Revues générales

Stratégies spécifiques ou communes pour influencer le microbiote cutané

RÉSUMÉ : De nombreux micro-organismes colonisent la surface et l'intérieur de notre peau : il s'agit du microbiote cutané qui constitue une barrière protectrice. Pour tous ces micro-organismes, notre peau est un milieu de culture qui va contre-sélectionner ceux qui sont le plus adaptés à chaque zone anatomique selon le pH, la température, le taux d'humidité et la composition de chaque zone.
Les bactéries cutanées, par exemple, vont pouvoir s'organiser et se réguler entre elles *via* l'excrétion de molécules que nous pouvons reproduire. Elles peuvent aussi s'organiser au sein de biofilms que l'on peut déstabiliser.
Enfin, pour croître, les bactéries ont besoin de quatre composés essentiels : l'eau, une source de carbone, d'azote et des oligoéléments. Dans un avenir proche, il sera possible d'agir sur ces quatre éléments pour favoriser certaines bactéries aux dépens d'autres. Par ailleurs, l'apport de biomasses réalisées à partir de bactéries non pathogènes, stratégie qui a déjà fait ses preuves, permettra de rétablir une homéostasie de cette microflore.
Ces pistes se rapprochent des stratégies développées par l'industrie alimentaire, adaptées à une approche dermato-cosmétique.

S. SEITE[1], R. MARTIN[2]
[1] La Roche-Posay Laboratoire Dermatologique, ASNIÈRES.
[2] Mercurialis Biotech, ROCHECORBON.

Depuis une dizaine d'années, nous avons accès à de nouvelles technologies de séquençage de l'ADN à haut débit. Ces technologies ont révélé un univers insoupçonné chez l'homme : le microbiote humain. Le microbiote désigne l'ensemble du paysage microbien, un recensement de tous les acteurs présents, alors que le microbiome désigne l'ensemble des gènes actifs au sein de ce microbiote. Il est donc indispensable, dans un premier temps, de connaître les acteurs présents puis de déterminer la façon dont cette collectivité fonctionne. Les premiers travaux dans ce domaine ont été réalisés sur le tractus digestif, notamment pour étudier le comportement de probiotiques qui sont des micro-organismes vivants (bactérie ou levure, en particulier ferment lactique) lesquels, ingérés en quantité suffisante, ont un effet bénéfique sur la santé en améliorant l'équilibre de la flore intestinale. Ils sont issus de l'industrie agroalimentaire.

Les résultats concernant la peau ont commencé à s'accumuler notamment depuis la création du *Human Microbiome Project* en 2008 par les *National Institutes of Health* (NIH) aux États-Unis [1]. L'objectif est clairement affiché : étudier le microbiote humain en lien avec la santé. Bien que le microbiote humain soit constitué de bactéries, de levures, de champignons et de virus, l'essentiel des études ont été menées sur le règne bactérien, appelé également règne des protistes procaryotes. Parmi ces quatre acteurs du microbiote humain, les bactéries sont majoritaires. Elles représentent 1,5 kg de bactéries pures pour un individu de 75 kg et représentent entre 1 et 10 fois le nombre de nos propres cellules humaines.

Le microbiote est organisé en une vaste chaîne alimentaire dans laquelle la bactérie est centrale : il faut entre 100 et 1 000 bactéries pour nourrir une levure comme les *Malassezia* ou les *Candida*, et la population virale – les phages (virus spécifiques des bactéries) – dépend directement de la population bactérienne présente – et obligatoirement vivante – qui lui sert de substrat. Actuellement, les articles concernant le microbiome parlent en fait du "bactériote". Les bactéries qui colonisent l'être humain lui apportent une armure invisible sur la peau et le protègent d'invasions d'autres micro-organismes aux intentions peu pacifiques, éduquent son système immunitaire cutané, lui procurent des vitamines et d'autres composés, en contrepartie de quoi, celui-ci les nourrit.

Point technique

Toutes les bactéries, et seules les bactéries, possèdent un ARN ribosomal particulier qualifié de 16S (S pour Svedberg, unité de coefficient de sédimentation [1 Svedberg vaut exactement 10^{-13} secondes] en lien avec la masse molaire). Il existe donc une partie de l'ADN bactérien qui code pour cet ARNr 16S (***fig. 1***). Cet ARNr est divisé en neuf régions variables allant de V1 à V9. Actuellement, nous explorons les régions V1 et V3 pour la peau mais d'autres équipes explorent la région V4 [2]. Chacune de ces régions a été séquencée pour plusieurs milliers de bactéries et sert de référence pour identifier les séquences obtenues dans un échantillon.

Sur un plan pratique, on utilise un coton-tige stérile humecté par une solution physiologique également stérile. On pratique un frottis de quelques secondes sur une surface standardisée de la zone à explorer. Le coton-tige est alors congelé. À la fin de l'étude, l'ensemble des cotons-tiges est décongelé, l'ADN est extrait (gDNA) et amplifié en utilisant un "amplicon" qui va cibler les régions V1-V3 ou V4 de l'ADN codant pour l'ARNr 16S. Suivent alors une quarantaine de cycles d'amplification. Après traitement informatique, les brins d'ADN contenant généralement plus ou moins 400 paires de bases sont séquencés. Les séquences ainsi obtenues sont comparées aux séquences contenues dans les bases de données bactériennes. Chaque séquence lue est appelée un "*read*". Plus il y a de "*reads*" identiques, plus le nombre de la bactérie concernant ce "*read*" est élevé.

Bien que la technique ne soit pas encore strictement quantitative, elle donne une bonne idée du paysage bactérien contenu dans l'échantillon. Dans un simple prélèvement effectué avec un coton-tige stérile, nous arrivons à voir aujourd'hui plus de 8 000 bactéries différentes avec une assez bonne idée de leur répartition en nombre, ou tout du moins de leur équilibre. Deux bactéries appartiennent à des espèces différentes si leurs ARNr 16S partagent moins de

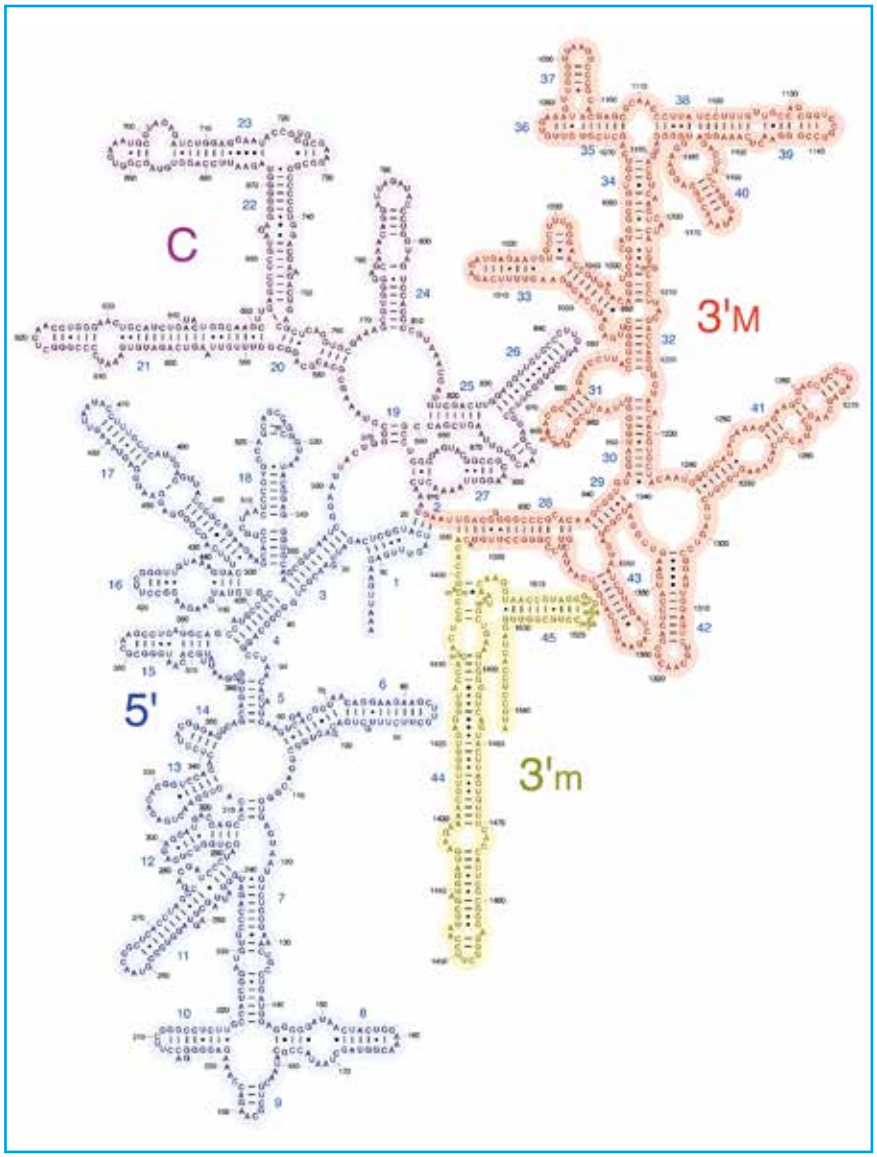


Fig. 1 : Structure secondaire de l'ARN ribosomique 16S d'*Escherichia coli*. Source : http://rna.ucsc.edu/rnacenter/ribosome_images.html

Revues générales

97 % de similitude [3]. Cette définition s'appelle un OTU (Unité taxonomique opérationnelle) dans la classification moléculaire actuelle. Il y a aujourd'hui plus de 100 000 séquences bactériennes de référence dans les bases mondiales. Ces bases, gratuites pour l'essentiel, permettent de comparer les séquences obtenues avec celles qui ont été identifiées.

Les bactéries

Premiers acteurs du vivant, elles sont apparues il y a 3,8 milliards d'années et sont restées les seuls êtres vivants pendant 2 milliards d'années [4]. Elles ont colonisé l'ensemble de la planète et représentent la biomasse la plus importante sur notre terre. Avant l'arrivée de ces nouvelles technologies de séquençage, on ne voyait que les bactéries qui étaient cultivables. On sait aujourd'hui que nous étions aveugles à 99 % même si les bactéries recherchées alors étaient pathogènes. Une bactérie de taille génétique moyenne telle que *Escherichia coli* possède 4 500 gènes. L'homme est constitué de 23 000 gènes. Un cm^2 de peau porte entre 60 et 500 OTUs différents répartis sur un million de bactéries présentes. Si on fait la somme des gènes bactériens présents sur 1 cm^2 de peau, on dépasse donc déjà 3,5 millions de gènes face à nos 23 000 gènes. C'est dire la puissance métabolique portée par ces exo-gènes bactériens ! Par ailleurs et pour rappel, il n'existe aucun endroit sur terre qui ne soit pas colonisé par des bactéries, y compris les organismes vivants.

Les relations bactérie/bactérie et bactéries/homme

La peau est un organe ouvert sur l'extérieur contrairement au tube digestif. La première conséquence est qu'il y a conflit de territoire entre les bactéries entre elles, d'une part, et compétition concernant la nourriture, d'autre part. Le tube digestif est plus proche d'un fermenteur alimenté par une diète très riche pour les bactéries présentes.

Pour s'adapter à leur environnement, les bactéries communiquent entre elles par l'intermédiaire de deux types de molécules : des homosérines lactones pour les bactéries à Gram négatif et des petits peptides pour les bactéries à Gram positif. Il existe donc un véritable langage, une sorte d'espéranto bactérien, que nous sommes en train de décrypter. Si on ajoute ces molécules à des colonies bactériennes, ou si elles les produisent d'elles-mêmes, les réponses des bactéries concernées sont immédiates : on parle de "*quorum sensing*" ou détection du quorum. Il est possible, par exemple, d'allumer ou d'éteindre instantanément des cultures bactériennes de *Vibrio fischeri* responsables de la luminescence de céphalopodes la nuit [5]. Ces bactéries permettent à l'hôte d'attirer les poissons la nuit grâce à la lumière émise, en retour elles peuvent se nourrir et se multiplier dans le chapeau de ceux-ci. La concentration efficace de ces molécules est extrêmement réduite : on parle de picomoles.

Il en est de même pour la pathogénicité bactérienne. Lorsque les bactéries potentiellement pathogènes sont présentes en faible quantité, elles n'expriment pas de pathogénicité. Ce faisant, elles passent inaperçues dans notre organisme. Lorsque le nombre de ces bactéries devient important, alors elles passent à l'attaque simultanément et peuvent arriver à vaincre des organismes beaucoup plus gros et complexes qu'elles. Les bactéries ont développé des stratégies collectives pour se défendre, résister ou attaquer.

Nous avons la possibilité d'interférer sur la communication bactérienne avec des composés chimiques simples maîtrisant l'espéranto bactérien.

Les bactéries qui vivent sur notre peau s'organisent à la façon d'un village avec une répartition des tâches afin que la collectivité soit solide. Avec la découverte de l'opéron lactose, J. Monod a développé la notion de gènes inductibles. Ce faisant, il a montré que, chez un simple *Escherichia coli* contenant 4 500 gènes, certains gènes étaient toujours opérationnels (on les a appelés constitutifs) alors que d'autres étaient modulables (on les a appelés inductibles) comme l'opéron lactose. Dans ce contexte, une bactérie n'exprimerait que 50 % de ses gènes. Sa plasticité génétique lui permet alors de s'adapter aux changements du biotope sur et dans lequel elle vit.

Pour que la collectivité soit protégée, les bactéries élaborent des biofilms en utilisant le "*quorum sensing*" précédemment décrit. Ces biofilms sont de nature hétéro-polysaccharidique résultant de la collaboration de l'ensemble des bactéries présentes. Ils protègent la collectivité bactérienne en même temps qu'ils captent l'eau et qu'ils hydratent notre peau. Si la collectivité bactérienne ainsi protégée pose des problèmes en termes de pathogénicité, perturber le biofilm est une stratégie qui permet de détruire le collectif solidement établi. On comprend ici que les biofilms stabilisent les collectifs bactériens. Ainsi, ils limitent fortement toute agression par des bactéries ne faisant pas partie dudit collectif. Il semble donc difficile, *a priori*, de changer durablement le microbiote cutané par un apport exogène de bactéries. Enfin, les bactéries peuvent se faire la guerre et/ou se détruire en utilisant des missiles spécifiques contre des envahisseurs ou des compétiteurs : ce sont les bactériocines. Ces peptides sont très sélectifs, ils percent des trous dans les enveloppes cellulaires des indésirables qu'ils tuent.

Les micro-organismes qui vivent sur et grâce à notre épiderme en sont donc dépendants. À l'image des odeurs corporelles qui sont des signatures uniques pour chaque individu, les collectifs bactériens cutanés sont uniques pour chacun d'entre nous. En fait, du point de vue bactérien, notre peau n'est qu'un

milieu de culture qui peut être humide, gras, sec ou autre [6]. Ce qui détermine la nature de notre peau est à 50 % notre génétique, puis notre alimentation, notre style de vie, et enfin notre environnement incluant le climat de l'endroit où nous vivons. Pour les bactéries, chacun de nous est donc une planète originale, présentant diverses régions : arides, forêts tropicales, gisements de pétrole, etc. (***fig. 2***). Chacun de nous contre-sélectionne les bactéries qui lui sont adaptées. Nous leur proposons des conditions de vie particulières selon le pH, la température, la quantité d'eau disponible (humidité) et/ou le type et la quantité de nourriture.

Chaque bactérie ayant son *preferendum* thermique, de pH, de besoin en eau ainsi que sa propre diète, on comprend mieux leur fidélité une fois qu'elles nous ont colonisés. Nous les nourrissons essentiellement par nos squames et notre sueur. En retour, elles nous fournissent des vitamines comme la vitamine B12 (exemple de genres bactériens trouvés sur la peau et produisant de la vitamine B12 : *Alcaligenes, Bacillus, Clostridium, Corynebacterium, Flavobacterium, Propionibacterium, Pseudomonas, Streptomyces, Streptococcus et Xanthomonas*), nous protègent des bactéries de l'environnement, éduquent notre système immunitaire et nous aident à maintenir notre hydratation cutanée.

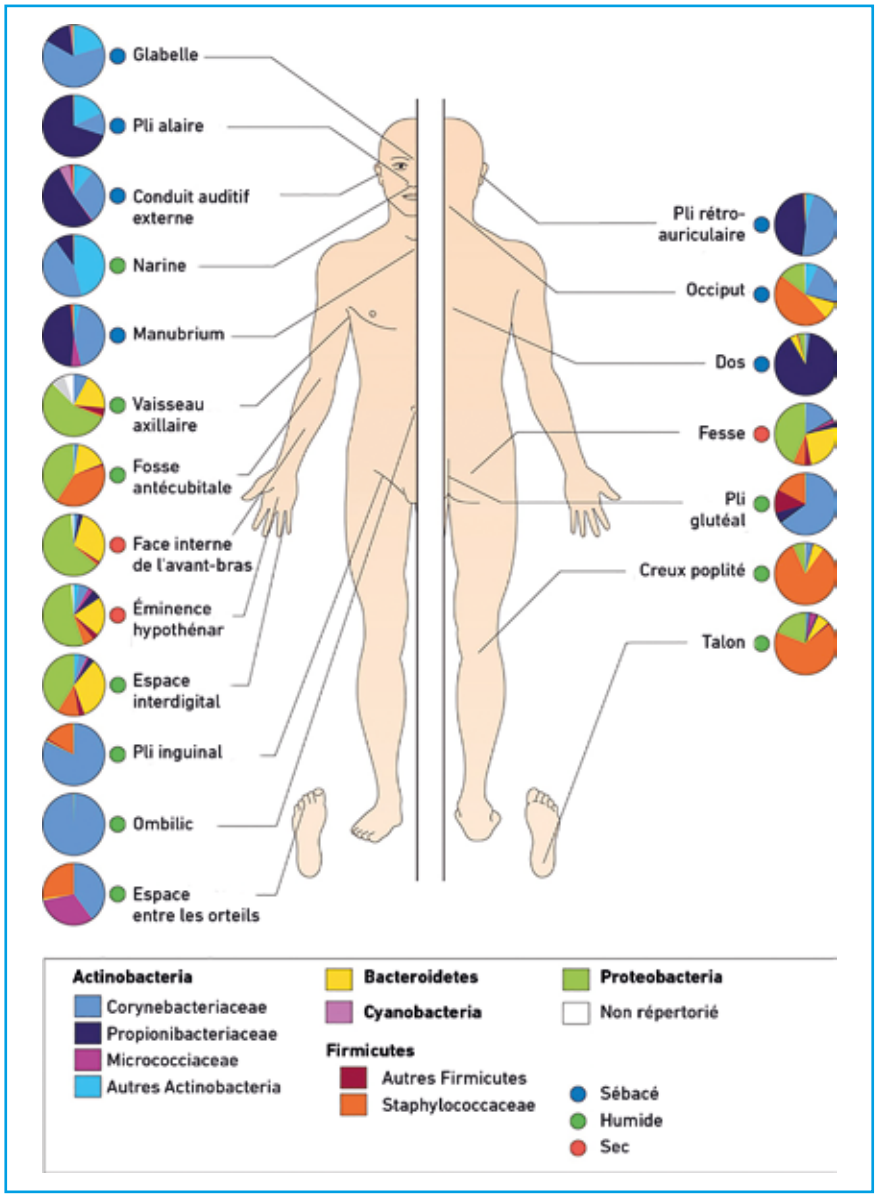


Fig. 2 : D'après [6].

Concernant notre système immunitaire, la présence des bactéries sur et dans notre peau révèle, dès notre naissance, les bactéries "amies" et évite l'emballement de notre système immunitaire face aux bactéries normales de notre peau. Les bactéries éduquent notre système immunitaire par l'intermédiaire des lipopolysaccharides (LPS) des bactéries à Gram négatif, des acides lipotéichoïques (LTA) des bactéries à Gram positif et pour les bactéries mobiles *via* leur flagelline (FL). Les LPS se lient aux récepteurs TLR4, les LTA aux récepteurs TLR3 et les FL aux récepteurs TLR5. Un excès de l'un de ces composés conduira à la synthèse par la peau de peptides antimicrobiens (ou PAMs), appelés aussi β-défensines, qui vont réguler la densité bactérienne cutanée. Ils constituent une méthode de régulation des naissances spécifique à chaque groupe bactérien. Il est à noter que la structure des PAMs est très proche voire superposable à celle des bactériocines citées plus haut. Il est donc possible de leurrer ce système de vigilance lorsqu'il sommeille par un apport exogène de bactéries de l'environnement judicieusement choisies ou de molécules imitant leurs PAMs. C'est ce qui a été réalisé avec succès avec une biomasse de la bactérie *Vitreoscilla filiformis* dans le domaine de la dermatite atopique [7].

Il existe une autre voie complexe pour modifier le microbiote cutané : modifier la peau pour modifier le milieu de

Revues générales

culture. Les bactéries ont besoin de quatre composés essentiels pour pousser : de l'eau, une source de carbone, une source d'azote et des oligoéléments. L'eau est de loin le facteur le plus important. La quantité d'eau disponible détermine à la fois la viabilité et la fonctionnalité des systèmes vivants, et prédit la croissance des micro-organismes, car ceux-ci ne peuvent utiliser que l'eau "libre" (mesurée *via* le paramètre Aw, mesure de l'activité de l'eau), dont la quantité diffère considérablement selon les différents micro-environnements de la peau humaine (zones humides, sébacées ou sèches) [8].

Les *Staphylococcus epidermidis* poussent jusqu'à un Aw de 0,86 alors que les *Staphylococcus aureus* arrivent à pousser à des Aw de 0,83. Donc, sur une peau sèche, les *S. aureus* auront un avantage compétitif par rapport aux *S. epidermidis* dans la zone comprise entre un Aw de 0,86 et un Aw de 0,83. En hydratant la peau, on redonne un avantage à certaines bactéries comme *S. epidermidis* face aux *S. aureus* [8]. Le glycérol et l'urée utilisés comme hydratants peuvent avoir le même effet. On peut également promouvoir des bactéries favorables à une amélioration de la peau par ajout de sucres sélectifs tels que le mannose qui peut stimuler les bactéries appartenant à la famille des *Xanthomonadaceae* [9]. Ce sucre particulier est préférentiellement assimilé par cette famille bactérienne par rapport aux autres grandes familles.

La famille des *Xanthomonadaceae* est kératolytique et va donc permettre une meilleure desquamation des peaux sèches, voire atopiques [10]. Enfin, les oligoéléments sont indispensables comme cofacteurs de certaines enzymes bactériennes. Il est important de rappeler que certaines eaux thermales, en raison de leur richesse en oligoéléments spécifiques, peuvent participer à la croissance des espèces bactériennes, en particulier si ces bactéries se trouvent déjà dans leur contenu microbien naturel [11].

POINTS **FORTS**

- Au niveau de l'écologie cutanée, la signature bactérienne dépend de plusieurs facteurs impactant la qualité de la peau (pH, température, taux d'humidité, etc.)
- L'homéostasie bactérienne passe par la diversité bactérienne.
- Les prébiotiques, en tant que composés pouvant stimuler la croissance et/ou l'activité bactérienne, sont la clé principale pour modifier durablement le microbiote cutané.
- Les compositions minérales et bactériennes uniques des eaux thermales expliquent pour une grande part l'efficacité thérapeutique des cures *via* leur impact sur le microbiote.
- Plusieurs stratégies sont aujourd'hui possibles pour modifier un paysage bactérien déséquilibré : la communication bactérienne, l'ajout de biomasses bactériennes, la modification de la qualité de la peau.

L'eau thermale de La Roche-Posay, par exemple, qui contient de nombreux oligoéléments dont le sélénium et le strontium, peut induire une augmentation de la diversité bactérienne au cours d'une cure thermale chez des patients atteints de dermatite atopique ou de psoriasis en lien avec une amélioration de ces pathologies [11, 12]. Tous ces éléments (eau, oligoéléments, sources de carbone ou d'azote, biomasse…) peuvent être considérés comme des ingrédients "prébiotiques" puisqu'ils peuvent stimuler ou inhiber la croissance bactérienne et/ou être décomposés par des bactéries.

Une peau saine est une peau qui possède une diversité bactérienne élevée, laquelle est un gage de stabilité, à l'image d'une jachère fleurie opposable à un champ de colza très facile à contaminer.

Conclusion

De nouvelles technologies ont permis de découvrir un monde que nous ignorions et qui nous est indispensable pour vivre : le microbiote humain. La description et la compréhension du fonctionnement du microbiote cutané nous permettent d'envisager des traitements "biocosmétiques" de la peau et une utilisation plus réduite de l'antibiothérapie dans les années à venir, simplement en rééquilibrant les populations bactériennes présentes ou en brouillant leur communication pour perturber leur cohésion.

L'ajout de composés sur la peau, tel que le pratiquent la cosmétique et la dermatologie depuis des siècles, modifie *de facto* le paysage bactérien en changeant la diète et les conditions de vie de ces dernières. Ainsi, l'eau, les oligoéléments, les sucres et les sources azotées impactent directement l'équilibre bactérien de notre peau. Il en est de même des bactéries de l'environnement qui font réagir nos défenses cutanées. Cette dernière possibilité constitue une stratégie générale d'action. L'application d'une biomasse, une bactérie tuée, venant de l'environnement qui va permettre à chaque peau de réagir afin de corriger certains déséquilibres bactériens en est un exemple. Des voies plus spécifiques sont également en train d'apparaître comme l'utilisation de

sucres ou d'oligoéléments particuliers, voire de composés pouvant perturber la communication bactérienne pour fragiliser la cohésion des biofilms.

L'intérêt et l'efficacité de ces voies d'action pourront être évalués en temps réel grâce à de nouvelles technologies de description du microbiote cutané en cours de développement utilisant soit des nanopores (MinION – Nanopore Technologies), soit des kits de mesure (µBiome, États-Unis). Cela nécessite au préalable la définition de marqueurs pertinents et sensibles qui pourront être mesurés rapidement et que nous pourrons éventuellement corriger en utilisant les stratégies décrites ci-avant.

Notre peau et notre microflore sont à l'image de la terre et des plantes que l'on souhaite cultiver : si l'on ne pratique pas certaines corrections, des amendements, les plantes souhaitées ne pousseront pas et les mauvaises herbes s'installeront, d'où la nécessité de "cultiver notre jardin" et celui de notre microflore cutanée n'y échappe pas.

BIBLIOGRAPHIE

1. http://hmpdacc.org
2. Claesson MJ, Wang Q, O'Sullivan O *et al.* Comparison of two next-generation sequencing technologies for resolving highly complex microbiota composition using tandem variable 16S rRNA gene regions. *Nucleic Acids Res*, 2010; 38:e200.
3. Stackebrandt E, Goebel BM. Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int J Syst Bacteriol*, 1994;44:846-849.
4. http://www.nature.com/nature/journal/vaop/ncurrent/full/nature19355.html
5. Bassler BL. How bacteria talk to each other: regulation of gene expression by quorum sensing. *Curr Opin Microbiol*, 1999;2:582-587.
6. Grice EA, Segre JA. The skin microbiome. *Nat Rev Microbiol*, 2011;9:244-253.
7. Volz T, Skabytska Y, Guenova E *et al.* Nonpathogenic bacteria alleviating atopic dermatitis inflammation induce IL-10-producing dendritic cells and regulatory Tr1 cells. *J Invest Dermatol*, 2014;134:96-104.
8. Stevenson A, Cray JA, Williams JP *et al.* Is there a common water-activity limit for the three domains of life? *ISME J*, 2015;9:1333-1335.
9. Martin R, Hilaire P. Inventors. Preparation of cosmetic active principles by culturing vitreoscilla on thermal water and compositions comprising them. 2006.
10. De Toni CH, Richter MF, Chagas JR *et al.* Purification and characterization of an alkaline serine endopeptidase from a feather-degrading Xanthomonas maltophilia strain. *Can J Microbiol*, 2002;48:342-348.
11. Martin R, Henley JB, Sarrazin P *et al.* Skin microbiome in patients with psoriasis before and after balneotherapy at the Thermal Care Center of La Roche-Posay. *J Drugs Dermatol*, 2015;14: 1400-1405.
12. Seite S, Flores GE, Henley JB *et al.* Microbiome of affected and unaffected skin of patients with atopic dermatitis before and after emollient treatment. *J Drugs Dermatol*, 2014;13:1365-1372.

S. Seite et R. Martin sont employés par L'Oréal, mais n'ont aucun intérêt financier dans la société.

LA ROCHE-POSAY
LABORATOIRE DERMATOLOGIQUE

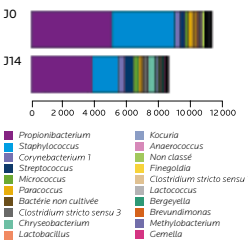
LIPIKAR AP+

Peaux sèches, prurigineuses ou à tendance atopique

HYGIÈNE

Diminue le genre staphylococcus dès la douche.

Zones lésées

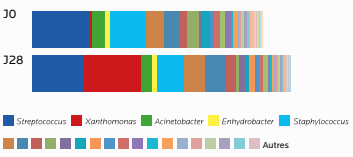


PROTOCOLE :
> 32 patients, 9 hommes et 23 femmes âgés de 18 à 61 ans.
> Durée de la dermatite atopique : de 6 mois à 47 ans, SCORAD moyen : 30
> LIPIKAR SYNDET AP+ : 1/jour, pendant 14 jours en monothérapie (sans aucun traitement ou émollient)
> Prélèvements de microbiome à J0 et J14

SOIN

Rééquilibre le microbiome pour espacer les crises.

Zones lésées



PROTOCOLE
> 60 patients atopiques
> De J0 à J28 : 2 applications/ jour de LIPIKAR BAUME AP+
> Analyse du microbiome cutané