

Protocole de recherche

Titre de l'étude : Étude explorant les corrélations entre la composition du microbiome cutané et différents modes de vie pendant la pandémie de la COVID-19, auprès de participants européens



I/ Information administrative	4
Recherche	4
Promoteur	4
Investigateur et coordinateur principal Investigateur principal	5
Co-investigateur 1	5
Co-investigateur 2	6
Co-investigateur 3	6
II/ Contexte de la recherche	7
III/ Objectifs et critères de jugement	10
Objectif principal de la recherche et critères de jugement principaux	11
Objectif principal	11
Contexte et pertinence de la recherche	12
Critères de jugement	15
Objectifs secondaires de la recherche et critères de jugement principaux	16
Objectif secondaire 1 (OS1)	16
Contexte	17
Critère de jugement	17
Objectif secondaire n°2 (OS2)	18
Contexte	18
Critères de jugement	19
IV/ Organisation de l'étude	20
Description synthétique du schéma d'étude	20
Méthodologie (protocole d'échantillonnage + questionnaire + séquençage)	25
Trame de l'analyse statistique	30
V/ Informations relatives à la mise en œuvre de la recherche	31

I/ Information administrative

Recherche

Titre de la recherche	Étude explorant les corrélations entre la composition du microbiome cutané et différents modes de vie pendant la pandémie de la COVID-19, auprès de participants européens
Titre abrégé de la recherche	Quaranskin
Numéro d'enregistrement (ID-RCB)	2020-A01997-32

Promoteur

Nom, prénom – ou – forme juridique et dénomination	Dr Ariel B. Lindner
Courriel	ariel.lindner@inserm.fr
Adresse complète	8 bis rue Charles 5, 75004, Paris
Téléphone	01 84 25 68 04
Pour les thèses et travaux universitaires : Responsable scientifique - Fonction	Ariel B. Lindner, DR INSERM, Directeur d'unité INSERM U1284, Co-Fondateur, Directeur de Recherche, Centre de Recherches et Interdisciplinaires (CRI), Université de Paris
courriel	ariel.lindner@inserm.fr

Adresse 8 bis rue Charles 5, 75004, Paris

Téléphone 01 84 25 68 04

Investigateur principal

Nom, prénom Dr Ariel B. Lindner

Fonction Directeur de Recherche, cofondateur du Centre de Recherches Interdisciplinaires (CRI), Université de Paris

Adresse complète Centre de Recherches Interdisciplinaires (CRI) , 8 bis rue Charles 5, 75004, Paris

Téléphone 01 84 25 68 04

Courriel ariel.lindner@inserm.fr

Nombre de centre si recherche multicentrique : n/a

Co-investigateur 1

Nom, prénom Jake Wintermute

Fonction Chef d'équipe de recherche

Adresse complète Centre de Recherches Interdisciplinaires (CRI) , 8 bis rue Charles 5, 75004, Paris

Courriel jake.wintermute@cri-paris.org

Co-investigateur 2

Nom, prénom Radoslaw Ejsmont

Fonction Chef d'équipe de recherche

Adresse complète Centre de Recherches Interdisciplinaires (CRI) , 8 bis rue Charles 5,
75004, Paris

Courriel radoslaw.ejsmont@cri-paris.org

Co-investigateur 3

Nom, prénom Bastian Greshake Tzovaras

Fonction Chef d'équipe de recherche

Adresse complète Centre de Recherches Interdisciplinaires (CRI) , 8 bis rue Charles 5,
75004, Paris

Courriel bastian.greshake-tzovaras@cri-paris.org

II/ Contexte de la recherche

Le microbiome humain peut être défini comme l'ensemble des organismes microscopiques qui résident dans ou à la surface du corps humain, et vivent dans une relation symbiotique avec celui-ci. Ces microorganismes recouvrent les trois domaines du vivant, qui interagissent généralement avec l'hôte humain de manière commensale ou mutualiste(1). Les principaux sites du corps où le microbiome de la peau a été étudié sont les suivants : nasal, oral, gastro-intestinal, urogénital et cutané(2).

La microbiomique est un domaine de recherche qui a démontré son intérêt dans le contexte de la santé humaine(1), en développant des nouvelles approches pour comprendre certaines pathologies, des maladies mentales, jusqu'au cancer du poumon. L'une des principales hypothèses concernant l'importance du microbiome pour la santé repose sur la capacité des micro-organismes, qui occupent diverses niches dans le corps humain, à interagir avec les processus cellulaires humains, en fournissant des métabolites secondaires qui contribuent aux voies métaboliques. En témoigne par exemple la synthèse de la vitamine B12 et le métabolisme du lactose, activités bénéfiques réalisées par les microbes intestinaux. Plus généralement, on comprend l'importance de nouvelles études sur la flore microbienne humaine, qui permettront de mieux comprendre l'importance des bactéries qui occupent leurs niches respectives, et qui pourraient conduire à des interventions thérapeutiques dans le futur.

Notre projet s'inscrit dans le domaine plus spécifique du microbiome cutané, c'est-à-dire les micro-organismes qui occupent la peau humaine au niveau de l'hypoderme, du derme et de l'épiderme. La littérature existante a révélé que la composition du microbiome de la peau humaine est fortement liée à un individu sur un site corporel donné. Cependant, toutes les espèces ne sont pas réparties de façon homogène sur toutes les régions du corps, par exemple on retrouve les corynebactéries et les staphylocoques dans les régions cutanées humides, et les propionibactéries dans les régions sébacées(6).

L'analyse de la composition bactérienne s'est révélée être une considération importante dans le contexte de la santé de la peau. Par exemple, les personnes souffrant d'acné vulgaris ont tendance à présenter un profil microbiologique moins diversifié que leurs homologues non atteints. Une autre caractéristique des poussées d'acné est la surreprésentation de certaines souches de *Cutibacterium acnes*, une famille de bactéries qui réside normalement sur la peau de manière non pathogène(7).

Dans la dermatite atopique, un phénomène similaire se produit lorsqu'il y a une diminution de la diversité microbienne globale au niveau des lésions cutanées et une forte représentation de *Staphylococcus aureus*. Le terme utilisé pour désigner les altérations délétères de la flore microbienne est « dysbiose », mais les facteurs qui provoquent cette dysbiose sont mal connus(8).

La connaissance actuelle du microbiome cutané suggère que la composition et la diversité microbienne du microbiome cutané sont stables dans le temps, et qu'une plus grande diversité microbienne est un trait bénéfique. Cependant ces études sont basées sur des populations de 10 à 40 personnes, et la plupart des sujets sont nord-américains ; il est donc nécessaire de diversifier davantage la population à partir de laquelle ces données sont obtenues.

Dans notre projet, nous cherchons à comprendre s'il existe des corrélations entre des traits comportementaux impliquant l'activité physique, les habitudes d'hygiène et les interactions sociales, et la diversité, la composition des micro-organismes présents sur la peau au niveau de quatre régions du corps. Nous pensons que ces comportements pourraient changer les conditions physique de notre peau, l'environnement de ces micro-organismes, et donc déséquilibrer notre microbiome en changeant la diversité relative de certaines espèces par rapport à d'autres.

Pour étudier cette question, nous allons tirer parti du contexte mondial actuel, dans lequel un nombre important de personnes minimisent leurs interactions sociales. Nous allons recruter des volontaires européens pour prélever les microbiomes de leur peau, en vue d'une analyse métagénomique. Nous avons sélectionné quatre sites corporels à échantillonner qui représentent différents « biomes » physiologiques, à savoir les zones humides, sébacées et sèches de la peau. Grâce au séquençage 16s (qui sera effectué par une société externe), nous

pourrons évaluer la composition bactérienne générale de chaque site pour chacun des individus ainsi que la diversité relative au sein de chacun des sites cutanés. Les caractéristiques de ces données seront évaluées au niveau des unités taxonomiques opérationnelles (UTO), à partir desquelles nous calculerons le score de diversité alpha et classerons l'abondance dans chaque site chez un individu. En outre, nous évaluerons le score de diversité bêta et effectuerons une analyse des composantes principales entre les sites corporels d'un individu.

Parallèlement à l'échantillonnage, les participants devront remplir un questionnaire conçu pour recueillir des informations sur leur comportements. Cela nous permettra de corrélérer les indices de diversité microbienne, tels que la diversité alpha, et de mesurer l'abondance des microbes en fonction de certaines habitudes. Des études antérieures ont montré qu'il y a une plus grande homogénéisation de la diversité microbienne dans les communautés qui interagissent entre elles, par opposition aux individus plus isolés. Dans notre contexte, nous pourrions nous attendre à une plus faible homogénéisation en raison des mesures de distanciation sociale. Nous espérons pouvoir déterminer si la distanciation sociale, l'augmentation du lavage des mains et les mesures d'hygiène ont un effet sur la diversité du microbiome de la peau, et si oui, si cela pourrait entraîner une augmentation des troubles cutanés associés au microbiome.

Dans l'ensemble, cette étude fournirait un riche ensemble de données sur les microbiomes cutanés des résidents d'Europe occidentale, dans le contexte d'une pandémie, avec l'inclusion de facteurs comportementaux. Nous montrerons l'impact du mode de vie sur le microbiome cutané, et évaluerons s'il existe une tendance générale entre la diversité microbienne et l'application de mesures de distanciation sociale dans le pays de résidence de nos participants. Ces données pourront être utilisées comme point de comparaison dans de futures études hors du contexte d'une pandémie, où les individus pourraient à nouveau se déplacer librement et interagir socialement, afin d'interroger plus profondément le lien entre le comportement humain et la diversité et la composition du microbiome cutané.

III/ Objectifs et critères de jugement

A) Objectif principal de la recherche et critères de jugement principaux

Objectif principal

Notre premier objectif est de construire une base de données sur la composition du microbiome cutané d'individus de certains pays européens (France et pays limitrophes), dans le contexte inédit de pandémie de la COVID-19. Cette base de données, réalisée selon un protocole standard, avec des conditions d'échantillonnage et d'analyses étudiées et contrôlées, a un double objectif. Le premier, celui d'enrichir le stock d'informations nécessaire à la recherche dans le domaine du microbiome de la peau pour le développement de futures études comparatives, ou encore la compréhension de l'origine de certaines pathologies. En prélevant des échantillons du microbiome de la peau pendant la pandémie de la COVID-19, nous aurons ainsi sauvegardé l'influence des restrictions sociales induites par la pandémie sur le microbiome cutané.

Le second objectif poursuivi en générant ces données, est de comprendre quels facteurs définissent le microbiome cutané d'un individu.

Pour répondre à cette question, nous souhaitons chercher des corrélations, au sein de notre cohorte, entre les compositions (diversité des différentes espèces de bactéries présentes et proportion de chacune de ces espèces) microbiennes de quatre sites corporels - ces sites (paume de la main, avant-bras, fosse antécubitale, pli rétroauriculaire) ont été choisis car représentatifs de l'ensemble des biomes de la peau (zones qualifiées de sèches, humides ou sébacées) - et des données, recueillies au moyen d'un questionnaire électroniques, portant sur les individus prélevés : environnementales (lieu de vie), personnelles (âge, sexe), sur leur mode de vie (hygiène, contacts social), et, si concernés, sur leurs symptômes de pathologies de peau (rougeurs, eczéma, etc.).

Contexte et pertinence de la recherche

Des bases de données existent sur le microbiome de la peau humaine. L'une des initiatives les plus importantes sur le microbiome cutané, intitulée Human Microbiome Project (HMP), a été commencée aux États-Unis par le NIH (National Institute of Health) en 2007. Cette initiative collecte les données sur le microbiome humain provenant de différentes études et les mets à disposition au travers d'une plateforme en ligne pour faciliter la recherche sur le microbiome. 2058 échantillons, provenant du microbiome cutané de sujets humains sains, et prélevés au niveau des plis rétro-auriculaires gauche et droit et des fosses cubitales gauche et droite, sont actuellement disponibles sur la plateforme.

Cependant, certaines informations, importantes selon nous, sont partielles voire absentes, comme par exemple la zone géographique des participants qui n'est pas renseignée. On suppose que la plupart des volontaires sont nord-américains car leurs échantillons ont été prélevés dans un centre d'étude situé aux États-Unis.

En outre, les études liées au projet mentionnent des études longitudinales sur 12 adultes en bonne santé. Cela représente, selon nous, une trop petite taille d'échantillon par rapport à la diversité observée des microbiomes cutanés échantillonnés.

Une recherche bibliographique sélectionnant les articles contenant le terme « Human skin microbiome » dans la base de données Pubmed, nous a confirmé que peu d'articles traitent le sujet (72 articles, revues mises à part), dont 19 seulement étudient la question de la diversité(11-29). Nous avons constaté par ailleurs que les populations nord-américaines et asiatiques étaient principalement étudiées, avec une absence totale d'étude sur les populations européennes.

Plusieurs équipes de recherche ont démontré l'existence de corrélations entre la localisation géographique, l'âge, le sexe et la composition du microbiome cutané. Dans notre cas, nous recherchons des corrélations avec les habitudes d'hygiène et les habitudes sociales, comme cela a été fait dans les études suivantes : *New Insights into the Intrinsic and Extrinsic Factors That Shape the Human Skin Microbiome* (2019), et *Isolation and characterization of diverse microbial representatives from the human skin microbiome* (2020). Cette question devient particulièrement intéressante dans le contexte de la pandémie de la COVID-19, pendant lequel

les habitudes sociales et sanitaires ont été modifiées, entraînant des effets encore inconnus sur le microbiome de la peau humaine.

Critères de jugement

Critères de sélection des participants à l'étude

Les participants de cette étude doivent résider dans l'un des pays suivants : France, Royaume-Uni, Belgique, Allemagne, Autriche, Italie, Espagne, Suisse et Pays-Bas. Nous prévoyons que les participants soient recrutés pendant la période de Décembre 2020 (du 1er Décembre 2020 au 31 Décembre 2020). Le recrutement de notre étude étant diffusé publiquement (sur les réseaux sociaux, sur la plateforme Open Humans, et par mails), les participants devront soumettre leur candidature de participation à l'étude en répondant à un questionnaire de sélection, étape nécessaire à l'obtention d'un échantillon équilibré en terme de sexe et de tranches d'âge et respectant les critères d'inclusion et d'exclusion (cf. note d'information). Les participants sélectionnés seront finalement recrutés dans l'étude après signature du formulaire de consentement.

Critères de jugement des données

Deux jeux de données seront recueillis :

- Les données de séquençage du microbiome de la peau des différents participants. Ces données seront obtenues par séquençage des régions V3-V4 de l'ARNr 16S, utilisant la technologie Illumina MiSeq.
- Les informations personnelles relatives aux participants, telles que l'âge, le sexe, la nationalité des parents biologiques, le pays de résidence, l'environnement de travail, les habitudes sportives, la fréquence des interactions sociales, les habitudes d'hygiène et les moyens de transports utilisés. Ces données seront obtenues au moyen d'un questionnaire électronique qui sera proposé aux participants au cours de leur participation à l'étude.

Ces deux ensembles de données seront utilisés afin de mettre en évidence des relations de corrélation entre caractéristiques du microbiome cutané (indice de Shannon, diversité gamma, présence d'espèces rares ou d'espèces à fort potentiel pathogène) et

facteurs intrinsèques et extrinsèques des individus. Une corrélation bivariée sera effectuée entre chaque paire de variables afin d'obtenir une matrice de corrélation. Des approches plus globales, telles que l'analyse des composantes principales ou encore des regroupements hiérarchiques seront effectués. Les regroupements hiérarchiques s'avèrent être un outil précieux pour visualiser des similitudes entre individus, similitudes difficiles à observer avec des données hautement dimensionnelles, comme c'est le cas ici.

B) Objectifs secondaires de la recherche et critères de jugement principaux

Objectif secondaire 1 (OS1)

Le premier objectif secondaire consiste à étudier les effets du stockage à sec et à température ambiante, sur les échantillons de microbiome de la peau humaine prélevés à l'aide de cotons-tiges.

Contexte

Notre protocole consiste à échantillonner le microbiome de la peau à l'aide de cotons-tiges, conformément à la littérature sur l'étude du microbiome de la peau humaine. Notre méthodologie diverge néanmoins en ce qui concerne le stockage des échantillons. En effet, certaines études antérieures utilisent des tampons de stockage, ou une extraction de l'ADN suivi d'une congélation à -80°C. Mais nous avons rencontré quelques articles affirmant qu'ils pouvaient stocker des échantillons à sec (c'est-à-dire sans utiliser de tampon de stockage) à température ambiante pendant des mois, tout en maintenant une bonne qualité d'ADN pour un séquençage 16S. Notre parcours d'analyse des échantillons (de l'échantillonnage au séquençage) doit montrer que la reproductibilité et la qualité de l'ADN des échantillons sont suffisantes pour le séquençage ultérieur des régions V3-V4 du gène de l'ARNr 16S.

Critère de jugement

Pour atteindre cet objectif, nous devrons utiliser une communauté artificielle de bactéries (comme celle établie par le consortium HMP) que nous prélèverons à l'aide de cotons-tiges stériles. Le stockage à sec sera testé à température ambiante, à 4°C (température du réfrigérateur) ou à -18 °C (température du congélateur) et en conservant les cotons-tiges pendant 1 semaine, 2 semaines, 3 semaines et 4 semaines. Un contrôle positif utilisant un tampon de stockage sera réalisé pour chaque condition mentionnée ci-dessus. L'ADN sera extrait à l'aide de kits miniprep, puis un test de contrôle de qualité sera effectué à l'aide d'un Nanodrop. Les entreprises de séquençage s'attendent à une pureté de l'échantillon (DO 260/280) comprise entre 1.8 et 2.0, une concentration de 20 ng/µl et une quantité minimale de 500 ng d'ADN. Nous vérifierons que notre concentration en ADN ne passe pas en dessous de ce seuil, pour les différentes périodes de stockage. Des duplicats des cotons-tiges seront envoyés à la société de séquençage Genewiz pour l'extraction et le séquençage de l'ADN. Les résultats de leurs contrôles de qualité seront comparés aux nôtres pour vérifier l'impact de l'expédition et de la manipulation des échantillons par l'entreprise de séquençage. La composition bactérienne sera comparée entre les différents moments pour voir si nous maintenons la même composition bactérienne pendant les périodes de stockage étudiées.

Pour vérifier cela, nous pouvons utiliser l'indice de diversité de Shannon, obtenu pour chaque échantillon que nous soustrairons à l'indice de diversité de Shannon des informations de séquençage combinées. Si aucun changement n'est intervenu dans la composition bactérienne entre les différents points temporels, alors la différence dans l'indice de diversité de Shannon devrait être nulle. Une autre approche peut être la comparaison des identités d'espèces extraites des différents échantillons et du nombre de séquences attribuées à chaque espèce. Cette comparaison sera normalisée par le nombre total de lectures extraites des échantillons.

Objectif secondaire n°2 (OS2)

Étude de l'influence de l'opérateur sur l'échantillonnage en vue de qualifier la pratique de « l'auto-échantillonnage » des participants pour l'étude du microbiome de la peau.

Contexte

L'étude de cette question pourrait faciliter l'organisation des projets scientifiques participatifs autour de l'étude des microbiomes. Cela nous permettra aussi de déterminer comment organiser notre étude du microbiome de la peau humaine pour répondre aux critères de reproductibilité et de qualité de l'ADN nécessaires au séquençage du microbiome de la peau et à son analyse correcte.

Critères de jugement

Nous comparerons des échantillons de microbiomes de la peau provenant du même individu mais obtenus par auto-échantillonnage ou prélevés par des chercheurs formés.

Nous voulons également fournir un manuel d'instruction détaillant le protocole d'échantillonnage aux participants afin de limiter les différences de pratiques d'échantillonnage entre les différents individus. Nous aurons besoin de 3 groupes différents :

Groupe 1 : les participants se prélèvent eux-mêmes des échantillons après de courtes explications par les investigateurs de l'étude ; ceux-ci sont ensuite comparés à ceux prélevés par les investigateurs. Ce groupe correspond au groupe de contrôle négatif.

Groupe n°2 : identique au groupe n°1, mais les participants reçoivent le manuel d'instruction détaillant le protocole d'échantillonnage à lire en plus des courtes explications.

Groupe n°3 : les participants ne s'échantillonnent pas eux-mêmes ; deux investigateurs différents échantillonnent le même participant, et les deux échantillons prélevés par les investigateurs seront comparés. Ce groupe correspond au groupe de contrôle positif.

Après échantillonnage du microbiome cutané sur 4 sites corporels différents, les échantillons seront transférés à une société de séquençage. L'ADN sera extrait et les régions V3-V4 du gène 16S rRNA seront amplifiées spécifiquement avant un séquençage métagénomique de nouvelle génération en utilisant la technologie MiSeq d'Illumina. Ensuite, la société de séquençage nous renverra les séquences brutes pour que nous les traitions et les analysions.

Le traitement des séquences brutes sera effectué à l'aide des logiciels suivants : Mothur et Qiime. Le traitement consistera à découper les codes barres, à enlever les chimères, à générer des UTO et à identifier les séquences à l'aide de la base de données SILVA.

Après la détermination des UTO, nous serons en mesure de déterminer la composition taxonomique de chaque échantillon. Nous utiliserons la composition taxonomique, ainsi que

l'indice de diversité de Shannon pour voir quelle approche est la plus similaire aux échantillons obtenus du même individu par deux enquêteurs différents (groupe n°3 de cette expérience, groupe témoin positif).

Nous considérerons que les informations apportées avec le manuel d'instruction seront suffisamment claires si la différence obtenue avec le groupe témoin positif est non significative. Dans ce cas nous pourrions considérer qu'il n'y a pas de variabilité due à la pratique d'échantillonnage selon les individus.

IV/ Organisation de l'étude

A) Description synthétique du schéma d'étude

Description, déroulement de l'étude

Recrutement des participants : Tout d'abord nous enverrons un formulaire de participation joint de la note d'information et le formulaire de consentement aux participants. Nous enverrons ces deux documents par courriel. Pour recruter les participants nous allons utiliser le réseau de notre institution, le CRI, en envoyant ce courriel à tous les membres du CRI (étudiant, chercheurs...). Nous allons aussi envoyer ce mail à tous les membres des autres équipes participant au concours iGEM afin d'avoir des participants de différents pays. Le formulaire de participations nous permettra de récupérer les adresses électroniques pour envoyer le questionnaire et les adresses postales pour envoyer les kits d'échantillonnage. Seulement lorsque l'on recevra le formulaire de participation rempli ainsi que le formulaire de consentement daté et signé nous prendrons en compte la participation de l'individu.

Anonymisation : Les participants recevront, au même moment que le kit et le lien pour remplir le questionnaire en ligne, un lien leur permettant de se créer un compte sur la plateforme Open Humans. Un numéro unique à 8 chiffres (que l'on appellera dans les documents d'information "code d'identification") sera alors généré pour chaque participant qui se crée un compte sur la plateforme. Ils devront noter ce numéro sur leurs échantillons et l'indiquer en répondant au questionnaire afin que nous ne puissions pas relier les données générées à leur identité. Un fichier reliant les informations personnelles (nom et adresse mail) des participants à leur code d'identification sera conservé par Open Humans sur un de leurs serveurs et ne sera pas divulgué aux investigateurs de l'étude. Un autre fichier reliant les données de l'étude et les codes d'identification sera généré par les investigateurs sur un serveur séparé. Ces deux fichiers ne seront pas soumis ensembles en ligne. Les investigateurs n'auront pas accès au fichier liant codes d'identification aux informations personnelles des participants mais auront seulement accès au fichier liant codes d'identification aux données d'étude.

Envoie des questionnaires et kits d'échantillonnage : Nous enverrons le questionnaire par mail et les kits par un système Colissimo permettant un retour d'échantillon à nos frais. Les participants devront alors échantillonner leur microbiome cutané sur 4 parties du corps en suivant les instructions que nous leur fournirons puis dans la même journée répondre à un questionnaire. Les participants devront indiquer leur numéro d'anonymisation sur le questionnaire ainsi que sur les échantillons avant de nous soumettre le questionnaire en ligne et de nous envoyer les échantillons par le système de retour Colissimo.

Extraction d'ADN et Séquençage : Pour des raisons de sécurité, nous ne traiterons pas les échantillons dans notre laboratoire, nous allons envoyer les échantillons à une compagnie de séquençage externe qui réalise l'extraction d'ADN et le séquençage de la région 16S en utilisant la technique Illumina. Nous ne récupérerons que les résultats de séquençage sous forme de séquences d'ADN.

Durée totale de l'étude : 6 mois, du 1er décembre 2020*, jusqu'au 1er juin 2021.

Calendrier prévisionnel*

- 1er décembre 2020 au 1er janvier 2021 - Recrutement des participants

- 10 janvier 2021 - Date limite d'acceptation des candidatures
- 10 janvier 2021 au 17 janvier 2021 - Envoi des échantillons aux participants avec le questionnaire à remplir en ligne.
- 01 février 2021 - Envoi des échantillons à la compagnie de séquençage Genewiz
- 20 février 2021 - Réception des résultats de séquençage
- 20 février au 30 avril 2021 - Analyse des données
- 01 mai 2021 au 31 mai 2021 - Présentation et partage des résultats avec les participants
- 01 juin 2021 - fin de l'étude

** Sous réserve d'un avis favorable du CPP avant le 30 novembre, et déclaration CNIL effectuée*

Période d'inclusion prévue et durée de la participation par patient (le cas échéant) : Les participants sont inclus dans l'étude du 1er décembre 2020 au 1er janvier 2021. Leur participation active à partir de leur inclusion dans l'étude (moment où ils signent formulaire de consentement et remplissent le formulaire de participation) ne sera demandée que pour une durée de quelques heures (le temps de répondre au questionnaire , d'échantillonner leur microbiome de la peau et nous nous envoyer les échantillons).

Processus de consentement : le formulaire de consentement est mis en pièce jointe au formulaire de participation. Les participants pourront donc la télécharger puis devront, après l'avoir signer et dater, la recharger sur ce même formulaire de participation. Dans ce formulaire le chargement de le formulaire de consentement est une étape requise pour sa soumission.

Compensation : les participants ne recevront aucune compensation financière pour leur participation à cette étude.

Stockage, traitement et accès aux données

Nous utilisons la plateforme Open Humans pour jouer le rôle d'intermédiaire entre les investigateurs de la recherche et les participants.

Open Humans est un logiciel *open source* qui constitue l'un des programmes de Open Human Foundation, une organisation à but non lucratif basée aux États-Unis. Cette organisation propose des outils numériques permettant à des individus ou à des communautés d'exploiter et de partager leurs données personnelles dans des perspectives éducatives, de santé ou de

recherche. C'est cette organisation qui exploite et gère Open Humans, dont le projet est de faciliter la participation d'individus, de citoyens, dans des projets de recherche scientifique ou de « science citoyenne ».

Les serveurs utilisés par Open Humans pour le stockage des données font appel à des mesures de sécurité de pointe ; ceux-ci sont protégés par un pare-feu, et fonctionnent avec un cryptage de haut niveau afin de garantir la confidentialité et la sécurité des données. Le traitement des données respecte les réglementations des États-Unis et de l'Union Européenne sur la protection des données (cf. *Data Collecting and Sharing* <https://www.openhumans.org/terms/>). Coordonnées du référent européen : Madame Marja Pirttivaara, PhD (marja.pirttivaara@gmail.com).

Après la collecte et le séquençage des échantillons de microbiomes de la peau, les données anonymisées seront partagées avec les participants à l'étude sur la plateforme Open Humans (OH). La plateforme OH est un projet de la Fondation Open Humans, une organisation à but non lucratif fondée en 2008 et qui se consacre à rendre accessible un large éventail de données sur les humains afin d'accroître la littérature en biologie et d'améliorer la santé humaine. Elle invite les participants volontaires à partager leurs données personnelles pour le bien commun et s'efforce de rendre cela possible en aidant à mettre en relation les chercheurs et les participants qui souhaitent partager des données dans le cadre d'une étude.

Nous allons recueillir des "informations personnelles" et des "données de l'étude". Les "informations personnelles" font référence aux informations qui permettent d'identifier directement les participants, comme le nom, l'adresse... Les "données de l'étude" font référence aux informations liées à l'étude qui ne permettent pas d'identifier directement une personne, comme l'âge, le sexe et les données sur le microbiome de la peau. Les données que nous collectons seront anonymisées pour protéger l'identité des participants en utilisant la plateforme de l'OH. Tous les participants sont tenus de s'inscrire sur la plateforme Open Humans, qui génère ensuite de manière aléatoire un identifiant unique à 8 chiffres.

Les informations personnelles liées aux identifiants uniques ne sont pas connus des investigateur de l'étude et sont stockés sur la plateforme OH. Les investigateurs ne peuvent consulter que l'identifiant unique à 8 chiffres et les données de séquençage correspondantes. Ils peuvent contacter les participants en utilisant l'identifiant unique à 8 chiffres directement depuis la plateforme. Chaque échantillon est étiqueté avec l'identifiant unique à 8 chiffres des participants (généré par Open Humans) sur les kits de prélèvement. Les données traitées

partagées par l'entreprise de séquençage seront ensuite téléchargées sur la plateforme OH par l'équipe Quaranskin et seront mises en correspondance avec le profil de l'utilisateur à l'aide de l'identifiant unique à 8 chiffres.

Un participant peut désactiver son compte OH à tout moment en contactant l'équipe Quaranskin. Cela signifie que le profil d'utilisateur ne sera plus visible sur le site de l'OH et que les autres utilisateurs de l'OH n'auront plus accès aux données personnelles partagées par les participants.

B) Méthodologie (protocole d'échantillonnage + questionnaire + séquençage)

1. questionnaire (voir document “Questionnaire”) :

Nous utilisons la plateforme Framaforms de questionnaire en ligne.

Framaforms est l'un des services de Framasoft, une plateforme numérique ayant le statut d'association loi de 1901 (à but non lucratif) depuis 2003 et basée à Lyon. Framasoft, initialement développé dans le cadre de l'éducation nationale, s'inscrit désormais dans une démarche proposant des logiciels libres à tout utilisateur, comme Framaforms. Les données stockées par Framaforms sont cryptées et les serveurs utilisent des pare-feux sécurisés ; les services de Framasoft sont utilisés et recommandés par des nombreuses Académies, comme les Académies de Toulouse, Besançon et Dijon.

Les participants devront répondre à un questionnaire en ligne via la plateforme Framaforms. Le lien de ce questionnaire sera envoyé par courriel. Les réponses à ce questionnaire resteront anonymes, elle ne seront reliées qu'au code d'identification que les participants devront indiquer en remplissant le questionnaire.

Le questionnaire se présente en quatre parties :

- Informations générales (tels que age, sexe, ville et pays de résidence)
- Habitudes d'hygiène

- Niveau de confinement (une série de questions permettant de connaître les habitudes de la vie quotidienne du participant afin d'évaluer son niveau de confinement)
- Trouble de la peau (questions pour connaître les éventuelles maladies de peau auxquelles le participant est sujet et pour savoir si des symptômes sont apparus ou se sont intensifiés pendant le confinement)

2. Échantillonnage du microbiome de la peau

Ce protocole décrit comment les participants doivent prélever (eux-mêmes) 4 sites corporels, la paume de la main, l'avant-bras, la fosse antécubitale (pli du coude) et le pli rétroauriculaire (derrière les oreilles), pour obtenir le matériel génétique nécessaire à l'étape de séquençage de l'ADN. Les participants devront stocker et envoyer leurs échantillons aux organisateurs de l'étude. Un protocole clair et détaillé pour guider les participants à travers les différentes étapes sera fourni dans le kit de participation (voir pièce jointe "guide du participant"). En plus des directives écrites, les participants auront accès à une vidéo montrant l'ensemble de la procédure.

Liste du matériel nécessaire et fourni dans les kits :

1 manuel d'instruction

6 étiquettes autocollantes pour annoter les échantillons

1 patron carré de 16 cm²

4 écouvillons stériles (deux écouvillons supplémentaires seront fournis en cas d'erreur)

1 lettre de retour prépayée (format A5)

Protocole :

Le protocole de prélèvement consiste à frotter un écouvillon sec sur une zone de 16 cm² d'un site du corps, en effectuant 50 aller-retour en 30 secondes environ, tout en appliquant une légère pression sur la peau. La surface de 16 cm² sera déterminée grâce à un patron de 16 cm² qui sera fourni et grâce aux indications visuelles (photos et vidéo). La décision d'effectuer 50 aller-retour en 30 secondes provient du protocole d'échantillonnage du Projet du Microbiome Humain et devrait réduire les différences de composition microbienne observées dues à l'hétérogénéité de la procédure d'échantillonnage.

Les sites du corps seront échantillonnés dans l'ordre suivant, la main pointant vers le bas ou posée à plat sur une surface, afin d'éviter la contamination croisée due à la chute des peaux mortes :

- 1 Centre de la paume de la main
- 2 Centre de l'avant-bras
- 3 Fosse antécubitale
- 4 Plis rétro-auriculaires

Les participants prélèveront le côté de leur corps opposé à leur main dominante : un participant droitier prélèvera les sites de son corps à gauche, et l'inverse pour les participants gauchers.

S'il est impossible pour le participant de prélever les sites corporels de son côté non dominant, pour des raisons telles qu'une blessure sur le site de prélèvement, une contamination ou un site déjà prélevé sans stockage de l'échantillon, le participant est autorisé à prélever son site miroir. Le participant doit préciser dans le questionnaire quel site a été échantillonné sur son côté dominant.

Échantillonnage de la paume de la main

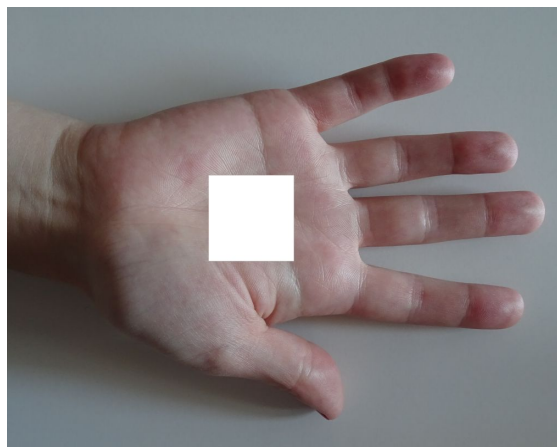


Fig.1 : Position de la zone d'échantillonnage de 16 cm² sur la main de la paume

Les participants ne doivent utiliser que leur main dominante pour prélever le site de la paume de la main. Les participants doivent s'asseoir sur une chaise pendant toute la procédure de prélèvement, orienter leur main non dominante vers le bas ou la poser à plat sur une surface,

ouvrir un tube stérile en n'utilisant que leur main dominante et effectuer un prélèvement de 50 aller-retour, ce qui représente environ 30 secondes, en appliquant une légère pression (tige légèrement courbée). Il faut veiller à éviter de contaminer le coton-tige en touchant d'autres surfaces que le site du corps à échantillonner.

Une fois l'écouvillonnage terminé, l'écouvillon doit être replacé dans son tube de prélèvement, sans le faire toucher les parois du tube. Le tube de prélèvement doit être étiqueté en conséquence, comme expliqué dans la section relative au retour.

Échantillonnage de l'avant-bras

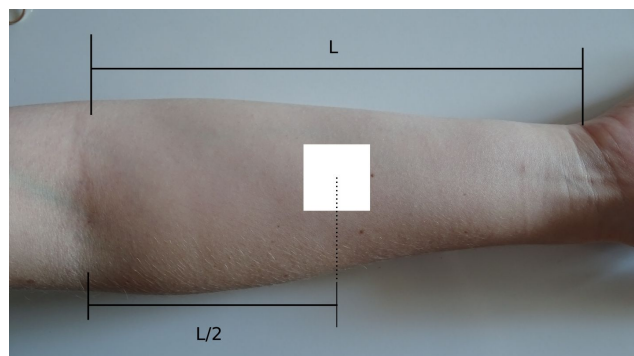


Fig.2 : Position de la zone de prélèvement de 16cm² sur l'avant-bras

La zone d'échantillonnage est située au milieu de la zone de l'avant-bras. Les participants peuvent observer la position selon la photo de la fig.2. Nous ne nous attendons pas à voir beaucoup de différences si la position n'est pas exacte.

Échantillonnage de la fosse antécubitale (pli intérieur du coude)

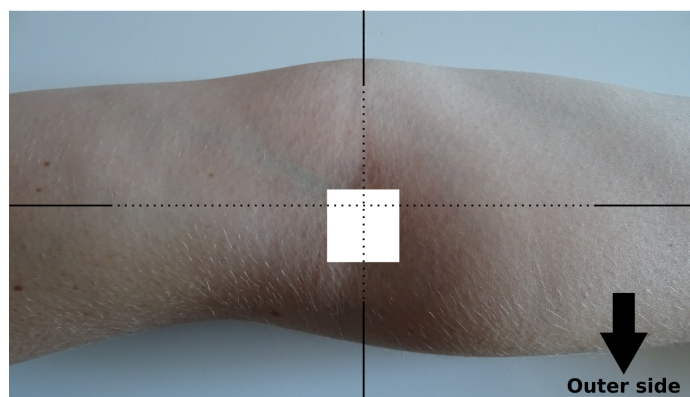


Fig.3 : Position de la zone de prélèvement de 16cm² sur la fosse antécubitale

La zone de prélèvement est positionnée au niveau de la gorge interne du coude, légèrement décalée par rapport au centre du bras, pour se trouver dans la fosse antécubitale. La fosse antécubitale est visible sous la forme d'une petite dépression à l'intérieur du coude.

Les instructions d'échantillonnage de l'avant-bras et de la fosse antécubitale sont les mêmes que celles mentionnées pour la paume centrale de la main, mais les participants peuvent utiliser leur main non dominante pour les aider à manipuler le prélèvement.

Échantillonnage du pli rétro auriculaire



Fig.4 : Position de la zone de prélèvement sur le pli rétro auriculaire

La zone de prélèvement est différente des autres sites corporels en raison de l'aspect étroit du pli rétroauriculaire. Les participants devront utiliser la main du même côté que le pli rétroauriculaire à échantillonner (main non dominante pour échantillonner le pli rétroauriculaire du côté non dominant).

L'écouvillon stérile sera mis en contact avec le pli rétro auriculaire avant de commencer à prélever 50 aller-retour, d'une durée d'environ 30 secondes.

L'écouvillon doit ensuite être replacé dans son tube de prélèvement et étiqueté en conséquence.

Renvoi :

Au cours de la procédure de prélèvement, le tube de collecte doit être correctement étiqueté pour permettre l'identification des différents échantillons.

Les étiquettes autocollantes doivent être remplies avant de commencer la procédure de prélèvement

4 étiquettes autocollantes seront présentes dans le kit de participation avec la mention "QUARANSKIN:_____ -__" sur eux. Les participants devront remplir les étiquettes en y inscrivant leur identifiant unique à 8 chiffres suivi du code correspondant à la partie du corps.

Code correspondant au site corporel:

Paume de la main : 01

Avant-bras : 02

Fosse antécubitale : 03

Plis rétro auriculaires : 04

Exemple d'une étiquette remplie :

"QUARANSKIN:12345678-01" est l'étiquette correspondant à l'échantillon de la paume centrale de la main du participant 12345678.

Tous les tubes doivent être placés par les participants dans la lettre de retour fournie dans le kit et renvoyés aux organisateurs immédiatement après la fin de la procédure d'échantillonnage.

3. Extraction d'ADN + séquençage

Cette partie est réalisée par la compagnie de séquençage Genewiz. Elle se fera en plusieurs étapes :

1. Extraction d'ADN bactérien.
2. Amplification des régions V3-V4 de la petite sous unité ribosomique 16S
3. Séquençage des amplicons par technique Illumina

Le protocole utilisé pour extraire l'ADN est un protocole spécifique pour extraire l'ADN de bactéries et non pour extraire l'ADN humain de cellules de peau. Il est donc peu probable de récolter l'ADN humain lors de cette étape. De plus le gène codant pour l'ARN ribosomique 16S (ARN ribosomique constituant la petite sous-unité des ribosomes des procaryotes) n'est pas présent dans le génome humain et le séquençage ne se fera que sur les régions V3-V4 de ce gène 16S préalablement amplifiées. Après extraction, amplification et séquençage d'ADN **bactérien**, les échantillons seront éliminés. Il n'y a donc pas de risque que le matériel génétique humain soit recueilli et séquencé.

C) Trame de l'analyse statistique

Les données brutes provenant des résultats de séquençage (séquence d'ADN en format fastq) seront premièrement analysées afin d'identifier les espèces bactériennes présentes dans chacun des échantillons de microbiome de peau. Après avoir attribué un profil microbien à chacun des participants (anonymisés et identifiés seulement par leur code d'identification) nous comparerons ces résultats en regardant les réponses au questionnaire afin de trouver de potentielles corrélations entre certains motifs de microbiome et certaines habitudes de vie ou maladies de peau. Cela implique l'utilisation d'une série de logiciels (par exemple, Python, R, benchling...). L'analyse des données sera effectuée uniquement sur un ensemble de données anonymes.

V/ Informations relatives à la mise en œuvre de la recherche

Type de lieu ou se déroule la recherche : Participation depuis chez soit. Les participants n'auront pas à se déplacer : les échantillons sont renvoyés par la poste et le questionnaire est soumis en ligne.

La recherche implique-t-elle en plus du recueil de données rétrospectives (oui/non) : non

Personnes incluses dans la recherche :

Cité dans le formulaire de consentement : “

Critères d'inclusion :

- avoir atteint l'âge de majorité (en fonction de la législation de votre pays);
- avoir moins de 66 ans;
- être en capacité à fournir le formulaire de consentement datée et signée, et à comprendre son contenu;
- être volontaire et dans la capacité à fournir des échantillons de votre microbiome de la peau comme demandé par cette étude;

Critère d'exclusion :

- Avoir de la fièvre au moment de l'échantillonnage (température corporelle supérieur à 37.8°C);
- Appliquer d'important quantités de produits probiotiques sur votre peau;
- Être actuellement sous traitement antibiotique, antifongique et/ou antiviral;
- Avoir été sous traitement antibiotique, antifongique et/ou antiviral systémique moins de 3 mois avant le début de cette étude (un traitement systémique correspond à un traitement diffusant dans l'ensemble de l'organisme);
- Avoir été sous traitement local antibiotique, antifongique, antiviral ou stéroïdien (corticoïdes) moins d'une semaine avant le début de l'étude;
- Avoir été concernés ou être actuellement concernés par une consommation abusive de substances (nous déterminons comme consommation abusive d'alcool les faits suivants: plus de 5 verres de 45mL de spiritueux distillés ou plus de 5 verres de 350mL de bière ou plus de 5 verres de 150mL de vin, par jour. La consommation fréquente, de stupéfiants est également proscrite);
- Avoir une infection active ou une maladie aiguë au moment de l'échantillonnage du microbiome de la peau (une maladie aiguë correspond à une maladie présentant des symptômes modérés ou sévères, avec ou sans fièvre, et à caractère occasionnel);
- Avoir un cancer ou suivre une thérapie anticancéreuse;
- Etre enceinte ou en période de lactation;
- Avoir eu une opération chirurgicale invasive moins d'un mois avant le début de l'étude;
- Etre immunodéficients;
- Prendre un traitement médicamenteux (pour guérir ou réduire les symptômes d'une maladie) pour une ou des maladies aiguës ou chroniques, **sauf si ces maladies sont liées à la peau** (ex: eczéma, psoriasis, etc.);
- Avoir été diagnostiqué positif pour le COVID-19 ou avez eu des symptômes évoquant la COVID-19 (comme la fièvre, la toux sèche, une fatigue importante, des difficultés à respirer ou un souffle court, une douleur ou pression au niveau de la poitrine, une perte du goût et/ou de l'odorat).

Modalités d'information et de traçabilité de la non- opposition : Les participants reçoivent par mail et par la poste un guide présentant l'étude et la procédure à suivre en tant que

participant. Une description détaillée ainsi que toutes les ressources envoyées par mail et par la poste (guide, questionnaire, vidéo de protocole etc...) de l'étude seront aussi accessibles sur notre site web. Dans le formulaire de consentement, nous leur demandons de formuler explicitement leur volonté de quitter l'étude en nous contactant par mail, afin que nous détruisions leurs données.

Inconvénients pour les personnes incluses dans la recherche :

Le protocole d'échantillonnage du microbiome de la peau a été testé par les investigateurs sur eux même et devrait être indolore. Le protocole proposé est une adaptation d'un protocole standard établi par le Human Microbiome Project (Manual of Procedures for Human Microbiome Project, Version 12.0 (2010)) qui a défini ce protocole comme «un protocole à risque minimal pour les participants à l'étude».

Frotter le coton-tige sur la peau pourrait causer de légères rougeurs et irritations passagères sur les parties du corps échantillonnées.

Durée prévisionnelle du recueil de données par questionnaire pour un participant : 20 minutes

Durée prévisionnelle de l'échantillonnage du microbiome cutané pour un participant : 20 minutes

Bibliographie

1. Dekaboruah, Elakshi, et al. "Human microbiome: an academic update on human body site specific surveillance and its possible role." *Archives of Microbiology* (2020): 1-21.
2. Huttenhower, Curtis, et al. "Structure, function and diversity of the healthy human microbiome." *nature* 486.7402 (2012): 207.
3. Moran, Gary P., and Nezar Al-Hebshi. "The Human Microbiome and Cancer." *Frontiers in Microbiology* 11 (2020).
4. Martin, Clair R., et al. "The brain-gut-microbiome axis." *Cellular and molecular gastroenterology and hepatology* 6.2 (2018): 133-148.
5. Reardon, Sara. "Microbiome therapy gains market traction." *Nature* 509.7500 (2014): 269-70.
6. Byrd, Allyson L., Yasmine Belkaid, and Julia A. Segre. "The human skin microbiome." *Nature Reviews Microbiology* 16.3 (2018): 143.

7. Li, Huiying. "Metagenomic study of the human skin microbiome associated with acne." *Nature Precedings* (2010): 1-1.
8. Geoghegan, Joan A., Alan D. Irvine, and Timothy J. Foster. "Staphylococcus aureus and atopic dermatitis: a complex and evolving relationship." *Trends in microbiology* 26.6 (2018): 484-497.
9. Oh, Julia, et al. "Temporal stability of the human skin microbiome." *Cell* 165.4 (2016): 854-866.
10. Manus, Melissa B., et al. "Environmental influences on the skin microbiome of humans and cattle in rural Madagascar." *Evolution, medicine, and public health* 2017.1 (2017): 144-153.
11. Diversity of bacterial communities on the facial skin of different age-group Thai males, 2017
12. The Influence of Age and Gender on Skin-Associated Microbial Communities in Urban and Rural Human Populations, 2015
13. Biogeography and individuality shape function in the human skin metagenome, 2014
14. Topographic diversity of fungal and bacterial communities in human skin, 2013
15. Characterization of *Malassezia* microbiota in the human external auditory canal and on the sole of the foot, 2012
16. Topographical and temporal diversity of the human skin microbiome, 2009
17. Molecular analysis of fungal microbiota in samples from healthy human skin and psoriatic lesions, 2006
18. Detection of potentially novel bacterial components of the human skin microbiota using culture-independent molecular profiling, 2005
19. Simultaneous profiling and cultivation of the skin microbiome of healthy young adult skin for the development of therapeutic agents, 2020
20. Isolation and characterization of diverse microbial representatives from the human skin microbiome, 2020
21. New Insights into the Intrinsic and Extrinsic Factors That Shape the Human Skin Microbiome, 2019
22. Ultraviolet radiation, both UVA and UVB, influences the composition of the skin microbiome, 2019
23. Phylogenomic Based Comparative Studies on Indian and American Commensal *Staphylococcus epidermidis* Isolates, 2018
24. Environmental influences on the skin microbiome of humans and cattle in rural Madagascar, 2017
25. Preliminary characterization of human skin microbiome in healthy Egyptian individuals, 2016
26. Genetic associations and shared environmental effects on the skin microbiome of Korean twins, 2015
27. Temporal Stability of the Human Skin Microbiome, 2016
28. Hand bacterial communities vary across two different human populations, 2014
29. Diversity of the human skin microbiome early in life, 2011