0,08 ±0,04	0,02 ±0,02
Staphylococcal pathogenicity islands SaPI	1,10E-08	0,49 ±0,08	0,24 ±0,07
Murein hydrolase regulation and cell death	1,11E-08	0,11 ±0,06	0,03 ±0,02

Purine conversions	2,85E-08	1,02 ±0,06	0,67 ±0,11
Glycerol and Glycerol-3-phosphate Uptake and Utilization	3,12E-08	0,36 ±0,02	0,2 ±0,05
Arginine Deiminase Pathway	3,83E-08	0,21 ±0,01	0,07 ±0,04
Sialic Acid Metabolism	8,69E-08	0,86 ±0,08	0,41 ±0,15
L-Cystine Uptake and Metabolism	1,23E-07	0,08 ±0,03	0,03 ±0,02
Galactose-inducible PTS	1,48E-07	0,1 ±0,01	0,04 ±0,02
TCA Cycle	2,01E-07	1,47 ±0,16	0,73 ±0,25
DNA repair, bacterial RecBCD pathway	4,95E-07	0,2 ±0,07	0,07 ±0,04
Cluster-based Subsystem Grouping Hypotheticals - perhaps Proteosome Related	5,32E-07	0,21 ±0,07	0,06 ±0,05
Alpha-Amylase locus in Streptococcus	1,45E-06	0,06 ±0,01	0,02 ±0,01

D-gluconate and ketogluconates metabolism	2,03E-06	0,27 ±0,07	0,11 ±0,06
At5g63420	2,14E-06	0,59 ±0,09	0,36 ±0,09
D-Sorbitol(D-Glucitol) and L-Sorbose Utilization	2,27E-06	0,04 ±0,03	0,01 ±0,01
Proton-dependent Peptide Transporters	2,45E-06	0,07 ±0,02	0,03 ±0,02
Acetone Butanol Ethanol Synthesis	2,61E-06	0,17 ±0,01	0,4 ±0,09
CBSS-262719.3.peg.410	3,10E-06	0,19 ±0,07	0,1 ±0,03
Ubiquinone Menaquinone-cytochrome c reductase complexes	3,56E-06	0,19 ±0,02	0,06 ±0,05
KDO2-Lipid A biosynthesis	5,39E-06	0,01 ±0,01	0,27 ±0,1
CBSS-280355.3.peg.2835	6,09E-06	0,28 ±0,04	0,18 ±0,04
tRNA aminoacylation, Lys	7,10E-06	0,15 ±0,05	0,08 ±0,03

Vibrio Core Oligosaccharide Biosynthesis	7,71E-06	0,010	0,09 ±0,03

Tableau annexe 5 : Distribution relative des genres bactériens les plus abondamment détectés dans les métagénomes de peau avec la méthode de «Lowest common ancestor ».
Les données sont normalisées avec le nombre de séquences annotées. Puis une recherche bibliographique est effectuée pour savoir si le genre était déjà inféodé au microbiote cutané grâce aux expérimentations basées sur le séquençage du gène *rrs*. + symbolise une détection dans les précédentes études, - l'absence. Puis La référence associée.

Genre	Fréquence relative dans l'individu 1 (%)	Fréquence relative dans l'individu 2 (%)	Détection dans les études *16S*	
Corynebacterium	38,98 ±1,69	31,83 ±4,85	+	[109]
Propionibacterium	7,92 ±0,98	38,37 ±5,05	+	[109]
Staphylococcus	33,3 ±3,66	13,42 ±0,98	+	[109]
Brevibacterium	0,57 ±0,50	0,1 ±0,06	+	[209]
Rothia	0,43 ±0,01	0,06 ±0,00	+	[209]
Malassezia	0,28 ±0,08	0,41 ±0,14	+ Eucaryote	
Cupriavidus	0,36 ±0,36	0 ±0,00	-	
Streptococcus	0,32 ±0,19	0,2 ±0,05	+	[109]
Anaerococcus	0,2 ±0,04	0,08 ±0,02	+	[109]
Micrococcus	0,2 ±0,08	0,08 ±0,02	+	[109]
Kocuria	0,17 ±0,02	0,06 ±0,01	+	[209]

Cyanothece	0,02 ±0,02	0,17 ±0,04	-	
Eremococcus	0,14 ±0,00	0 ±0,00	+	209
Coprobacillus	0,03 ±0,01	0,14 ±0,03	-	
Arthrobacter	0,13 ±0,07	0,03 ±0,02	-	
Actinomyces	0,1 ±0,01	0,07 ±0,01	+	109

Bibliographie:
3. Costello, E. K. *et al.* Bacterial Community Variation in Human Body Habitats Across Space and Time. *Science* **326**, 1694 –1697 (2009).
6. Gao, Z., Tseng, C., Pei, Z. & Blaser, M. J. Molecular analysis of human forearm superficial skin bacterial biota. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**, 2927 – 2932 (2007).

Tableau annexe 6 : Quantité d'ADN extraite des échantillons aisselles (ng).

Echantillons	côté	Quantité (ng)
CJA_AD1	droit	115.42
CJA_AD2	droit	991.8
CJA_AD3	droit	418.76
CJA_AD4	droit	33.698
CJA_AD5	droit	44.254
CJA_AD6	droit	22.62
CJA_AD7	droit	4.582
CJA_AD8	droit	25.056
CJA_AG1	gauche	136.88
CJA_AG2	gauche	986
CJA_AG3	gauche	477.34
CJA_AG4	gauche	126.44
CJA_AG5	gauche	283.04
CJA_AG6	gauche	145.58
CJA_AG7	gauche	483.14
CJA_AG8	gauche	345.68
DAU_AD1	droit	106.14
DAU_AD2	droit	406
DAU_AD3	droit	169.94
DAU_AD4	droit	22.91
DAU_AD5	droit	7.83
DAU_AD6	droit	19.314
DAU_AD7	droit	21.866
DAU_AD8	droit	19.604
DAU_AG1	gauche	45.24
DAU_AG2	gauche	98.6
DAU_AG3	gauche	93.96
DAU_AG4	gauche	195.46
DAU_AG5	gauche	35.09
DAU_AG6	gauche	121.8
DAU_AG7	gauche	142.1
DAU_AG8	gauche	166.46
PRO_AD1	droit	399.04
PRO_AD2	droit	643.8
PRO_AD3	droit	614.8
PRO_AD4	droit	31.262
PRO_AD5	droit	15.08
PRO_AD6	droit	40.194
PRO_AD7	droit	42.978
PRO_AD8	droit	306.82
PRO_AG1	gauche	1102
PRO_AG2	gauche	440.22
PRO_AG3	gauche	591.6

PRO_AG4	gauche	421.66
PRO_AG5	gauche	568.4
PRO_AG6	gauche	469.8
PRO_AG7	gauche	1334
PRO_AG8	gauche	220.98
RTH_AD1	droit	208.8
RTH_AD2	droit	416.44
RTH_AD3	droit	419.92
RTH_AD4	droit	15.312
RTH_AD5	droit	16.53
RTH_AD6	droit	19.14
RTH_AD7	droit	15.138
RTH_AD8	droit	14.616
RTH_AG1	gauche	73.66
RTH_AG2	gauche	205.32
RTH_AG3	gauche	122.96
RTH_AG4	gauche	77.14
RTH_AG5	gauche	69.6
RTH_AG6	gauche	36.714
RTH_AG7	gauche	102.66
RTH_AG8	gauche	92.22

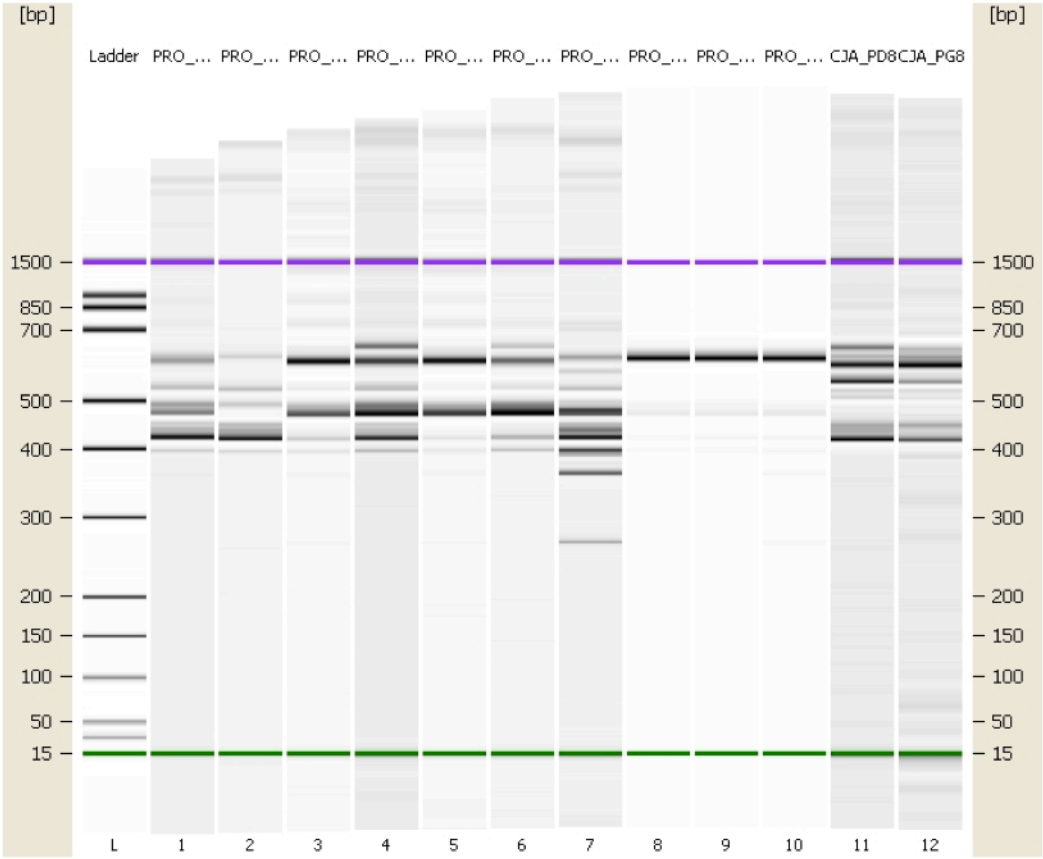


Figure annexe 3 : Représentation virtuelle de profils de migration de produits d'amplification RISA.

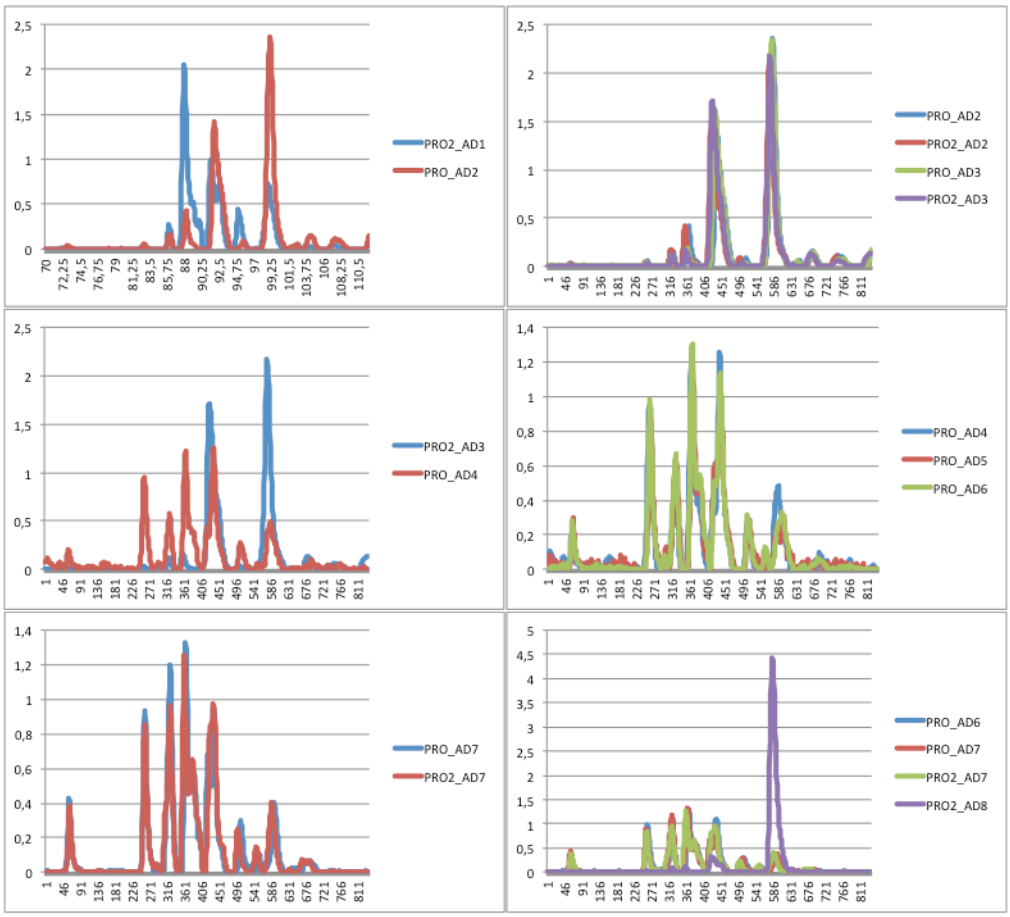


Figure annexe 4 : Electrophorégrammes des échantillons pro aisselle droite des temps t1 à t8.

L'abscisse représente le temps de migration et l'ordonnée la quantité de fluorescence détectée. Le temps t8 n'a pas été pris en compte dans l'analyse car il différait trop des autres temps, laissant penser à un artefact.

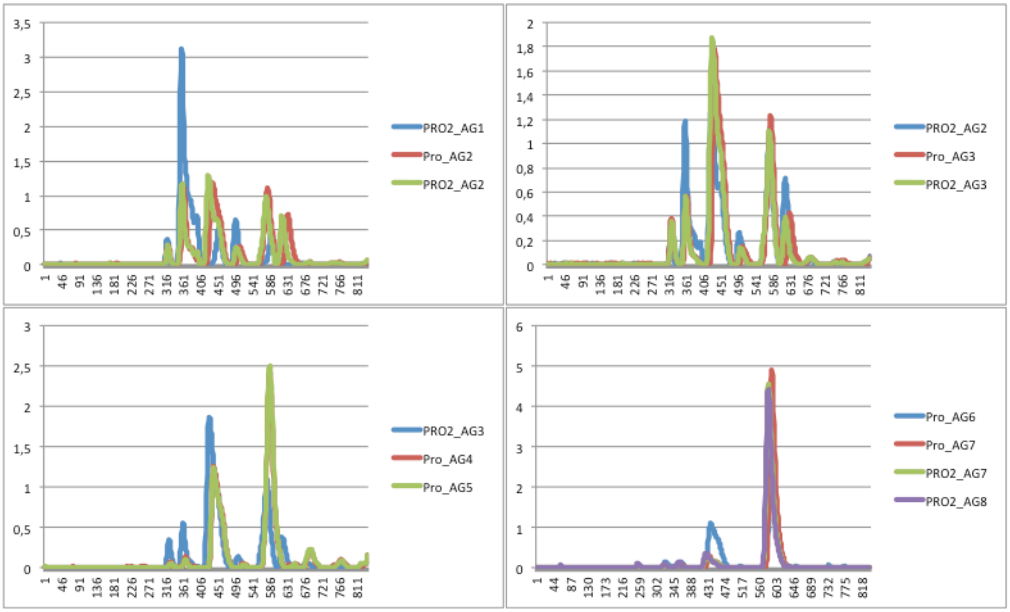


Figure annexe 5 : Electrophorégrammes des échantillons pro aisselle gauche des temps t1 à t8.
L'abscisse représente le temps de migration et l'ordonnée la quantité de fluorescence détectée.

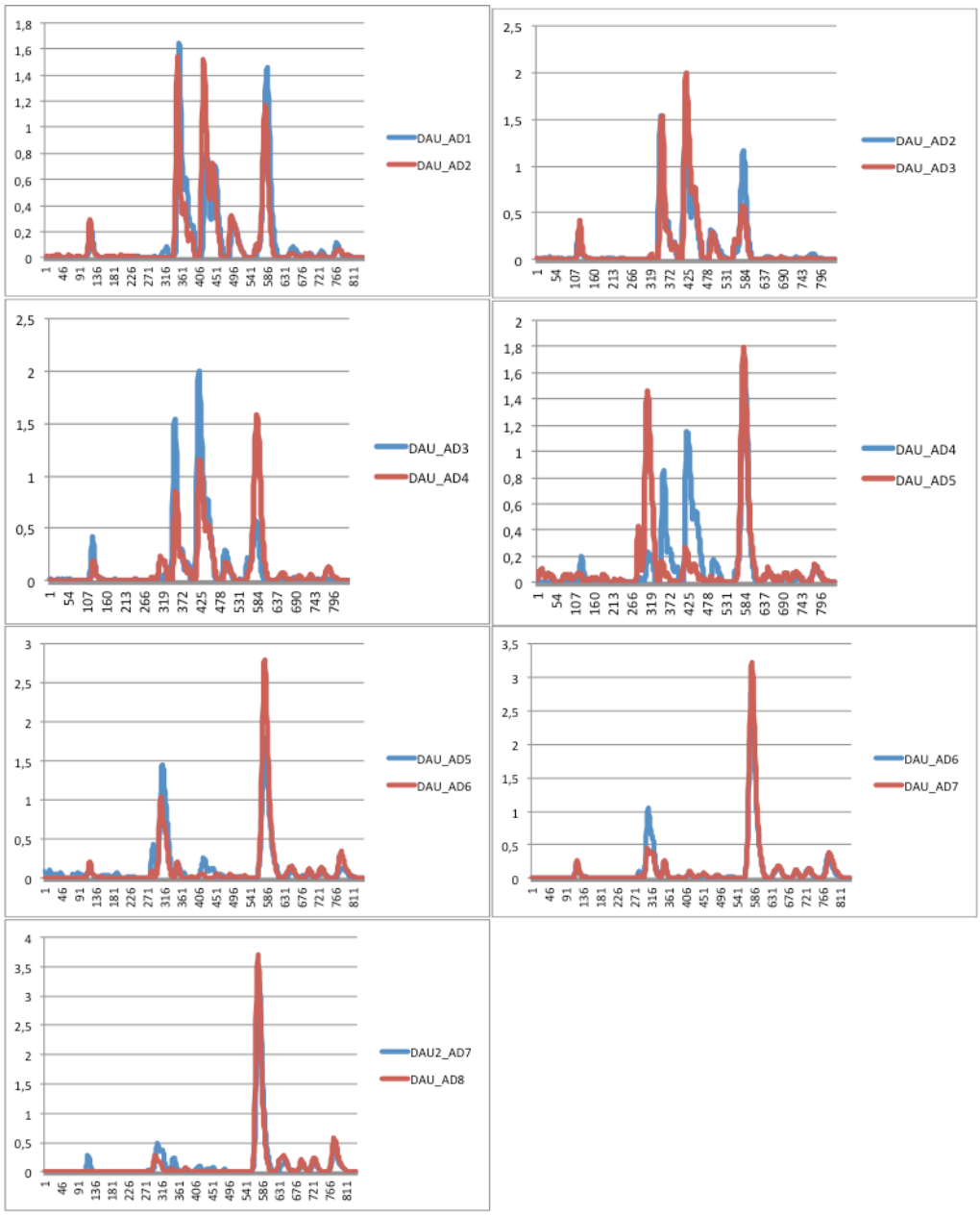


Figure annexe 6 : Electrophorégrammes des échantillons dau aisselle droite des temps t1 à t8.
L'abscisse représente le temps de migration et l'ordonnée la quantité de fluorescence détectée.

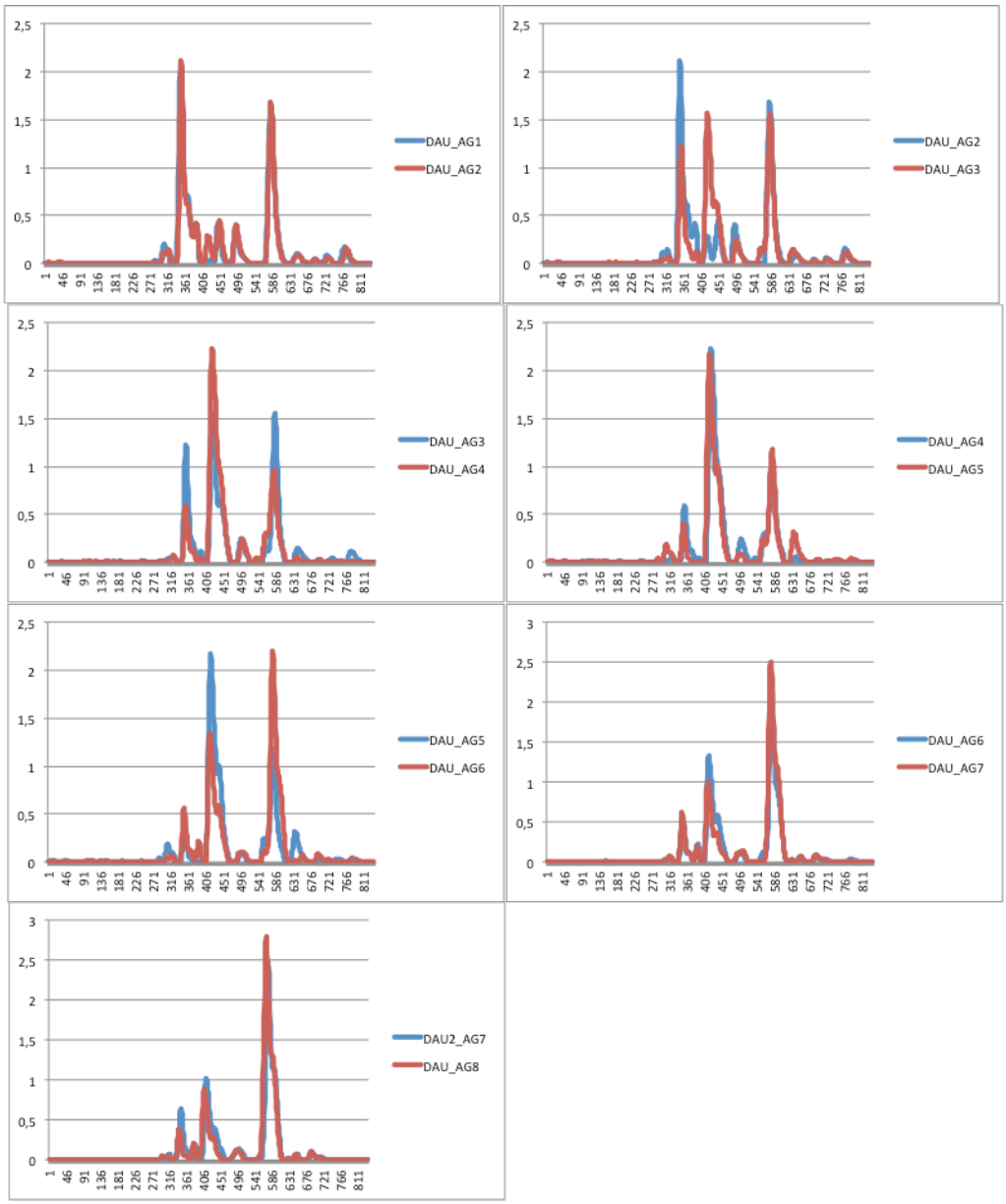


Figure annexe 7 : Electrophorégrammes des échantillons dau aisselle gauche des temps t1 à t8.
L'abscisse représente le temps de migration et l'ordonnée la quantité de fluorescence détectée.

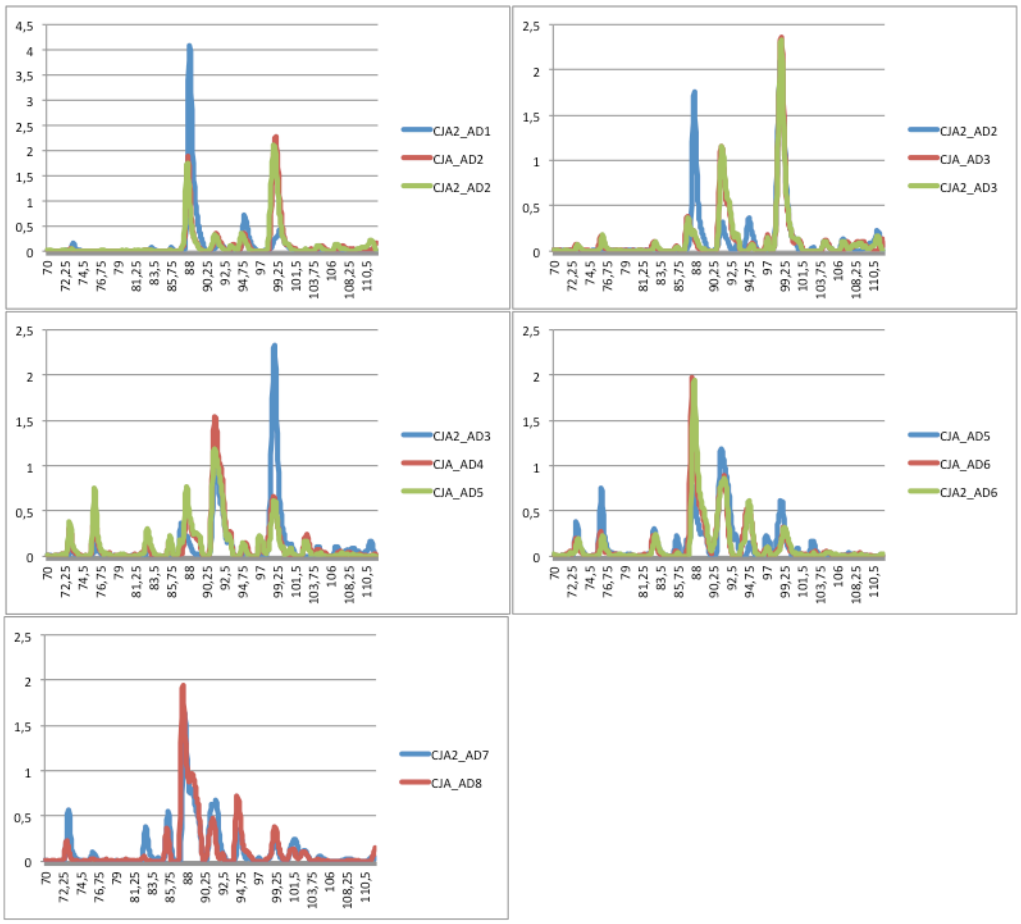


Figure annexe 8 : Electrophorégrammes des échantillons cja aisselle droite des temps t1 à t8.
L'abscisse représente le temps de migration et l'ordonnée la quantité de fluorescence détectée.

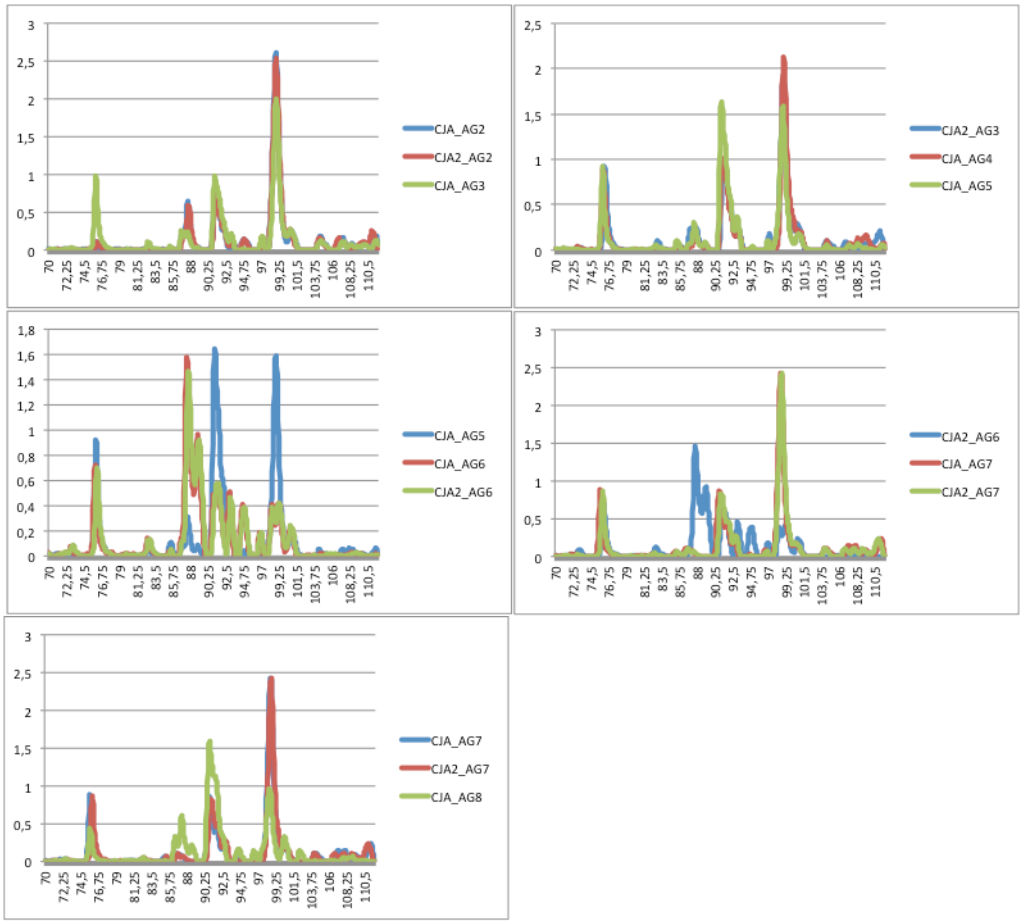


Figure annexe 9 : Electrophorégrammes des échantillons cja aisselle gauche des temps t1 à t8.
L'abscisse représente le temps de migration et l'ordonnée la quantité de fluorescence détectée. Le temps t4 a été sorti de l'analyse car le profil électrophorétique est trop différent des temps d'avant et d'après.

Figure annexe 10 : Electrophorégrammes des échantillons rth aisselle droite et gauche des temps t1 à t8.
L'abscisse représente le temps de migration et l'ordonnée la quantité de fluorescence détectée.

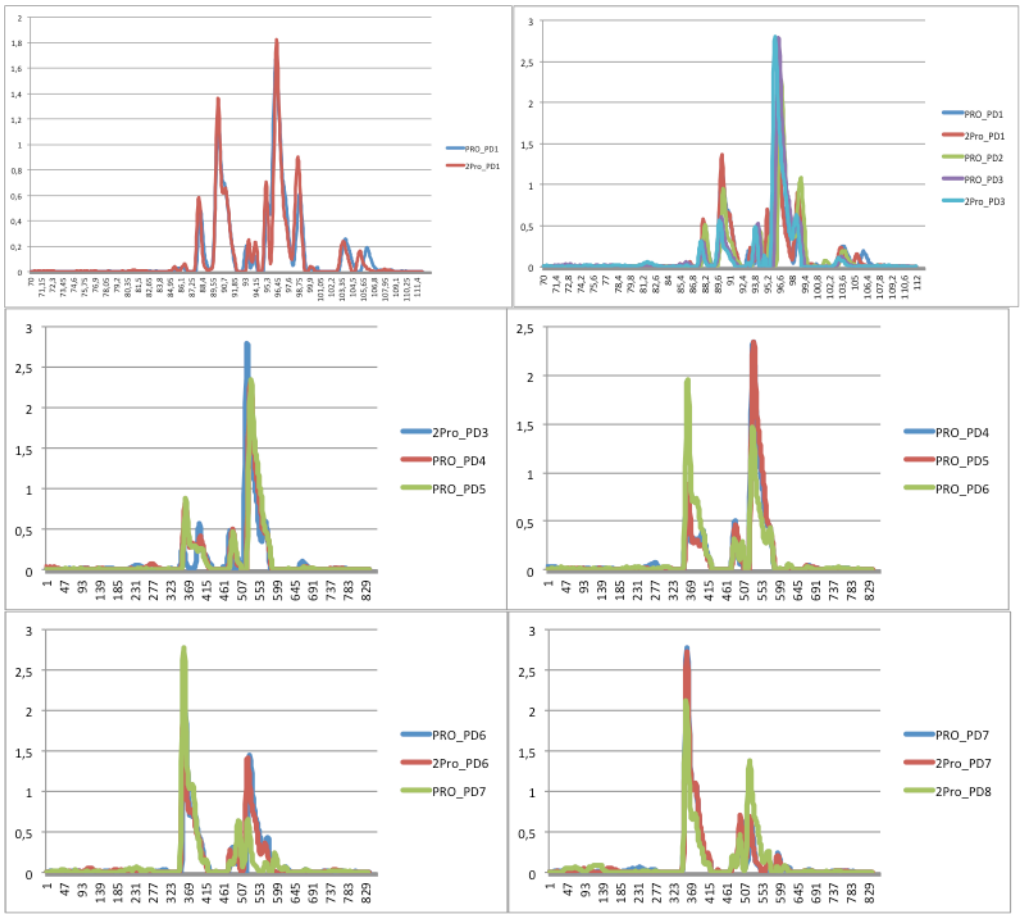


Figure annexe 11 : Electrophorégrammes des échantillons pro pied droit des temps t1 à t8.
L'abscisse représente le temps de migration et l'ordonnée la quantité de fluorescence détectée.

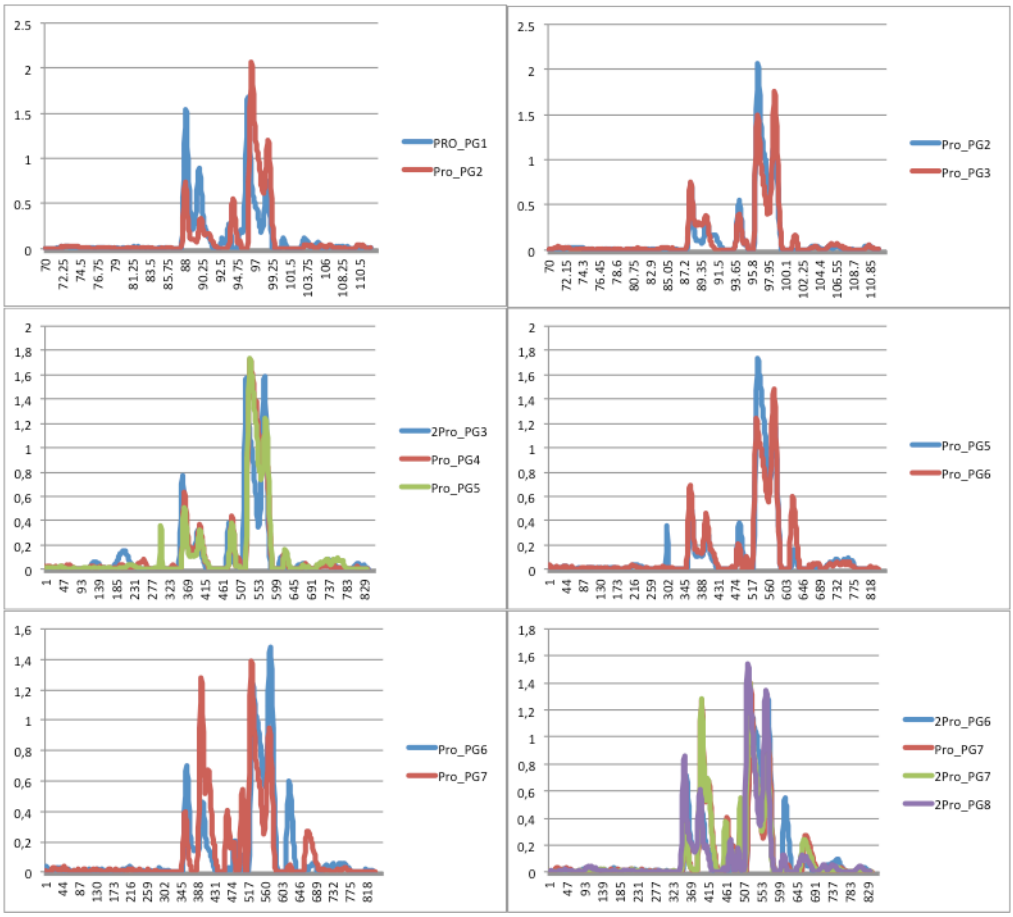


Figure annexe 12 : Electrophorégrammes des échantillons pro pied gauche des temps t1 à t8.
L'abscisse représente le temps de migration et l'ordonnée la quantité de fluorescence détectée.

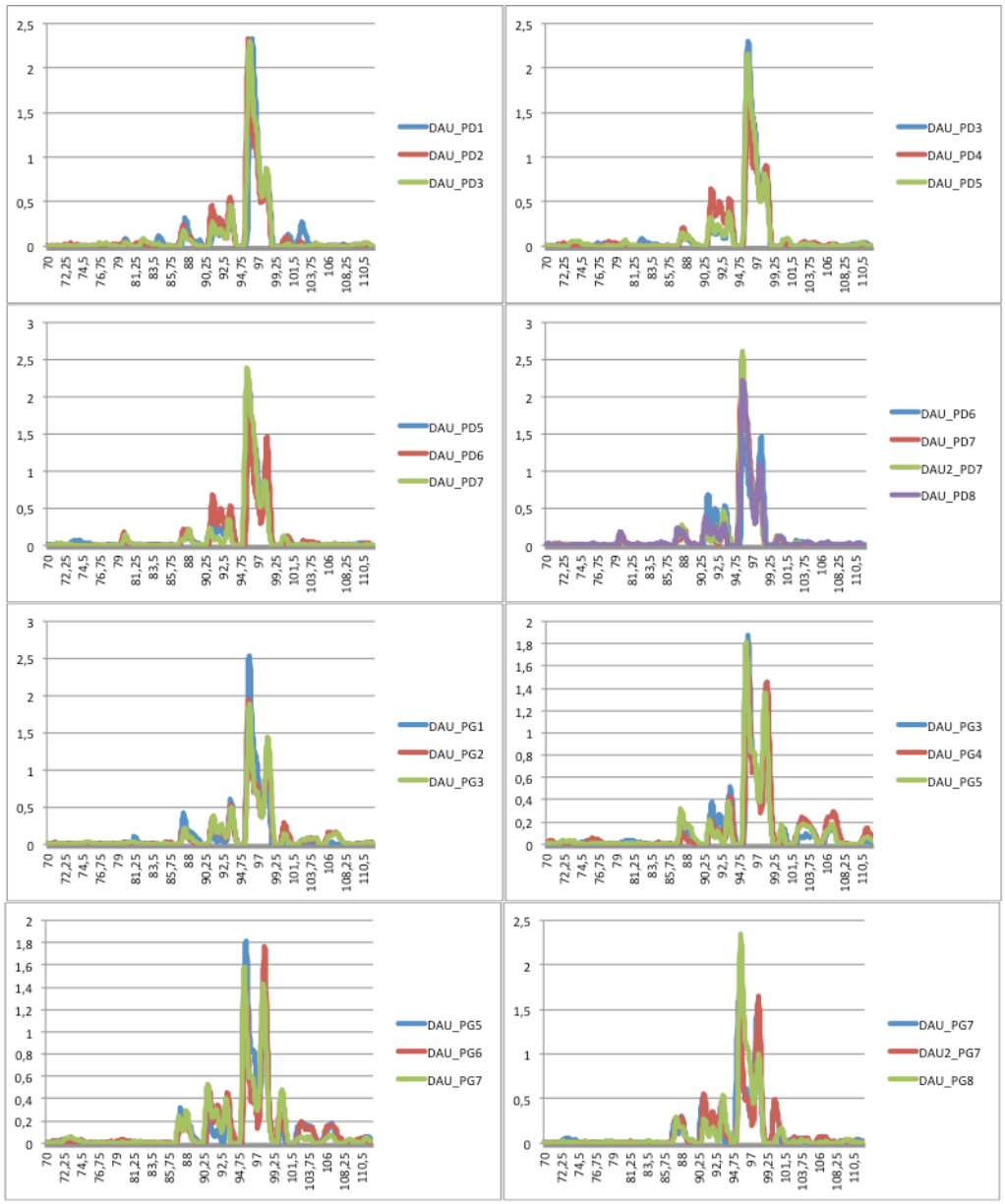


Figure annexe 13 : Electrophorégrammes des échantillons dau pied droit et gauche des temps t1 à t8.
L'abscisse représente le temps de migration et l'ordonnée la quantité de fluorescence détectée.

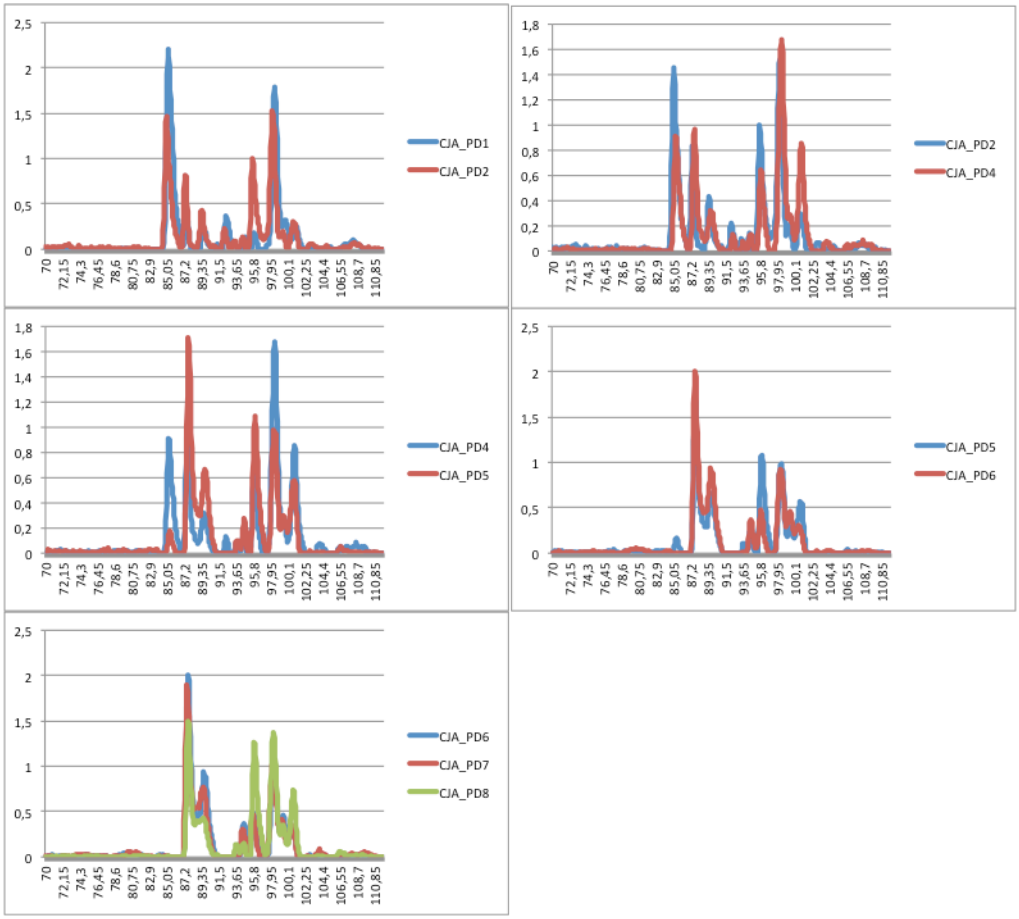


Figure annexe 14 : Electrophorégrammes des échantillons cja pied droit des temps t1 à t8.
L'abscisse représente le temps de migration et l'ordonnée la quantité de fluorescence détectée.

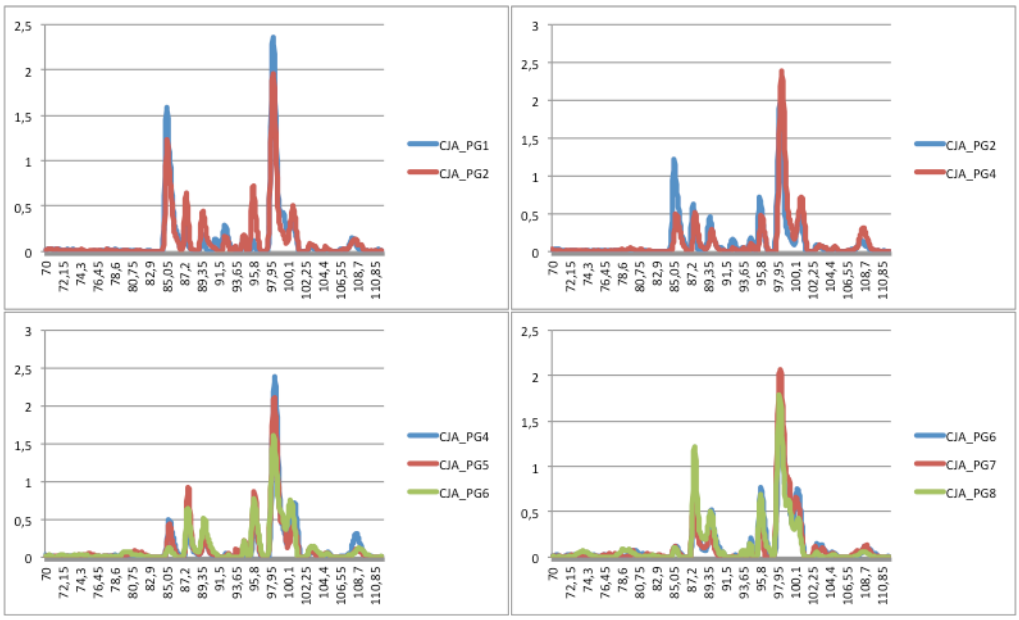


Figure annexe 15 : Electrophorégrammes des échantillons cja pied gauche des temps t1 à t8.
L'abscisse représente le temps de migration et l'ordonnée la quantité de fluorescence détectée.

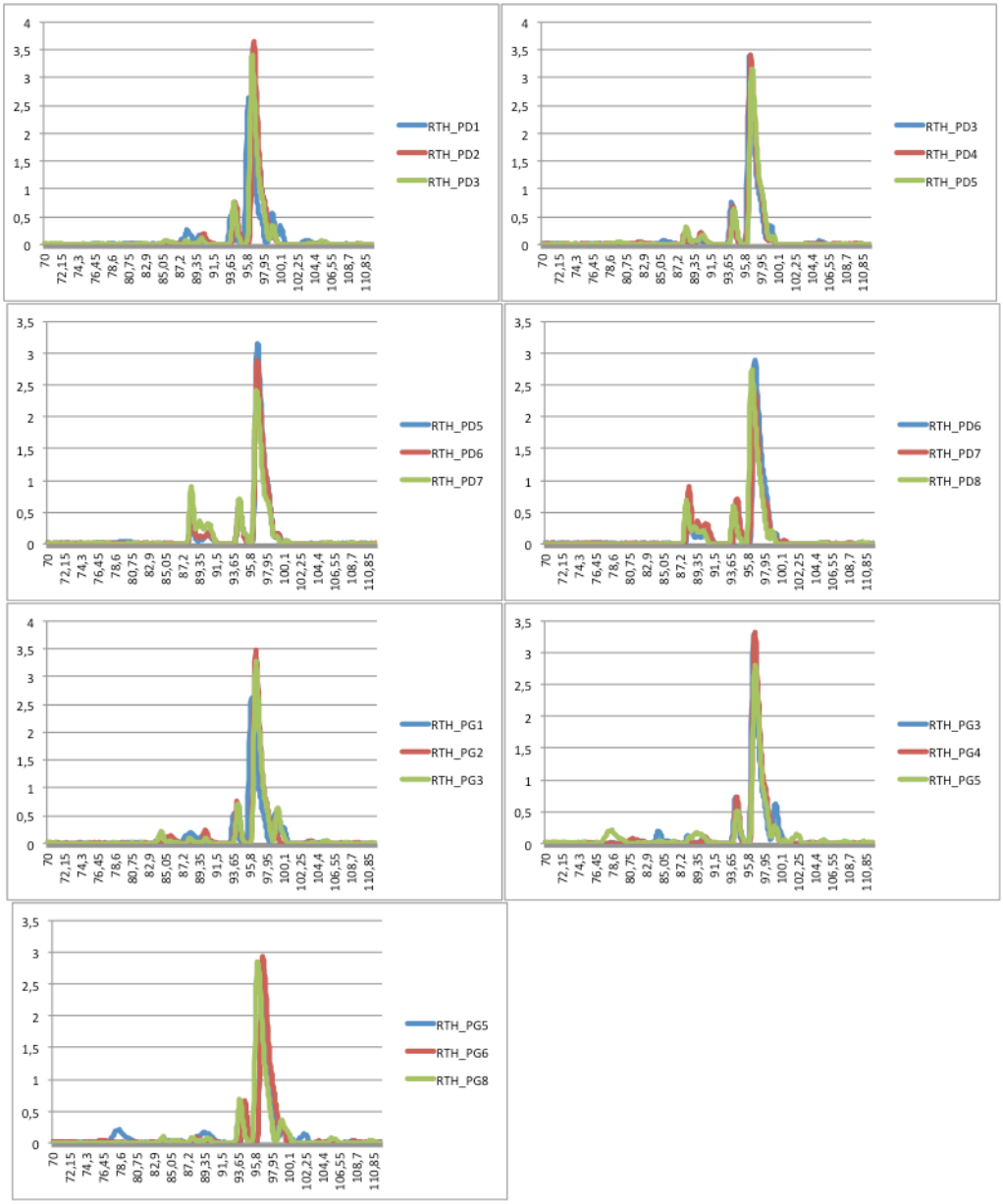


Figure annexe 16 : Electrophorégrammes des échantillons rth pied droite et gauche des temps t1 à t8.
L'abscisse représente le temps de migration et l'ordonnée la quantité de fluorescence détectée.

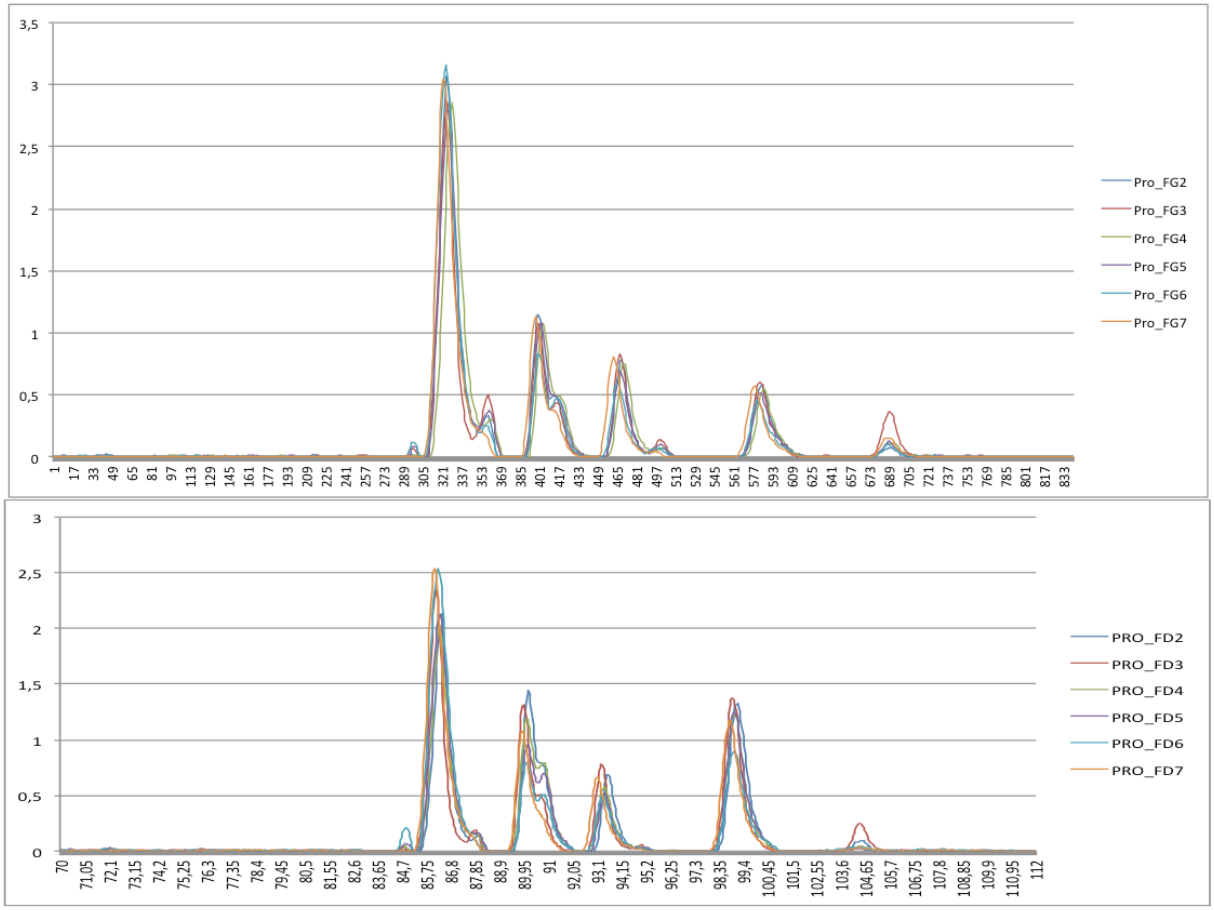


Figure annexe 17: Electrophorégrammes des échantillons pro du front côté droit et gauche des temps t1 à t7.

L'abscisse représente le temps de migration et l'ordonnée la quantité de fluorescence détectée.

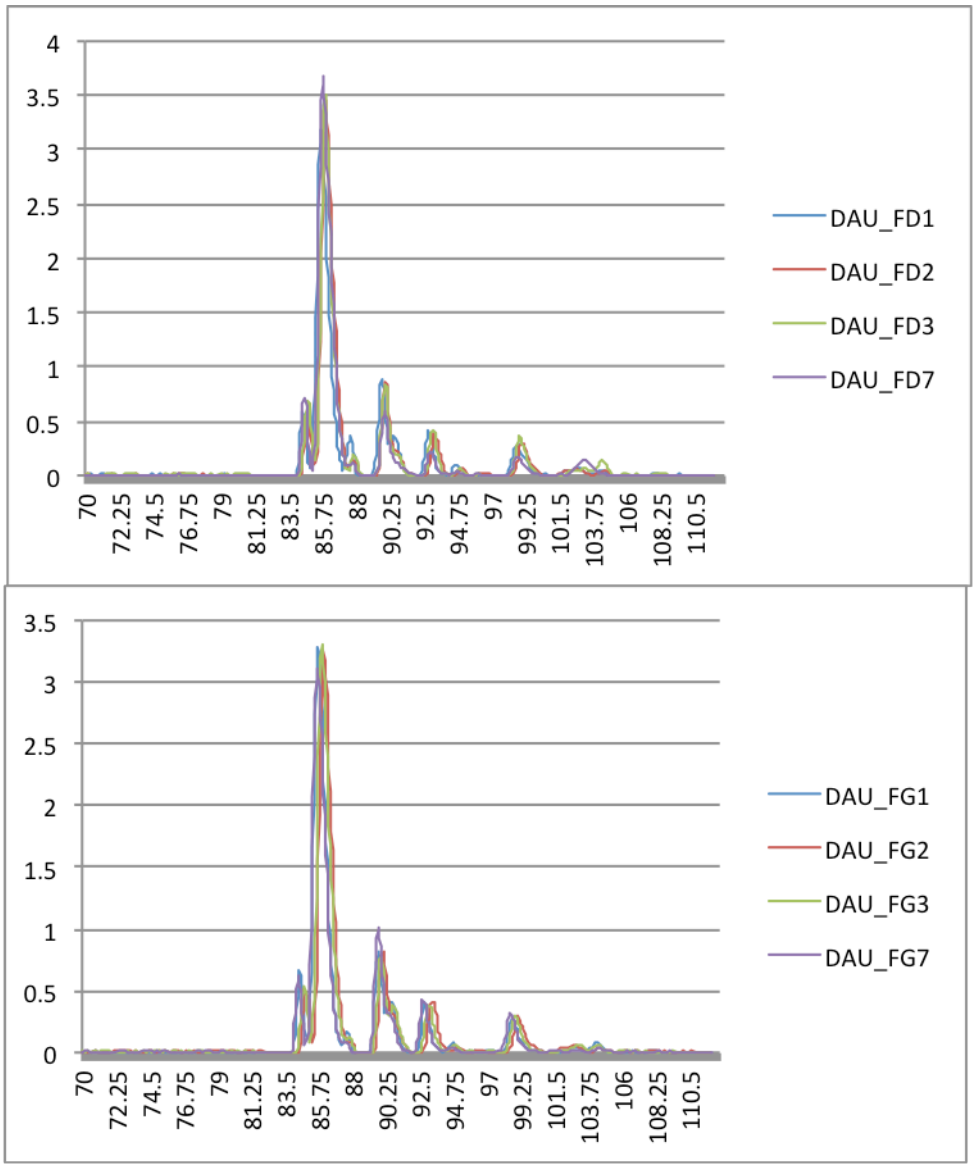


Figure annexe 18: Electrophorégrammes des échantillons dau du front côté droit et gauche des temps t1, t2, t3 et t7.
L'abscisse représente le temps de migration et l'ordonnée la quantité de fluorescence détectée.

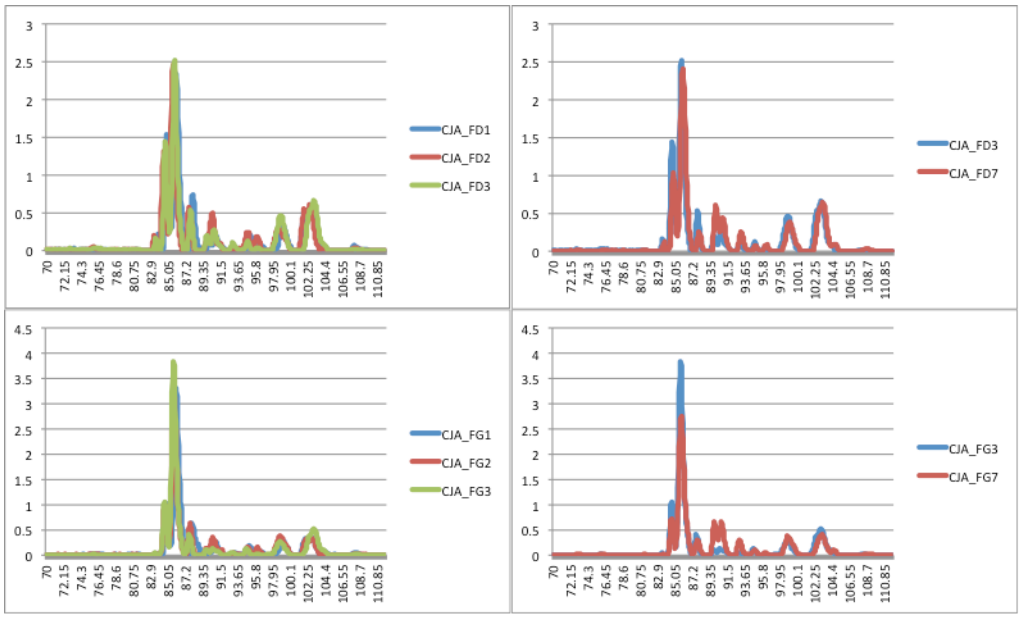


Figure annexe 19: Electrophorégrammes des échantillons cja du front côté droit et gauche des temps t1, t2, t3 et t7.
L'abscisse représente le temps de migration et l'ordonnée la quantité de fluorescence détectée.

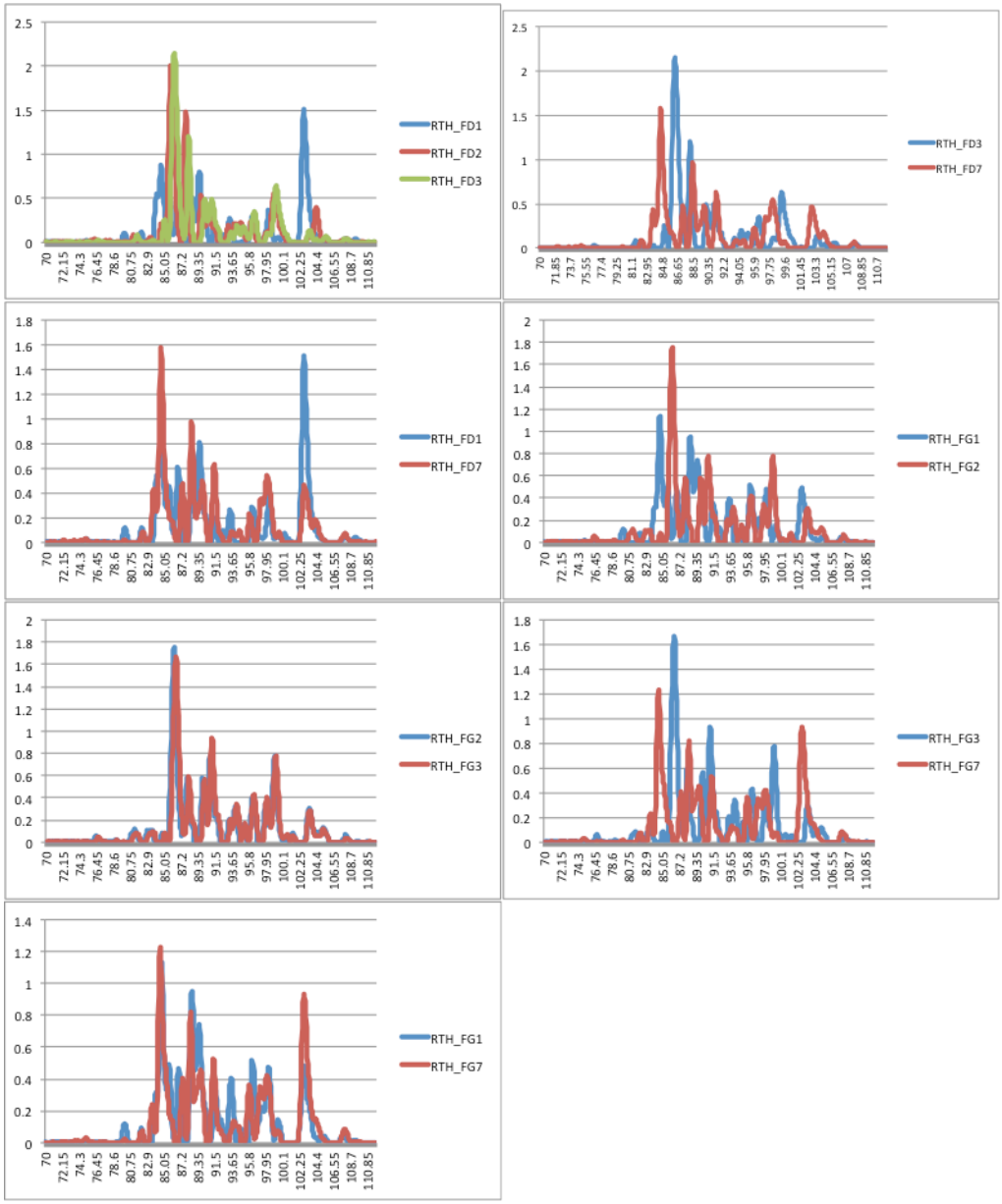


Figure annexe 20 : Electrophorégrammes des échantillons rth du front côté droit et gauche des temps t1, t2, t3 et t7.
L'abscisse représente le temps de migration et l'ordonnée la quantité de fluorescence détectée.

Tableau annexe 7 : Fréquence de distribution relative des 50 premiers genres différemment distribués entre les métagénomes des 3 différentes zones cutanés.

Genus	p-values	Aisselles: mean rel. freq. (%)	Aisselles: std. dev. (%)	Front: mean rel. freq. (%)	Front: std. dev. (%)	Pieds: mean rel. freq. (%)	Pieds: std. dev. (%)
Staphylococcus	1.94E-11	67.0940	13.9222	4.4973	2.7036	62.7909	7.5429
Leptospira	4.07E-10	0.0000	0.0000	0.0004	0.0005	0.0021	0.0002
Brachyspira	5.90E-09	0.0000	0.0000	0.0000	0.0001	0.0005	0.0002
Mycoplasma	5.30E-08	0.0059	0.0021	0.0002	0.0002	0.0013	0.0005
Enterococcus	7.45E-08	0.0098	0.0020	0.0063	0.0069	0.0383	0.0106
Methanosphaera	5.73E-07	0.0000	0.0000	0.0000	0.0001	0.0002	0.0000
Betapapillomavirus	1.38E-06	0.0001	0.0000	0.0142	0.0071	0.0000	0.0001
Halanaerobium	4.01E-06	0.0000	0.0000	0.0001	0.0002	0.0007	0.0003
Clostridium	4.67E-06	0.0104	0.0040	0.0138	0.0060	0.0346	0.0102
Weissella	7.30E-06	0.0001	0.0001	0.0001	0.0002	0.0008	0.0003
Coprococcus	7.45E-06	0.0001	0.0001	0.0007	0.0006	0.0014	0.0003
Providencia	7.48E-06	0.0008	0.0002	0.0003	0.0005	0.0018	0.0005
Heliobacterium	1.05E-05	0.0030	0.0010	0.0005	0.0006	0.0021	0.0006
Acholeplasma	1.25E-05	0.0035	0.0018	0.0006	0.0007	0.0043	0.0006
Maribacter	1.26E-05	0.0008	0.0003	0.0005	0.0005	0.0017	0.0004
Bacillus	2.88E-05	0.0357	0.0104	0.0132	0.0117	0.1313	0.0660
Weeksella	4.53E-05	0.0001	0.0001	0.0007	0.0008	0.0029	0.0014
Ruminococcus	8.00E-05	0.0018	0.0011	0.0084	0.0053	0.0171	0.0072
Polynucleobacter	9.10E-05	0.0000	0.0000	0.0000	0.0001	0.0005	0.0003
unclassified (derived from Spirochaetales)	1.01E-04	0.0003	0.0003	0.0018	0.0011	0.0000	0.0000
Deferribacter	1.30E-04	0.0000	0.0000	0.0000	0.0001	0.0002	0.0001
Faecalibacterium	1.55E-04	0.0005	0.0004	0.0030	0.0017	0.0073	0.0039
Propionibacterium	1.67E-04	7.3847	6.5866	54.1574	35.9120	0.1483	0.0370
Polyporus	2.11E-04	0.0001	0.0001	0.0014	0.0010	0.0000	0.0000
unclassified (derived from Viruses)	2.14E-04	0.0009	0.0007	0.0003	0.0004	0.0017	0.0004
Beggiatoa	2.33E-04	0.0014	0.0005	0.0010	0.0009	0.0062	0.0036
Victivallis	2.83E-04	0.0000	0.0000	0.0002	0.0003	0.0006	0.0003
Anoxybacillus	3.48E-04	0.0001	0.0002	0.0000	0.0001	0.0008	0.0006
Pseudoramibacter	3.70E-04	0.0053	0.0024	0.0007	0.0005	0.0027	0.0017
Methanospirillum	3.73E-04	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0002	0.0002
Edwardsiella	4.30E-04	0.0012	0.0005	0.0003	0.0005	0.0002	0.0002
Oceanobacillus	5.50E-04	0.0002	0.0002	0.0006	0.0008	0.0056	0.0041
Roseburia	6.12E-04	0.0003	0.0002	0.0010	0.0007	0.0016	0.0005
Syntrophobacter	6.52E-04	0.0001	0.0001	0.0001	0.0003	0.0020	0.0015
Methanohalobium	6.54E-04	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0002	0.0002

Alistipes	8.09E-04	0.0000	0.0000	0.0004	0.0004	0.0019	0.0014
Caldanaerobacter	1.01E-03	0.0005	0.0003	0.0000	0.0001	0.0006	0.0004
Methanobrevibacter	1.03E-03	0.0000	0.0000	0.0004	0.0006	0.0014	0.0009
Paramecium	1.18E-03	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0004	0.0003
Catenibacterium	1.19E-03	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0003	0.0003
Thermaerobacter	1.27E-03	0.0003	0.0001	0.0003	0.0004	0.0024	0.0018
Wolbachia	1.37E-03	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0008	0.0007
unclassified (derived from Synergistetes)	1.41E-03	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0002	0.0001
Jonquetella	1.47E-03	0.0000	0.0001	0.0000	0.0001	0.0004	0.0003
Geobacillus	1.52E-03	0.0037	0.0019	0.0006	0.0008	0.0066	0.0041
Lysinibacillus	1.59E-03	0.0001	0.0001	0.0001	0.0002	0.0024	0.0021
Aciduliprofundum	1.60E-03	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0001	0.0001

Tableau annexe 8: Distribution des genres différemment représentés entre les échantillons DAU pieds sans traitement et les échantillons traités DAU PD8 (*p-value* sélective <0,01).

Genus	DAU pieds contrôles: mean rel. freq. (%)	AUTRES: std. dev. (%)	DAU PD8: mean rel. freq. (%)	D8: std. dev. (%)	p-values
Phascolarctobacterium	0.0003	0.0001	0.0000	0.0000	5.29E-05
Pediococcus	0.0002	0.0001	0.0006	0.0000	1.15E-04
Macrococcus	0.0119	0.0058	0.0341	0.0009	2.25E-04
Selaginella	0.0001	0.0000	0.0000	0.0000	3.92E-04
Corynebacterium	23.5169	1.3526	28.2945	0.1206	4.16E-04
Ruminococcus	0.0275	0.0066	0.0057	0.0003	6.67E-04
Staphylococcus	68.5925	1.7343	63.3561	0.1815	8.55E-04
Bdellovibrio	0.0007	0.0002	0.0001	0.0000	9.51E-04
Starkeya	0.0003	0.0001	0.0001	0.0000	1.03E-03
Phaeosphaeria	0.0003	0.0001	0.0000	0.0000	1.06E-03
Listeria	0.0105	0.0010	0.0138	0.0003	1.20E-03
Chlorovirus	0.0001	0.0000	0.0002	0.0000	1.73E-03
Chryseobacterium	0.0020	0.0007	0.0003	0.0001	1.80E-03
Brachyspira	0.0005	0.0002	0.0000	0.0000	2.57E-03
Oxalobacter	0.0001	0.0000	0.0000	0.0000	3.11E-03
Fervidobacterium	0.0001	0.0001	0.0002	0.0000	3.40E-03
unclassified (derived from Lachnospiraceae)	0.0006	0.0002	0.0002	0.0000	3.49E-03
unclassified (derived from Siphoviridae)	0.0438	0.0063	0.0581	0.0002	3.88E-03
Curvibacter	0.0001	0.0001	0.0000	0.0000	4.05E-03
Agrobacterium	0.0016	0.0007	0.0002	0.0001	4.59E-03
Gardnerella	0.0037	0.0010	0.0015	0.0000	4.70E-03
Roseiflexus	0.0002	0.0001	0.0000	0.0000	4.82E-03
Nasonia	0.0001	0.0001	0.0000	0.0000	4.95E-03
unclassified (derived from Bacteroidetes)	0.0001	0.0001	0.0000	0.0000	5.05E-03
unclassified (derived from Caudovirales)	0.0001	0.0001	0.0004	0.0000	5.44E-03
Rahnella	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	5.62E-03
Faecalibacterium	0.0158	0.0071	0.0012	0.0003	5.67E-03
Lentisphaera	0.0000	0.0000	0.0001	0.0000	5.95E-03
Xanthobacter	0.0003	0.0001	0.0000	0.0000	6.69E-03
Propionibacterium	0.1085	0.0277	0.0541	0.0014	6.84E-03
Scheffersomyces	0.0001	0.0002	0.0006	0.0000	7.35E-03
Stenotrophomonas	0.0012	0.0004	0.0003	0.0000	7.71E-03
Mannheimia	0.0002	0.0001	0.0005	0.0000	8.58E-03

Methanobrevibacter	0.0008	0.0003	0.0003	0.0000	8.59E-03
Metarhizium	0.0001	0.0000	0.0000	0.0000	8.62E-03
unclassified (derived from Podoviridae)	0.0002	0.0001	0.0000	0.0000	9.03E-03

Tableau annexe 9 : Distribution des genres différemment représentés entre les échantillons RTH pieds sans traitement et les échantillons traités RTH PD8 (*p-value* sélective <10^{-5}).

Genus	RTH pieds contrôle: mean rel. freq. (%)	RTH pieds contrôle: std. dev. (%)	RTH PD8: mean rel. freq. (%)	RTH PD8: std. dev. (%)	p-values
Candidatus Solibacter	0.0619	0.0016	0.0100	0.0003	8.28E-10
Canis	0.0378	0.0015	0.0076	0.0003	1.35E-08
Gemmatimonas	0.0255	0.0011	0.0040	0.0003	8.42E-08
Bradyrhizobium	0.0468	0.0030	0.0083	0.0006	2.12E-07
Opitutus	0.0122	0.0007	0.0020	0.0001	2.35E-07
Oligotropha	0.0026	0.0002	0.0003	0.0000	3.84E-07
Blastopirellula	0.0106	0.0008	0.0010	0.0002	3.90E-07
Chthoniobacter	0.0232	0.0014	0.0031	0.0001	4.12E-07
Geobacter	0.0153	0.0011	0.0023	0.0002	4.51E-07
unclassified (derived from Verrucomicrobia subdivision 3)	0.0193	0.0013	0.0026	0.0001	4.74E-07
Propionibacterium	0.1832	0.0080	0.0718	0.0004	5.05E-07
Planctomyces	0.0233	0.0015	0.0035	0.0000	8.12E-07
Hirschia	0.0012	0.0001	0.0002	0.0000	1.00E-06
Conexibacter	0.1503	0.0106	0.0283	0.0005	1.39E-06
unclassified (derived from Gammaproteobacteria)	0.0129	0.0009	0.0020	0.0003	1.80E-06
Microscilla	0.0057	0.0005	0.0011	0.0000	1.96E-06
Rhodothermus	0.0051	0.0005	0.0009	0.0001	2.22E-06
Xanthobacter	0.0066	0.0005	0.0016	0.0000	2.23E-06
Anaerolinea	0.0043	0.0004	0.0005	0.0001	2.57E-06
Phenylobacterium	0.0099	0.0010	0.0019	0.0002	2.70E-06
Terriglobus	0.0042	0.0004	0.0010	0.0000	2.70E-06
Pirellula	0.0163	0.0015	0.0020	0.0001	2.87E-06
Candidatus Koribacter	0.0150	0.0015	0.0019	0.0002	3.05E-06
Phaeosphaeria	0.0174	0.0013	0.0069	0.0002	3.08E-06
Verrucomicrobium	0.0113	0.0010	0.0019	0.0001	3.25E-06
Marinobacter	0.0055	0.0005	0.0010	0.0001	3.28E-06
AHJD-like viruses	0.0012	0.0006	0.0063	0.0000	3.62E-06
unclassified (derived from Alphaproteobacteria)	0.0124	0.0011	0.0025	0.0000	3.91E-06
Methylotenera	0.0030	0.0002	0.0003	0.0001	4.05E-06
Magnetococcus	0.0014	0.0001	0.0003	0.0000	4.32E-06
Spirosoma	0.0339	0.0033	0.0085	0.0005	4.85E-06
Nitrospira	0.0206	0.0021	0.0027	0.0002	4.85E-06

Methanoculleus	0.0007	0.0001	0.0001	0.0000	5.34E-06
Anaeromyxobacter	0.0194	0.0017	0.0037	0.0000	5.67E-06
Ahrensia	0.0010	0.0001	0.0002	0.0000	6.08E-06
Hyphomicrobium	0.0101	0.0010	0.0017	0.0000	6.46E-06
Chloroflexus	0.0060	0.0004	0.0011	0.0001	6.55E-06
unclassified (derived from Bacteria)	0.0441	0.0042	0.0081	0.0001	6.59E-06
Bacteriovorax	0.0041	0.0005	0.0007	0.0001	6.78E-06
Candidatus Protochlamydia	0.0020	0.0003	0.0002	0.0000	6.82E-06
Thermaerobacter	0.0041	0.0004	0.0007	0.0001	7.03E-06
Ktedonobacter	0.0209	0.0024	0.0045	0.0004	7.27E-06
Candidatus Desulforudis	0.0009	0.0001	0.0001	0.0000	7.29E-06
Acidobacterium	0.0129	0.0015	0.0021	0.0002	7.36E-06
Azotobacter	0.0022	0.0002	0.0004	0.0000	8.43E-06
Sinorhizobium	0.0229	0.0028	0.0037	0.0004	8.53E-06
unclassified (derived from unclassified sequences)	0.0095	0.0010	0.0017	0.0001	8.72E-06
Syntrophobacter	0.0037	0.0004	0.0007	0.0000	8.79E-06
Rubrobacter	0.0588	0.0056	0.0154	0.0004	8.97E-06
Cupriavidus	0.0130	0.0016	0.0025	0.0003	9.20E-06
Afipia	0.0024	0.0003	0.0004	0.0000	9.51E-06
Nitrobacter	0.0141	0.0015	0.0025	0.0001	9.62E-06
Rhizobium	0.0260	0.0028	0.0051	0.0002	9.86E-06

Tableau annexe 10 : Distribution des genres différemment représentés entre les échantillons RTH aisselles sans traitement et les échantillons traités RTH AD8 (*p-value* sélective <10^{-7}).

Genus	RTH aisselle contrôle: mean rel. freq. (%)	RTH aisselle contrôle: std. dev. (%)	RTH AD8: mean rel. freq. (%)	RTH AD8: std. dev. (%)	p-values
Flavobacterium	0.0001	0.0001	0.0142	0.0000	9.51E-13
Homo	0.0356	0.0086	0.7310	0.0017	3.30E-12
Coccidioides	0.0000	0.0000	0.0036	0.0000	2.06E-11
Phenylobacterium	0.0002	0.0001	0.0089	0.0000	2.90E-11
Rothia	0.0037	0.0012	0.0644	0.0003	5.62E-11
Pantoea	0.0049	0.0039	0.3168	0.0002	5.83E-11
Deinococcus	0.0002	0.0001	0.0075	0.0000	9.58E-11
Sphingomonas	0.0007	0.0005	0.0283	0.0001	1.37E-10
Sphaerobacter	0.0001	0.0001	0.0042	0.0000	5.05E-10
Pongo	0.0002	0.0001	0.0049	0.0000	5.47E-10
Beutenbergia	0.0010	0.0004	0.0164	0.0001	6.98E-10
Arthrobacter	0.0379	0.0209	0.8038	0.0026	8.82E-10
Planctomyces	0.0002	0.0001	0.0058	0.0000	1.24E-09
Gordonia	0.0052	0.0014	0.1549	0.0005	1.36E-09
Sulfitobacter	0.0003	0.0003	0.0093	0.0001	1.61E-09
Methylosinus	0.0001	0.0001	0.0037	0.0000	3.11E-09
Micromonospora	0.0018	0.0007	0.0183	0.0001	4.36E-09
Oxalobacter	0.0001	0.0001	0.0033	0.0000	5.14E-09
Janibacter	0.0044	0.0023	0.0782	0.0001	5.93E-09
Rhodospirillum	0.0005	0.0003	0.0097	0.0001	6.03E-09
Bacteroides	0.0014	0.0004	0.0124	0.0000	6.45E-09
Erwinia	0.0017	0.0012	0.0286	0.0003	7.93E-09
Kribbella	0.0019	0.0006	0.0209	0.0002	8.07E-09
Dickeya	0.0002	0.0001	0.0039	0.0000	1.04E-08
Desulfomicrobium	0.0001	0.0001	0.0034	0.0000	1.66E-08
Desulfococcus	0.0000	0.0000	0.0008	0.0000	2.43E-08
Alkalilimnicola	0.0001	0.0000	0.0010	0.0000	2.71E-08
Roseibium	0.0002	0.0001	0.0035	0.0000	2.77E-08
Danio	0.0000	0.0000	0.0012	0.0000	4.75E-08
Exiguobacterium	0.0004	0.0001	0.0026	0.0000	4.76E-08
Jonesia	0.0010	0.0003	0.0069	0.0001	4.96E-08
Thermomonospora	0.0007	0.0002	0.0059	0.0000	6.26E-08
Frankia	0.0034	0.0015	0.0312	0.0004	6.68E-08
Thermincola	0.0000	0.0000	0.0003	0.0000	6.81E-08
Bilophila	0.0000	0.0000	0.0004	0.0000	6.82E-08
Brachybacterium	0.0106	0.0056	0.1938	0.0019	9.47E-08
Serratia	0.0005	0.0007	0.0115	0.0002	9.72E-08

Tableau annexe 11 : Distribution des genres différemment représentés entre les échantillons RTH aisselles sans traitement et les échantillons traités RTH AD8 (*p-value* sélective <10^{-4}).

Genus	DAU aisselle contrôle: mean rel. freq. (%)	DAU aisselle contrôle: std. dev. (%)	DAU AD8: mean rel. freq. (%)	DAU AD8: std. dev. (%)	p-values
Leuconostoc	0.0004	0.0001	0.0036	0.0000	2.02E-10
Acinetobacter	0.0028	0.0009	0.0223	0.0002	1.26E-08
Faecalibacterium	0.0009	0.0007	0.0138	0.0001	5.80E-08
Magnetospirillum	0.0007	0.0005	0.0074	0.0001	9.76E-08
Serratia	0.0050	0.0047	0.0706	0.0007	1.30E-07
Selenomonas	0.0001	0.0001	0.0011	0.0000	1.37E-07
Stenotrophomonas	0.0020	0.0020	0.0285	0.0004	1.59E-07
Listeria	0.0104	0.0007	0.0011	0.0001	1.93E-07
Gallus	0.0000	0.0000	0.0008	0.0000	2.31E-07
unclassified (derived from Flavobacteriales)	0.0000	0.0000	0.0004	0.0000	2.41E-07
Ornithorhynchus	0.0002	0.0001	0.0019	0.0000	5.68E-07
Bacteroides	0.0023	0.0006	0.0292	0.0003	1.33E-06
Rhodococcus	0.0121	0.0046	0.0532	0.0007	1.87E-06
Granulicatella	0.0010	0.0006	0.0059	0.0000	3.22E-06
Nocardia	0.0034	0.0010	0.0127	0.0000	3.30E-06
Brachyspira	0.0000	0.0000	0.0004	0.0000	4.21E-06
Dietzia	0.0045	0.0027	0.0264	0.0006	4.36E-06
Oryza	0.0001	0.0001	0.0014	0.0000	4.49E-06
Rothia	0.0048	0.0021	0.0188	0.0003	9.71E-06
Gluconobacter	0.0001	0.0001	0.0009	0.0000	1.03E-05
Capnocytophaga	0.0001	0.0002	0.0015	0.0000	1.25E-05
unclassified (derived from unclassified sequences)	0.0001	0.0001	0.0009	0.0000	1.29E-05
Zymobacter	0.0000	0.0001	0.0004	0.0000	1.38E-05
Phenylobacterium	0.0003	0.0001	0.0011	0.0000	1.60E-05
Nakamurella	0.0153	0.0028	0.1122	0.0014	1.89E-05
Solobacterium	0.0000	0.0000	0.0003	0.0000	2.68E-05
Sanguibacter	0.0027	0.0012	0.0094	0.0002	3.09E-05
Renibacterium	0.0004	0.0001	0.0013	0.0000	3.30E-05
Pseudomonas	0.0037	0.0013	0.0669	0.0007	3.42E-05
Geodermatophilus	0.0017	0.0010	0.0066	0.0002	4.70E-05
Polaromonas	0.0004	0.0003	0.0021	0.0000	4.77E-05
Pantoea	0.0001	0.0001	0.0006	0.0000	5.19E-05
Sphingobium	0.0009	0.0005	0.0043	0.0002	5.67E-05

Kytococcus	0.0132	0.0054	0.0390	0.0010	6.35E-05
-	6.7618	1.6270	14.5321	0.3294	6.78E-05
Gordonia	0.0226	0.0153	0.0950	0.0017	8.39E-05

Tableau annexe 12: Distribution des genres différemment distribués entre les échantillons DAU front contrôles et FD8 (*p-value* sélective <0,01).

Genus	DAU: mean rel. freq. (%)	DAU: std. dev. (%)	FD8: mean rel. freq. (%)	FD8: std. dev. (%)	p-values
Lactococcus	0.0005	0.0004	0.0027	0.0001	1.13E-04
Sorangium	0.0000	0.0000	0.0002	0.0000	3.61E-04
Microscilla	0.0001	0.0000	0.0000	0.0000	3.94E-04
Treponema	0.0004	0.0002	0.0014	0.0001	3.94E-04
Daphnia	0.0002	0.0001	0.0000	0.0000	1.71E-03
Musa	0.0000	0.0000	0.0002	0.0000	1.87E-03
Malassezia	0.6360	0.1563	0.2306	0.0119	1.92E-03
Finegoldia	0.0002	0.0001	0.0004	0.0000	2.67E-03
Laccaria	0.0006	0.0002	0.0001	0.0001	5.61E-03
Ruminococcus	0.0050	0.0016	0.0019	0.0002	6.14E-03
Listeria	0.0002	0.0001	0.0003	0.0000	6.27E-03
Mycobacterium	0.0076	0.0010	0.0048	0.0004	6.28E-03
Ustilago	0.0220	0.0077	0.0070	0.0005	7.02E-03
Thermomonospora	0.0002	0.0001	0.0000	0.0000	8.62E-03
Puccinia	0.0008	0.0003	0.0003	0.0001	8.65E-03

Tableau annexe 13: Fonctions différemment distribuées entre les échantillons de l'aisselle de l'individu DAU droit temps 8 et les autres échantillons de l'aisselle (*p-value* $<10^{-4}$).

Level3	DAU AD8: mean rel. freq. (%)	DAU AD8: std. dev. (%)	Autres: mean rel. freq. (%)	Autres: std. dev. (%)	p-values
Arsenic resistance	0.0471	0.0013	0.1861	0.0068	1.24E-08
CBSS-316273.3.peg.2378	0.1561	0.0013	0.0095	0.004	1.82E-08
Chloroaromatic degradation pathway	0.0296	0.0001	0.003	0.0016	2.18E-07
Exopolysaccharide Biosynthesis	0.0083	0.0009	0.0552	0.0039	5.12E-07
Protocatechuate branch of beta-ketoadipate pathway	0.0532	0.0009	0.0075	0.0041	5.14E-07
tRNA aminoacylation, Phe	0.152	0.0007	0.1186	0.0034	1.01E-06
Inner membrane protein YhjD and conserved cluster involved in LPS biosynthesis	0.0003	0	0	0	1.05E-06
Ketoisovalerate oxidoreductase	0.024	0	0.0356	0.0009	1.13E-06
Quinone oxidoreductase family	0.0673	0	0.0332	0.0028	1.23E-06
Transcription factors cyanobacterial RpoD-like sigma factors	0.0538	0.0004	0.0378	0.0012	1.63E-06
Phosphonate metabolism	0.0016	0	0.0001	0	3.05E-06
Resistance to chromium compounds	0.0517	0.0012	0.005	0.0037	3.50E-06
HMG CoA Synthesis	0.0088	0	0.002	0.0007	3.61E-06
Vibrio Polysaccharide (VPS) Biosynthesis	0.0524	0.0016	0.1152	0.0082	4.08E-06
Legionaminic Acid Biosynthesis	0.0109	0.0005	0.0338	0.003	4.49E-06
Type I Restriction-Modification	0.0679	0.0009	0.1357	0.0086	5.52E-06
DNA repair, UvrABC system	0.4713	0.0018	0.3868	0.012	7.58E-06
mycolic acid synthesis	0.1194	0.0002	0.1675	0.0058	7.61E-06
Hfl operon	0.0555	0.0003	0.0467	0.0008	8.16E-06
ABC transporter dipeptide (TC 3.A.1.5.2)	0.0644	0.0002	0.0246	0.005	9.53E-06
Inositol catabolism	0.1564	0.0038	0.0349	0.0187	1.17E-05
Ribosome activity modulation	0.0334	0.0003	0.0228	0.0017	1.35E-05
HPr kinase and hprK operon in Gram-positive organisms	0.0273	0.0006	0.0499	0.0036	1.41E-05
Glutaredoxins	0.0557	0	0.033	0.0031	1.46E-05
DNA replication, archaeal	0.0556	0.0002	0.0252	0.0043	1.68E-05
Phage regulation of gene expression	0.185	0.0012	0.1175	0.0106	1.70E-05
Benzoate degradation	0.0014	0	0.0002	0.0002	1.73E-05
Copper homeostasis	0.4709	0.0067	0.2927	0.0278	1.83E-05

De Novo Pyrimidine Synthesis	0.4797	0.0022	0.376	0.0171	1.98E-05
Catechol branch of beta-ketoadipate pathway	0.0339	0.0007	0.0036	0.0017	1.99E-05
Zinc resistance	0.0002	0	0	0	2.11E-05
Polysaccharide deacetylases	0.0066	0.0001	0.0017	0.0008	2.18E-05
Resistance to Vancomycin	0.0134	0.0001	0.0022	0.0017	2.27E-05
Menaquinone and Phylloquinone Biosynthesis	0.171	0.0003	0.2304	0.0091	2.57E-05
Phage packaging machinery	0.0274	0.0007	0.1138	0.0136	2.67E-05
Shikimate kinase containing cluster	0.0527	0.0004	0.0395	0.0024	2.74E-05
Nitric oxide synthase	0.0047	0.0007	0.0373	0.0057	2.77E-05
Purine Utilization	0.0926	0.0013	0.0588	0.0061	2.96E-05
LMPTP YwlE cluster	0.2311	0.0002	0.193	0.0061	3.12E-05
CoA-disulfide reductase (EC 1.8.1.14) containing cluster	0.0224	0.0003	0.0768	0.0088	3.31E-05
CBSS-393121.3.peg.2760	0.3306	0.0044	0.2061	0.0232	3.32E-05
COG1836	0.1228	0.002	0.0433	0.0147	3.46E-05
Transcription initiation, bacterial sigma factors	0.1203	0.0013	0.0706	0.0093	3.53E-05
CBSS-101031.3.peg.1876	0.0004	0.0002	0.0078	0.0014	3.76E-05
Fermentations: Lactate	0.1167	0.0024	0.1799	0.012	3.77E-05
Proteorhodopsin	0.0915	0.0003	0.0181	0.0122	3.82E-05
YggW	0.2109	0.0015	0.155	0.0106	3.84E-05
Polyadenylation bacterial	0.1644	0.0016	0.1126	0.01	3.89E-05
Streptococcus agalactiae virulome	0.0135	0.0003	0.0535	0.0069	4.48E-05
CBSS-83332.1.peg.3803	0.0911	0.0017	0.0204	0.0135	4.50E-05
N-Acetyl-Galactosamine and Galactosamine Utilization	0.0598	0.0003	0.0415	0.0034	4.54E-05
Acetoin, butanediol metabolism	0.1854	0.0032	0.3425	0.0296	4.57E-05
Glycine cleavage system	0.2636	0.0035	0.1857	0.0144	5.14E-05
Homogentisate pathway of aromatic compound degradation	0.0256	0.0009	0.0061	0.0037	5.25E-05
Alpha-acetolactate operon	0.024	0.0006	0.0673	0.008	5.39E-05
Periplasmic Stress Response	0.0341	0.0005	0.0487	0.003	5.43E-05
Fructose utilization	0.13	0.0033	0.2707	0.0071	5.43E-05
Experimental - Histidine Degradation	0.2928	0.001	0.151	0.0255	5.47E-05
YeiH	0.0129	0.0005	0.0572	0.0082	5.60E-05
tRNA aminoacylation, Cys	0.0617	0.0004	0.0517	0.002	5.65E-05
Flagellum	0.065	0.0001	0.0433	0.0039	5.77E-05
Niacin-Choline transport and metabolism	0.1617	0.0008	0.2808	0.0217	5.97E-05
Galactose-inducible PTS	0.0484	0.0011	0.084	0.0074	6.02E-05
P uptake (cyanobacteria)	0.3601	0.0038	0.2567	0.0218	6.49E-05

Lactose and Galactose Uptake and Utilization	0.134	0.0035	0.2634	0.0268	6.61E-05
CBSS-176279.3.peg.868	0.0861	0.001	0.0645	0.0043	6.64E-05
Histidine Degradation	0.2021	0.0017	0.0744	0.0247	6.86E-05
MazEF toxin-antitoxing (programmed cell death) system	0.0012	0.0002	0.0111	0.002	6.99E-05
CBSS-316273.3.peg.227	0.0407	0.0009	0.0078	0.0069	7.19E-05
Unspecified monosaccharide transport cluster	0.0935	0.0021	0.1749	0.0172	7.53E-05
CBSS-323097.3.peg.2594	0.0613	0.0003	0.0289	0.0063	7.56E-05
Serine Biosynthesis	0.2178	0.0014	0.1617	0.0118	7.70E-05
CMP-N-acetylneuraminate Biosynthesis	0.012	0.0007	0.0355	0.0051	7.78E-05
CBSS-393133.3.peg.2787	0.0263	0.002	0.0667	0.0082	7.80E-05
Archaeal lipids	0.213	0.0031	0.3448	0.0276	7.86E-05
Polyhydroxybutyrate metabolism	0.1297	0.0025	0.1889	0.0131	8.78E-05
Pterin biosynthesis	0.0279	0.0007	0.0406	0.0023	8.89E-05
CBSS-246196.1.peg.364	0.0627	0.0002	0.1026	0.0078	8.96E-05
Tricarboxylate transport system	0.0019	0.0001	0.0004	0.0003	8.98E-05
Anaerobic benzoate metabolism	0.0428	0.0005	0.0703	0.0058	9.34E-05
COG3760	0.0232	0.0008	0.0063	0.0038	9.68E-05
Bacterial cyanide production and tolerance mechanisms	0.0517	0.0017	0.0115	0.0091	9.84E-05
CBSS-196164.1.peg.461	0.2473	0.0033	0.119	0.0282	9.87E-05
Biotin biosynthesis	0.3931	0.0044	0.2996	0.0208	9.92E-05

Tableau annexe 14: Fonctions différemment distribuées entre les échantillons de l'aisselle droite de l'individu RTH temps 8 et les autres échantillons de l'aisselle (*p-value* $<10^{-6}$).

Level3	RTH AD8: mean rel. freq. (%)	RTH AD8: std. dev. (%)	RTH Autres: mean rel. freq. (%)	RTH Autres: std. dev. (%)	p-values
Propionyl-CoA to Succinyl-CoA Module	0.0676	0.0001	0.0045	0.0007	1.81E-12
ABC transporter peptide (TC 3.A.1.5.5)	0.0021	0	0	0	5.57E-12
KDO2-Lipid A biosynthesis	0.0825	0.0001	0.0024	0.0011	2.30E-11
Putative TldE-TldD proteolytic complex	0.0105	0	0.0002	0.0001	4.24E-11
Siderophore Achromobactin	0.0057	0	0.0003	0.0001	1.56E-10
p-Hydroxybenzoate degradation	0.0072	0	0.0002	0.0001	1.79E-10
Cellulosome	0.0072	0	0.0005	0.0001	1.89E-10
Alkanesulfonate assimilation	0.0754	0.0001	0.005	0.0016	7.50E-10
Experimental-Ubiquinone BiosynthesisVDC	0.1142	0.0004	0.0539	0.002	1.23E-09
At5g38900	0.0129	0	0.0003	0.0003	1.24E-09
Putative sulfate assimilation cluster	0.0048	0	0.0002	0.0002	1.56E-09
HMG CoA Synthesis	0.1084	0	0.0042	0.0023	1.65E-09
Protocatechuate branch of beta-ketoadipate pathway	0.0698	0.0005	0.007	0.0024	3.08E-09
COG3533	0.1672	0.0001	0.0263	0.0036	3.32E-09
Malonate decarboxylase	0.0036	0	0.0001	0.0001	3.88E-09
Bacterial Chemotaxis	0.072	0.0001	0.0036	0.0021	4.39E-09
General Secretion Pathway	0.0223	0.0001	0.0007	0.0003	5.93E-09
CBSS-87626.3.peg.3639	0.1009	0	0.0368	0.0018	5.98E-09
Widespread colonization island	0.0171	0	0.0005	0.0005	7.03E-09
Methionine Biosynthesis	0.6026	0.002	0.805	0.0087	7.71E-09
L-fucose utilization temp	0.0202	0.0001	0.0003	0.0002	1.21E-08
DNA-replication	1.0837	0.0018	1.3473	0.0124	1.33E-08
Biotin biosynthesis	0.429	0.0018	0.2696	0.0074	1.53E-08
Anaerobic respiratory reductases	0.1537	0.0009	0.0696	0.0047	2.89E-08
NiFe hydrogenase maturation	0.0058	0	0.0001	0.0001	3.59E-08
Restriction-Modification System	0.2005	0.0021	0.0368	0.0092	4.08E-08
Inositol catabolism	0.1948	0.0021	0.0202	0.0104	4.19E-08
CBSS-370552.3.peg.1240	0.0041	0.0003	0.031	0.0016	4.56E-08
Selenocysteine metabolism	0.0699	0.0003	0.0054	0.0035	5.57E-08
SigmaB stress responce regulation	0.0184	0.0004	0.0804	0.0011	5.60E-08
Extracellular Polysaccharide Biosynthesis of Streptococci	0.0019	0	0.0002	0.0001	5.90E-08

Acetyl-CoA fermentation to Butyrate	0.4275	0.0003	0.1465	0.0127	5.94E-08
L-rhamnose utilization	0.0879	0.0003	0.0566	0.002	6.75E-08
CBSS-196620.1.peg.2477	0.34	0.0026	0.5719	0.0151	6.84E-08
Type I Restriction-Modification	0.1776	0.0017	0.0327	0.0095	7.15E-08
ABC transporter dipeptide (TC 3.A.1.5.2)	0.0837	0.001	0.0167	0.004	8.44E-08
Heme, hemin uptake and utilization systems in GramPositives	0.0908	0.0007	0.4071	0.0167	1.13E-07
Cell Division Cluster	0.2353	0.0013	0.3504	0.0081	1.18E-07
Respiratory Complex I	0.4153	0.0012	0.1312	0.0169	1.48E-07
UDP-N-acetylmuramate from Fructose-6-phosphate Biosynthesis	0.3218	0.0009	0.4386	0.008	1.61E-07
Erythritol utilization	0.0008	0	0	0	1.62E-07
Homogentisate pathway of aromatic compound degradation	0.0522	0.0005	0.0059	0.0034	1.63E-07
Single-Rhodanese-domain proteins	0.0282	0.0004	0.0761	0.0033	1.73E-07
Maltose and Maltodextrin Utilization	0.3577	0.0037	0.135	0.0159	1.80E-07
Periplasmic disulfide interchange	0.042	0.0001	0.0054	0.0022	2.25E-07
Glycine reductase, sarcosine reductase and betaine reductase	0.1632	0.0008	0.2163	0.0043	2.48E-07
DOE COG2016	0.0995	0.0002	0.1363	0.0024	2.48E-07
Cell envelope-associated LytR-CpsA-Psr transcriptional attenuators	0.0301	0.0009	0.087	0.0046	2.61E-07
Phenol hydroxylase	0.0009	0	0	0	2.80E-07
EC699-706	0.0837	0.0009	0.1503	0.0057	3.52E-07
eukaryotic rRNA modification and related functions	0.0308	0.0002	0.0051	0.0019	3.64E-07
Nucleolar protein complex	0.0308	0.0002	0.0051	0.0019	3.64E-07
Taurine Utilization	0.0131	0.0001	0.0004	0.0003	3.87E-07
Polyhydroxybutyrate metabolism	0.4346	0.0043	0.1769	0.0226	3.98E-07
COG2363	0.3259	0.0013	0.4355	0.0093	4.02E-07
Ferrous iron transporter EfeUOB, low-pH-induced	0.0357	0.0005	0.0799	0.0037	4.29E-07
Sporulation-associated proteins with broader functions	0.0199	0.0003	0.0343	0.0009	4.77E-07
Multi-subunit cation antiporter	0.1313	0.0008	0.3553	0.0163	5.39E-07
Menaquinone and Phylloquinone Biosynthesis	0.1462	0.0021	0.2461	0.0082	5.78E-07
Gram-Positive Extracellular Nucleases	0.0003	0	0	0	5.89E-07
Fructose utilization	0.1361	0.0013	0.2718	0.0117	6.01E-07

Putrescine utilization pathways	0.0253	0.0003	0.0012	0.0007	6.10E-07
Histidine Biosynthesis	0.2549	0.0004	0.0601	0.0142	6.26E-07
CBSS-89187.3.peg.2957	0.0538	0.0001	0.0814	0.002	6.42E-07
Allophanate hydrolase 2 and Biotin carboxylase cluster	0.1293	0.0005	0.2075	0.0064	7.14E-07
Beta-lactamase	0.0369	0.0011	0.1702	0.0114	7.19E-07
Butyrate metabolism cluster	0.2139	0.0019	0.094	0.0117	7.95E-07
CBSS-280355.3.peg.2835	0.1547	0	0.2285	0.0055	7.97E-07
Bacterial cyanide production and tolerance mechanisms	0.0787	0.0009	0.0157	0.0062	9.67E-07
ZZ gjo need homes	0.166	0.0013	0.2826	0.0111	9.97E-07

Tableau annexe 15: Les fonctions différemment distribuées entre les métagénomes DAU PD8 et les autres métagénomes de pieds de l'individu DAU (*p-value* < 10^{-3}).

Level3	DAU PD8: mean rel. freq. (%)	Autres: mean rel. freq. (%)	DAU PD8: std. dev. (%)	Autres: std. dev. (%)	p-values
Nucleoside triphosphate pyrophosphohydrolase MazG	0.0357	0.0386	0.0000	0.0001	7.05E-10
Lipoprotein Biosynthesis	0.0462	0.0432	0.0001	0.0005	1.66E-05
Staphylococcal pathogenicity islands SaPI	0.4318	0.4735	0.0003	0.0073	4.62E-05
ABC transporter alkylphosphonate (TC 3.A.1.9.1)	0.1089	0.1207	0.0006	0.0025	1.01E-04
SecY2-SecA2 Specialized Transport System	0.1753	0.2139	0.0004	0.0080	1.05E-04
p-Aminobenzoyl-Glutamate Utilization	0.0213	0.0265	0.0002	0.0012	1.07E-04
YaaA	0.0060	0.0049	0.0000	0.0002	1.14E-04
CBSS-262719.3.peg.410	0.1883	0.2076	0.0011	0.0038	1.28E-04
Trehalose Uptake and Utilization	0.2781	0.3037	0.0009	0.0062	1.40E-04
Acetoin, butanediol metabolism	0.3490	0.3978	0.0011	0.0113	1.45E-04
Experimental - Histidine Degradation	0.1854	0.2033	0.0002	0.0041	1.80E-04
PFGI-1-like cluster 1	0.0007	0.0002	0.0000	0.0001	1.80E-04
Nudix proteins (nucleoside triphosphate hydrolases)	0.0615	0.0528	0.0000	0.0021	2.87E-04
Scaffold proteins for [4Fe-4S] cluster assembly (MRP family)	0.1311	0.1378	0.0002	0.0018	3.44E-04
ESAT-6 proteins secretion system in Firmicutes	0.0195	0.0146	0.0002	0.0014	3.69E-04
Sphingolipid biosynthesis	0.0032	0.0019	0.0001	0.0004	3.74E-04
CBSS-56780.10.peg.1536	0.0541	0.0485	0.0000	0.0015	4.52E-04

CBSS-316273.3.peg.227	0.0113	0.0096	0.0001	0.0004	4.93E-04
Plasmid replication	0.1056	0.0980	0.0000	0.0022	5.69E-04
ABC transporter dipeptide (TC 3.A.1.5.2)	0.0347	0.0306	0.0002	0.0013	5.70E-04
Ketoisovalerate oxidoreductase	0.0457	0.0553	0.0002	0.0029	5.79E-04
RNA methylation	0.4171	0.4323	0.0011	0.0045	5.98E-04
Mannose Metabolism	0.1285	0.1153	0.0010	0.0032	6.03E-04
Thioredoxin-disulfide reductase	0.2142	0.2271	0.0010	0.0036	6.19E-04
Cinnamic Acid Degradation	0.0038	0.0019	0.0001	0.0006	6.32E-04
Beta-lactamase	0.1166	0.1301	0.0010	0.0040	6.97E-04
At1g14345	0.0672	0.0728	0.0003	0.0018	7.51E-04
Anaerobic Oxidative Degradation of L-Ornithine	0.0001	0.0003	0.0000	0.0001	7.56E-04
Glutamate and Aspartate uptake in Bacteria	0.0668	0.0611	0.0003	0.0019	8.26E-04
YgfZ-Iron	0.1356	0.1260	0.0002	0.0031	8.88E-04
tRNA aminoacylation, Leu	0.0911	0.0850	0.0004	0.0021	9.11E-04
Biphenyl Degradation	0.0038	0.0019	0.0002	0.0006	9.98E-04

Tableau annexe 16: Les fonctions différemment distribuées entre les métagénomes RTHPD8 et les autres métagénomes de pieds de l'individu RTH (*p-value* < 10^{-5}).

Level3	RTH PD8: mean rel. freq. (%)	RTH PD8: std. dev. (%)	Autres: mean rel. freq. (%)	Autres: std. dev. (%)	p-values
EC49-61	0.0496	0.0001	0.0628	0.0008	5.11E-08
Cytolysin and Lipase operon in Vibrio	0.0597	0.0005	0.0235	0.0027	1.52E-07
Restriction-Modification System	0.033	0.0016	0.1772	0.0112	2.48E-07
Group II intron-associated genes	0.0115	0.0002	0.0206	0.0008	4.19E-07
Uptake of selenate and selenite	0.0044	0.0003	0.0205	0.0012	4.24E-07
dTDP-rhamnose synthesis	0.0107	0.0003	0.0376	0.0023	5.82E-07
RNA 3'-terminal phosphate cyclase	0.0019	0.0001	0.0078	0.0006	1.32E-06
Type I Restriction-Modification	0.0277	0.0013	0.1629	0.0131	1.43E-06
Auxin degradation	0.0027	0.0001	0.0103	0.0007	1.48E-06
Rrf2 family transcriptional regulators	0.0294	0.0003	0.0128	0.0007	1.59E-06
Sortase	0.0407	0.0005	0.0182	0.0014	1.83E-06
Steroid sulfates	0.0021	0.0001	0.0123	0.0011	1.86E-06
Fermentations: Mixed acid	0.3349	0.0011	0.257	0.0087	2.23E-06
Arginine and Ornithine Degradation	0.4074	0.0013	0.3548	0.0062	2.36E-06
Fosfomycin resistance	0.013	0.0001	0.0036	0.0011	2.56E-06
Sulfatases and sulfatase modifying factor 1	0.004	0.0001	0.0222	0.0018	2.65E-06
Phage entry and exit	0.0966	0.0004	0.0554	0.0043	2.66E-06
Universal stress protein family	0.0426	0.0004	0.0231	0.0012	2.70E-06
Adhesins in Staphylococcus	0.4849	0.0016	0.2507	0.0246	3.03E-06
Glyoxylate bypass	0.1809	0.0001	0.2353	0.0054	3.21E-06
Lipopolysaccharide-related cluster in Alphaproteobacteria	0.002	0	0.0082	0.0007	3.99E-06
Cyanophycin Metabolism	0.0069	0.0002	0.0303	0.0027	4.08E-06
CBSS-291331.3.peg.3674	0.0009	0.0001	0.0039	0.0004	4.11E-06
Phage introns	0.0076	0.0002	0.0017	0.0007	4.46E-06
CBSS-316273.3.peg.448	0.0006	0	0.0037	0.0004	4.50E-06
Serine-glyoxylate cycle	1.1802	0.0009	1.351	0.0189	4.65E-06
Carbon storage regulator	0.0001	0	0.0005	0	5.21E-06
A Glutathione-dependent Thiol Reductase Associated with a Step in Lysine Biosynthesis	0.0019	0	0.0082	0.0007	5.39E-06
Pyruvate:ferredoxin oxidoreductase	0.0007	0.0001	0.0035	0.0004	5.42E-06
General Secretion Pathway	0.0015	0.0001	0.0084	0.0009	6.22E-06

Cardiolipin synthesis	0.0822	0.0005	0.064	0.0015	7.10E-06
tRNA-methylthiotransferase containing cluster	0.0631	0.0006	0.0816	0.0026	7.90E-06
Formate hydrogenase	0.1171	0.0003	0.1333	0.0023	9.15E-06
KDO2-Lipid A biosynthesis	0.0052	0.0003	0.0232	0.0025	9.41E-06
Carbon monoxide dehydrogenase maturation factors	0.0011	0.0001	0.0059	0.0007	9.47E-06
Murein hydrolase regulation and cell death	0.1962	0.0023	0.1289	0.0096	9.92E-06