

Comprendre le mode d'action des cosmétiques ou des médicaments sur la peau et son microbiote avec les techniques omiques.

La peau est désormais composée d'une partie humaine et d'une partie microbienne qui est la partie la plus variable. Jusqu'à présent, de nombreuses informations descriptives ont pu être obtenues sur la diversité, la richesse et les niveaux taxonomiques des microbiotes. Les essais cliniques peuvent montrer des effets qui ont été documentés par ces niveaux descriptifs, mais peu d'explications des effets sont clairement décrites.

Quoi qu'il en soit, il devient essentiel de comprendre les mécanismes d'action et l'interaction de la partie humaine avec la partie microbienne pour être en mesure de maîtriser l'innocuité et l'efficacité sur la peau des médicaments et des cosmétiques.

Ceci est possible avec les techniques omiques, qui ont toutefois des capacités et des performances différentes pour répondre à ces questions.

Par ailleurs, il est maintenant clair avec la science du microbiome que les interactions telles que l'axe peau-intestin sont d'une importance primordiale, ce qui signifie que toute connaissance des microbiotes peut être bénéfique pour la compréhension du microbiote cutané.

Paysage technologique

La PCR a été découverte vers 1985 et a permis de détecter spécifiquement les brins d'ADN. Depuis les années 1990, les techniques de séquençage de l'ADN ont ouvert la porte à des approches non ciblées des gènes. Désormais, le séquençage à haut débit permet le séquençage d'un génome à faible coût.

Depuis 1945, la spectrométrie de masse (MS) a permis la détection de petites molécules chimiques. Depuis 15 ans maintenant, l'évolution de la spectrométrie de masse permet d'analyser et de quantifier les protéines. L'approche protéogénomique à travers la connaissance des gènes et avec les évolutions de la LC-MS/MS (spectrométrie de masse en tandem) et des bases de données, permet d'identifier et de quantifier les protéines de manière non ciblée. Les améliorations de la précision de masse, de la résolution et de la sensibilité des instruments MS permettent la détection, l'identification et la quantification rapides et fiables des protéines dans des mélanges complexes. Ces techniques ouvrent la porte à des méthodes améliorées pour découvrir des biomarqueurs spécifiques à une maladie ayant le potentiel de soutenir la détection précoce de la maladie et même de générer des thérapies individualisées.

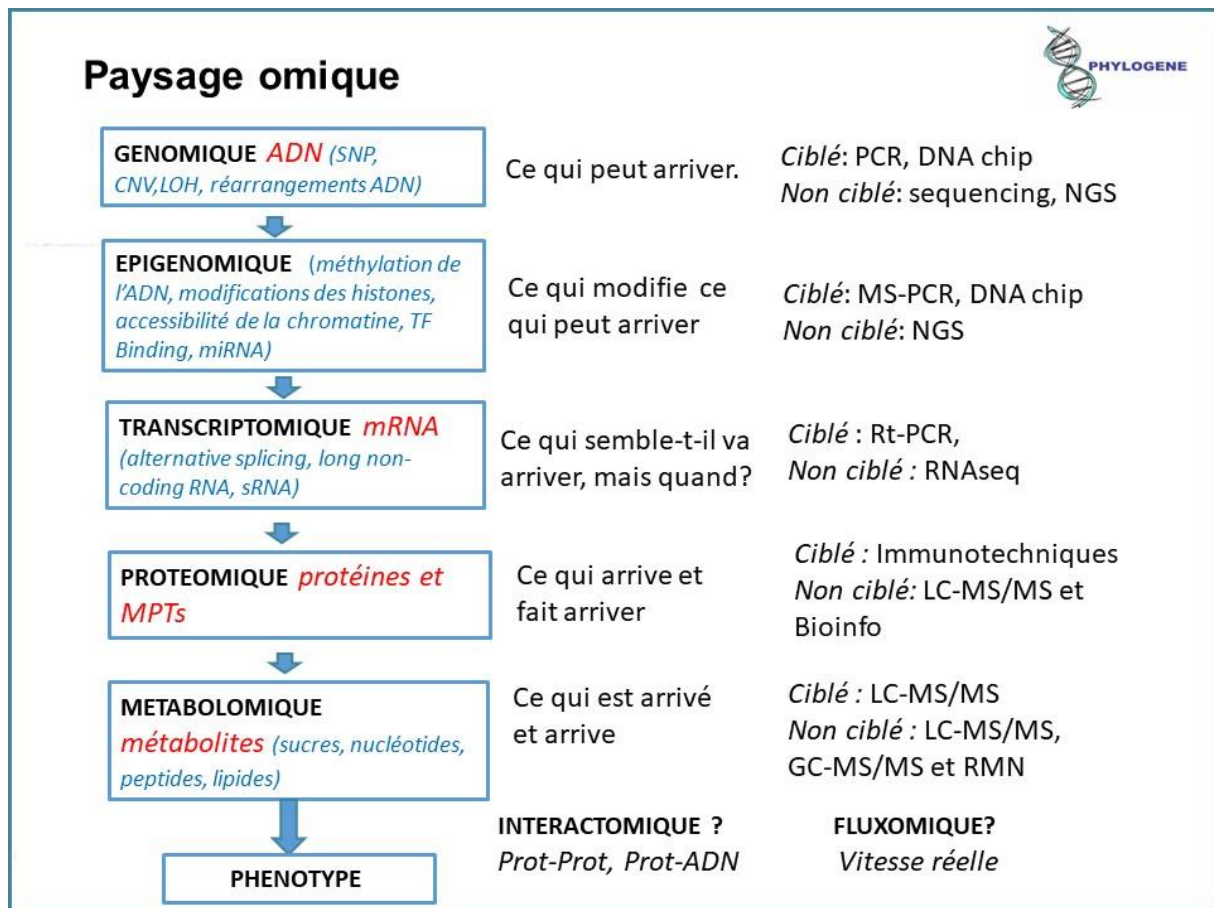


Fig1: Les techniques sont opérationnelles à différentes étapes de la biologie des systèmes et fournissent différents niveaux d'informations qui sont spécifiquement ciblées sur les analytes ou attribuent un signal à un analyte via des bases de données.

De manière non ciblée (shotgun NGS) et quantitativement, un gène donne l'information que la protéine traduite peut structurer la cellule ou travailler dans la cellule, mais on sait maintenant que les mécanismes épigénétiques peuvent interférer ou inactiver le gène. La génomique reste au niveau informationnel. (Fig. 1)

Le transcrit (ARNm), RNAseq au niveau quantitatif, nous dit qu'une protéine peut être traduite mais si et quand reste une question ouverte.

Seule la protéomique LC-MS/MS nous indique quelle protéine est présente.

Bien entendu à ce jour, aucune technique n'est capable de nous dire de manière non ciblée si la protéine est active et à quelle vitesse elle produit des métabolites, même si les modifications post-traductionnelles (PTM) peuvent désormais être atteintes par spectrométrie de masse (1). De plus, aucune technique non ciblée n'est capable de savoir quelle protéine interagit avec quelle autre molécule.

Les métabolites sont produits par des protéines et peuvent être métabolisés par d'autres protéines. Les métabolites peuvent être suivis en utilisant LC pour la partie liquide, GC pour la partie volatile couplée avec MS/MS ou RMN mais cela fonctionne plutôt de manière ciblée car les bases de données sont jusqu'à présent pauvres (2, 3). Bien sûr, il n'y a pas de correspondance structurelle entre le gène et le métabolite comme il y en a entre le gène et la protéine.

Le séquençage “shotgun” permet de retrouver tous les gènes connus dans un échantillon; des gènes qui représentent environ 2% de l'ADN, le reste étant le «junk DNA» mais qui est aujourd'hui reconnu comme étant de première importance. En partant de bases de données de séquences de gènes, la protéomique LC-MS/MS peut facilement identifier le protéome fonctionnel et peut également atteindre les protéines de signalisation, en utilisant le pré-fractionnement de l'échantillon. La protéomique possède également le «dark proteome» qui représente environ la moitié des spectres LC-MS/MS et correspond à des régions protéiques désordonnées mais qui semble être essentiel pour les régions désordonnées de l'activité protéomique. Jusqu'à présent, la métabolomique reste limitée en mode non ciblé car seuls 10% des spectres obtenus en spectrométrie de masse peuvent être identifiés (2).

La métaprotéomique quantitative non ciblée LC-MS/MS pour étudier simultanément les parties humaine et microbiennes.

La protéomique signifie l'étude des protéines exprimées dans une cellule, un tissu, un organe ou un organisme à un moment donné et dans des conditions déterminées. Le protéome est l'ensemble complet de ces protéines. La métaprotéomique fait référence à toutes les protéines de l'écosystème, principalement l'hôte et ses microbiotes, appelés holobionte.

Un instrument LC-MS/MS analyse en continu les fractions peptidiques obtenues par HPLC (chromatographie haute pression) après digestion enzymatique d'un extrait protéique. Le spectromètre de masse effectue chaque seconde un spectre MS suivi d'un fractionnement MS/MS supplémentaire sur les composants les plus intenses. Ces informations générées sur les différents segments de protéines sont comparées aux cartes de masse et aux spectres disponibles dans les bases de données et permettent d'identifier les protéines présentes dans les échantillons. Cette identification est faite en utilisant une approche protéogénomique (4) qui donne la correspondance entre les gènes et les protéines. Les rapports de surface des pics peptidiques donnent une quantification relative.

La protéomique quantitative ou métaprotéomique relative fait référence à l'analyse de deux ou plusieurs groupes d'échantillons en comparant globalement et quantitativement leurs protéomes. La spectrométrie de masse a la capacité unique de mesurer les changements dans des mélanges de protéines complexes.

Comme l'identification est un processus sans cibler des analytes particuliers, il s'agit d'une approche sans hypothèse préalable.

Les “workflows” analytiques sont désormais simples et linéaires, en première intention sans besoin de pré-fractionnement 1D ni 2D pour atteindre 5000 protéines dans un échantillon. Une différence importante de la métaprotéomique par rapport à la protéomique réside dans la taille des bases de données d'identification. Le côté humain contient 23000 gènes, mais du côté microbien, au moins 1000 gènes par espèce microbienne sont renseignés. Les temps d'interrogation des bases de données sont bien plus longs.

Bioinformatique associée

Les données de sortie LC-MS/MS de protéomique atteignent actuellement facilement plus de 5000 protéines identifiées. Plus de 10000 protéines peuvent être facilement atteintes en métaprotéomique. La quantification relative de deux conditions révèle des dizaines à des centaines de protéines sous ou surexprimées. Cela nécessite de lourds pipelines de traitement de données (5) qui analyseront toutes les protéines impactées en correspondance avec les voies métaboliques dans

lesquelles elles sont impliquées. Il est ainsi possible de comprendre les événements biologiques induits par la maladie ou la dysbiose, ou un traitement.

Habituellement, une analyse taxonomique, une analyse fonctionnelle par taxon (Homo sapiens, Fungi, Bacteria et Archae) et des corrélations inter-fonctions peuvent être produites qui donnent accès à des liens entre les voies de signalisation / métaboliques, une association potentielle de fonctions à des taxons particuliers, des potentielles relations interspécifiques entre micro-organismes et entre micro-organismes et humains (6). En synthèse, le mécanisme d'action potentiel peut être formulé (7).

Comprendre les effets sur hôte et microbiote

Les études de métagénomique initiées avec les projets Human Microbiome ou MetaHit ont apporté d'énormes connaissances sur la variabilité individuelle des microbiotes, l'importance de la diversité et la quantité du microbiome intestinal au niveau taxonomique, et la relation entre l'état taxonomique d'un microbiote et les maladies. Quoiqu'il en soit, il reste un énorme écart pour comprendre le fonctionnement de l'holobionte comme les relations entre le microbiote et l'hôte, l'impact d'un régime, d'un probiotique ou d'une maladie. Le taxon, le genre et l'espèce touchés par toute dysbiose et les 2 millions de gènes identifiés dans le microbiome intestinal ne disent pas grand-chose sur ce qui se passe réellement.

Déjà en 2012, le Human Microbiome Project (8) mentionnait que la variabilité au niveau des taxons n'était pas liée à la stabilité relative des fonctions au niveau génomique.

Des études métagénomiques ont montré que les microbiotes intestinaux partagent un ensemble stable de fonctions essentielles, malgré une grande variabilité structurelle/compositionnelle entre individus. Cependant, comme les gènes séquencés ne sont pas nécessairement exprimés, la métagénomique ne peut pas fournir d'informations fiables sur les traits fonctionnels microbiens qui changent réellement en réponse aux stimuli du métabolisme de l'hôte, de l'immunité, de la neurobiologie, du régime alimentaire ou d'autres facteurs environnementaux qui induisent un changement de substrat. (7)

Mais ce type d'information peut être obtenu par la métaprotéomique fonctionnelle, qui affiche une plus grande sensibilité aux perturbations et peut donc mieux refléter les interactions hôte-microbiome (9) et les mécanismes d'action (10). De cette façon, plusieurs corrélations ont été identifiées entre les protéines humaines et bactériennes (11) car les protéines humaines et microbiennes sont suivies simultanément.

En utilisant cette approche sur des échantillons de selles, il est même possible de relier fonctionnellement des protéines humaines à des vésicules extracellulaires bactériennes et d'identifier les peptides d'intérêt reflétant des changements taxonomiques et/ou de voie métabolique, ce qui permet de plus une découverte de nouveaux biomarqueurs (12).

Dans la maladie de Crohn, la métaprotéomique et la bioinformatique dédiée ont été utilisées pour suivre un patient en 4,5 ans (6) ou une cohorte de patients après chirurgie de résection pendant 1 an (13). Presque toutes les fonctions observées chez tous les individus ont été observées dans plusieurs phyla, ces fonctions ne sont spécifiques à aucun phylum, genre ou espèce. Il existe une nette persistance des fonctions métaboliques conservées dans le temps et les individus. Le métabolisme du microbiome intestinal ne semble pas guidé par un ensemble de voies linéaires, mais par un réseau de

réactions interconnectées facilitées par un réseau d'enzymes qui connectent plusieurs molécules à travers de multiples voies (13).

Pour le microbiote cutané, ce type d'approche a été reconnu comme le moyen raisonnable d'élucider davantage ses vastes subtilités. (14) (15)

De plus, les avantages énormes lors de l'étude du microbiome cutané sont la surface et la symétrie. Cela permet de comparer un côté où un cosmétique est appliqué à l'autre côté où un placebo est appliqué. En outre, la surface permet d'utiliser l'écouvillonnage comme méthode efficace de prélèvement d'échantillons.

Le microbiome est terriblement personnel et reste sensible aux variations de l'environnement. S'il est nécessaire de comparer un jour 0 à un jour X, alors l'effet du produit peut être d'abord validé si aucun changement ne se produit d'abord du côté du placebo.

Conclusion

Même si les approches multi-omiques peuvent renforcer l'information, grâce au raccourci protéogénomique, la métaprotéomique et la bioinformatique dédiée semblent l'approche la plus rationnelle et pragmatique pour découvrir et comprendre la peau au niveau fonctionnel.

Ces connaissances permettront de concevoir des produits sûrs et efficaces tels que des prébiotiques, des probiotiques, des postbiotiques, des synbiotiques ou des cosmétiques classiques pour une peau saine.

(1)Olsen JV and all. Status of large-scale analysis of post-translational modifications by mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics*. 2013 Dec;12(12):3444-52

(2)Frankel AE and all. Metagenomic Shotgun Sequencing and Unbiased Metabolomic Profiling Identify Specific Human Gut Microbiota and Metabolites Associated with Immune Checkpoint Therapy Efficacy in Melanoma Patients. *Neoplasia*. 2017 Oct;19(10):848-855

(3)Hamzeiy H and all. What computational non-targeted mass spectrometry-based metabolomics can gain from shotgun proteomics. *Curr Opin Biotechnol*. 2017 Feb;43:141-146

(4)Low TY and all. Connecting Proteomics to Next-Generation Sequencing: Proteogenomics and Its Current Applications in Biology. *Proteomics*. 2018 Nov 15:e1800235.

(5)Hameury S and all. Prediction of skin anti-aging clinical benefits of an association of ingredients from marine and maritime origins: Ex vivo evaluation using a label-free quantitative proteomic and customized data processing approach. *J Cosmet Dermatol*. 2019 Feb;18(1):355-370

(6)Mills R and all. Evaluating Metagenomic Prediction of the Metaproteome in a 4.5-Year Study of a Patient with Crohn's Disease. *mSystems* 2019 Jan-Feb 4(1): e00337-18

(7)Starr A. and all. Proteomic and metaproteomic approaches to understand host-microbe interactions. *Anal Chem*. 2018 Jan 2;90(1):86-109.

(8)The Human Microbiome Project Consortium. Structure, Function and Diversity of the Healthy Human Microbiome. *Nature*. 2012 Jun 14; 486(7402): 207–214

(9)Tanca A ad all. Potential and active functions in the gut microbiota of a healthy human cohort. *Microbiome* (2017) 5:79

(10)Zybailov B. and all. Metaproteomics reveals potential mechanisms by which dietary resistant starch supplementation attenuates chronic kidney disease progression in rats. *PLoS One*. 2019 Jan 30;14(1):e0199274.

- (11)Kolmeder CA and all. Faecal Metaproteomic Analysis Reveals a Personalized and Stable Functional Microbiome and Limited Effects of a Probiotic Intervention in Adults. PLoS One. 2016 Apr 12;11(4)
- (12)Zhang X. Deep Metaproteomics Approach for the Study of Human Microbiomes. Anal. Chem. 2017, 89, 9407–9415
- (13)Blakeley-Ruiz J. Metaproteomics reveals persistent and phylum-redundant metabolic functional stability in adult human gut microbiomes of Crohn’s remission patients despite temporal variations in microbial taxa, genomes, and proteomes. Microbiome 2019, 7:18
- (14)Van der Post S. Metaproteomics Analysis of Host-Microbiota Interfaces. Methods Mol Biol. 2021; 2259:167-179
- (15)He J. Application of omics technologies in dermatological research and skin management. J Cosmet Dermatol. 2021 Mar 24