

①② **DEMANDE DE BREVET D'INVENTION** **A1**

②② Date de dépôt : 19.12.22.

③③ Priorité :

④③ Date de mise à la disposition du public de la
demande : 21.06.24 Bulletin 24/25.

⑤⑥ Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du
présent fascicule*

⑥③ Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

○ Demande(s) d'extension :

⑦① Demandeur(s) : *BIOFILM CONTROL Société par
actions simplifiée* — FR.

⑦② Inventeur(s) : BERNARDI Thierry et SUISSA David.

⑦③ Titulaire(s) : BIOFILM CONTROL Société par actions
simplifiée.

⑦④ Mandataire(s) : IP TRUST.

⑤④ **DISPOSITIF POUR LA CARACTERISATION HOLISTIQUE DU MICROBIOTE PRESENT SUR LA PEAU ET
METHODE DE RECOMMANDATION COSMETIQUE.**

⑤⑦ La présente invention concerne le domaine de la caractérisation du microbiote présent sur la peau humaine. Elle concerne plus particulièrement un dispositif de révélation immunologique du complexe peau-microbiote permettant de faire un relevé biologique rapide et significatif des deux membres de la symbiose peau-microbiote grâce à une caractérisation immunologique de marqueurs biologiques accessibles en surface de l'interactome microbiote-peau. Une Intelligence artificielle permet ensuite de conseiller le meilleur soin adapté d'une part au type de peau et d'autre part compatible avec son microbiote, réduisant les risques d'effets indésirables. De la même façon, en cas d'imperfection de la peau et/ou de déséquilibre du microbiote, la présente invention permet de recommander le meilleur soin correctif, soit garanti compatible avec le microbiote, soit capable de le réguler.



Description

Titre de l'invention : DISPOSITIF POUR LA CARACTÉRISATION HOLISTIQUE DU MICROBIOTE PRÉSENT SUR LA PEAU ET METHODE DE RECOMMANDATION COSMETIQUE

[0001] La présente invention concerne le domaine de la caractérisation du microbiote présent sur la peau humaine (ou « microflore » de la peau humaine). De la même façon que le microbiote intestinal interagit avec le tube digestif dans une symbiose « microbiote-hôte », le microbiote cutané interagit avec la peau aussi en symbiose. De la même façon, il existe autant de type de peaux que de microbiotes, et une atteinte sur un membre de la symbiose se répercute sur l'autre. Ceci est important pour maintenir une peau saine ou pour corriger des imperfections avec des produits de soins cosmétiques. La présente invention permet de faire un relevé biologique rapide et significatif des deux membres de la symbiose grâce à une caractérisation immuno- nologique de marqueurs biologiques accessibles en surface de l'interactome microbiote - peau. Une Intelligence artificielle permet ensuite de conseiller le meilleur soin adapté d'une part au type de peau et d'autre part compatible avec son microbiote, réduisant les risques d'effets indésirables. De la même façon, en cas d'imperfection de la peau et/ou de déséquilibre du microbiote, la présente invention permet de recommander le meilleur soin correctif, soit garanti compatible avec le microbiote, soit capable de le réguler.

Domaine de l'invention

[0002] Le domaine de l'invention est celui du conseil de soin cosmétique. Sans inférer dans le domaine de la Santé, un produit cosmétique doit pouvoir remplir son rôle de produit de soin pour maintenir ou améliorer l'apparence de l'utilisateur. Mis en contact avec les diverses parties superficielles du corps humain (épiderme, systèmes pileux et capillaire, ongles, lèvres et organes génitaux externes), il ne doit présenter aucun danger pour la santé. Dans un objectif de conseil personnalisé, la présente invention propose d'apporter une information sur la peau et le microbiote associé, correspondant à une symbiose, en considérant qu'un produit doit à la fois être adapté au besoin de la peau en hydratation, en hygiène, en protection, en modification d'aspect (teint, couleur...) ainsi qu'à la susceptibilité du microbiote. Par exemple en conseillant des produits contenant des principes actifs compatibles avec le maintien ou la régénération du microbiote, et en évitant des principes actifs déstabilisant ledit microbiote (favorisant une espèce microbienne pouvant induire un risque de prolifération opportuniste). Par extension, le domaine de l'invention peut s'appliquer au Diagnostic de Santé de la peau d'un patient, en permettant de consolider le diagnostic clinique relatif par

exemple à l'état d'inflammation (résultat d'une réaction du système immunitaire) et au statut microbiologique (microbiote équilibré ou dysbiose avec forte présence d'un pathogène opportuniste). L'invention peut être alors devenir un Dispositif Médical de Diagnostic *in vitro*. De la même façon, l'invention peut être utilisée pour réaliser un suivi de l'état de la peau sur une période donnée et suivre l'effet d'une routine cosmétique, mais aussi d'un traitement thérapeutique préventif et ou curatif.

- [0003] Le domaine de l'invention s'adresse à l'homme en tant qu'«hybride mammifère-microbes», un « super-organisme», notre microbiote excédant respectivement d'un facteur 10 en nombre de cellules composant notre corps. Le microbiote étant entendu-là comme réunissant l'ensemble des microorganismes au contact des cellules constitutives du corps humain : virus, phages, bactéries, levures, champignons... jusqu'aux acariens. Si l'on se restreint au microbiote bactérien, l'ordre de grandeur se ramène à un facteur 1,3. Cette situation de symbiose homme-microbes est commune à l'ensemble du monde animal et végétal : il a donc fallu que se mette en place tout au long de l'évolution une relation eucaryotes-procaryotes complexe, affinée, diversifiée, complexifiée par des pressions sélectives réciproques. Le rôle du microbiote est multiple : effet de barrière contre la colonisation par les agents pathogènes, effet de maturation sur le système immunitaire, mais aussi sur la peau elle-même, apport métabolique et nutritionnel majeur par la mise à disposition d'une capacité inexistante chez les mammifères d'hydrolyse des sucres végétaux complexes, de production de nutriments comme les acides gras à chaînes courtes et de certaines vitamines.
- [0004] Le domaine de l'invention prend en considération de façon associée deux partenaires symbiotiques trop longtemps considérés de façon dissociée : l'organe « peau » et le microbiote, longtemps appelé « flore cutanée ».
- [0005] La « flore cutanée » constitue la partie externe du microbiote de l'organisme humain (avec le microbiote du tube digestif -le plus important en biomasse-, et des cavités orales, nasales, auriculaires..., et vaginales chez la femme). Cette flore joue un rôle barrière vis-à-vis des agressions extérieures physiques, chimique et biologiques), et interagit avec l'organisme hôte en fonction des sites, de façon générale via les cellules du système immunitaire. De manière générale, la biodiversité bactérienne limite le risque de colonisation de la peau par une bactérie pathogène et constitue une protection contre l'inflammation de la peau.
- [0006] En raison de la taille microscopique des organismes qui la composent, la microflore humaine est invisible à nos yeux. La peau d'un adulte héberge en moyenne soit 1 millions de bactéries par cm² de peau, de plus de 500 espèces différentes. La peau supporte et entretient naturellement son propre « micro-écosystème ». Celui-ci se forme à la naissance, puis évolue jusqu'à la mort. Le microbiote cutané est installé physiquement à la surface, c'est un consortium de microbes organisés en biofilm, il

s'alimente à la fois de molécules et de composés excrétés par la peau elle-même, et de composés sécrétés par des communautés de microorganismes plus ou moins symbiotes, principalement des bactéries organisées en biofilm. La composition du microbiote cutané varie selon les individus, leur âge, leur sexe, leurs activités, leur comportement et l'environnement. Le biofilm cutané se renouvelle constamment, pour s'adapter à la desquamation naturelle et à l'érosion différenciée de la peau, ainsi qu'aux pratiques d'hygiène corporelle (qui ne doivent pas être excessives pour protéger les fonctions « barrière » de la peau, ni réduire la diversité du microbiote qui protège de l'inflammation). De plus, il évolue avec l'âge. Chez l'enfant, le biofilm bactérien est différent selon le mode d'accouchement : Par voie génitale, l'enfant sera colonisé par une communauté similaire au microbiote vaginal de la mère alors que par césarienne ce sera par une communauté similaire au microbiote cutané. Après 1 mois, les profils des communautés cutanées se modifient régulièrement pour que graduellement se mettent en place les spécificités taxonomiques (virus, bactéries, levures, champignons, et même acariens) des différents sites différenciés sur le corps humain : sites externes sur la peau (face, cuir chevelu...), les cavités (orale, nasale... vaginale), et sites internes (tube digestif principalement). Une étude récente (Huang, 2020) a même déterminé quelle région du corps (tube digestif, cavité orale, peau) du microbiome pourrait le plus précisément prédire l'âge et a constaté que la peau était la meilleure, donnant en moyenne des prédictions précises à 4 ans. L'importance du niveau de symbiose entre le microbiote et la peau selon l'âge de plus en plus documentée (Kim, 2019 ; Trojahn, 2015), confirmant la nécessité de s'assurer d'une part que les produits cosmétiques appliqués sur la peau soient bien compatibles avec le microbiote résident, d'autre part qu'il peut être judicieux de suivre l'évolution de la symbiose homme-microbiote tout au long d'une vie.

[0007] Le microbiote joue un rôle dans l'odeur de la peau humaine, qui évolue aussi au long de la vie. La production des odeurs peut provenir de la dégradation des composés de la sueur tels que les acides gras volatiles ou les stéroïdes odorants (James *et al.*, FEMS Microbiology Ecology, 2013), avec l'implication de certains genres bactériens comme *Corynebacterium* et de souches affiliées à *Streptococcus*. Participent aussi à l'apparition des odeurs corporelles des acides gras courts, tels que l'acide caprilique, caprique, valérianique ou l'acide propionique, produits de dégradation des acides aminés et des acides gras à longue chaîne carbonée issus du sébum par les bactéries du genre *Brevibacterium* et *Propionibacterium* ; l'acide propionique donne l'odeur de noisette de la peau à basse concentration (typiquement après une douche) ou l'odeur de fromage de la peau sale à forte concentration. Ces odeurs corporelles varient en fonction du sexe, de l'âge ou du cycle menstruel.

[0008] Le biofilm cutané joue un rôle tantôt positif, tantôt négatif. L'installation d'un mi-

crobiote commensal sur la peau correspond à une colonisation, des groupes de microorganismes ayant un rôle protecteur contre d'autres microorganismes pathogènes, ce qui correspond à une infection, peuvent être identifiés par des techniques d'analyses par séquençage nouvelle génération. Il a été décrit par exemple dans les cas d'infections de plaies (cas extrême où la peau présente une discontinuité, une brèche, au lieu d'une surface homogène et continue) des groupes de bactéries appelés « pathogroupes » (*Proteus*, *Morganella*, *Anaerococcus* et *Peptoniphilus*) dont la présence est corrélée avec des plaies se dégradant, ne cicatrisant pas (Dunyach-Rémi et al. 2020). A contrario, toujours dans les cas d'infections de plaies, des bactéries ont été identifiées comme exerçant une activité antimicrobienne contre des pathogènes (Nakatsuji et al. , 2017), ou réduisant la virulence de pathogènes (Ngba Essebe et al., 2017), protégeant ainsi l'hôte et à l'origine d'une notion de « flore positive ».

- [0009] Le microbiote résident sur la peau est invisible en dehors des cas où il provoque des réactions cutanées du système immunitaire, par exemple des boutons d'acné liés à la prolifération de la bactérie *Cutibacterium acnes*, des rougeurs liées à un état inflammatoire d'eczéma ou dermatite atopique exacerbées par l'installation de la bactérie *Staphylococcus aureus*... Il existe aussi une corrélation entre des taches sur la peau et la présence de certains microorganismes, par exemple des genres *Kocuria* et *Aerococcus* (Zanchetta et al., 2022).
- [0010] La microscopie a longtemps été la principale voie d'observation du microbiote cutané. Les progrès des techniques biomoléculaires ont ouvert de nouveaux champs d'étude via la génomique, la génétique moléculaire, la métagénomique, le séquençage haut débit et la « culturomique ». Cette approche, via le séquençage direct de l'ADN présent dans l'échantillon, permet une description génomique du contenu de l'échantillon, mais aussi un aperçu du potentiel fonctionnel d'un environnement. Pour étudier des échantillons métagénomiques, les biologistes recourent aux technologies de séquençage haut-débit. Les séquences d'ADN obtenues sont ensuite analysées par des techniques bioinformatiques. Les études métagénomiques nécessitent une logistique d'acheminement de l'échantillon prélevé sur la personne en général avec un simple coton-tige vers le laboratoire d'analyse qui lui-même doit être équipé d'un parc de matériel pour l'extraction du matériel génomique (ADN) et son séquençage.
- [0011] Pour révéler la présence de ces microorganismes installés en biofilm et caractéristiques d'un état de la peau, il est aussi possible d'utiliser les marqueurs biologiques, des molécules présentes à la surface des membranes, des molécules d'adhésion aux cellules de la peau, des molécules sécrétés (exopolysaccharides, ADN, protéines...) pour constituer la matrice du biofilm. Ces marqueurs biologiques peuvent être prélevés sur la personne et immédiatement analysés avec des techniques d'immunochromatographie en flux latéral (Lateral Flow Immuno-Assay, LFIA).

- [0012] Ainsi, les microorganismes pathogènes peuvent être distingués des commensaux en se basant sur les marqueurs moléculaires associés aux agents pathogènes (en anglais : pathogen-associated molecular patterns, PAMP). Ces marqueurs dits « de virulence » sont les plus documentés, décrits dans la littérature. Ce sont des molécules sécrétées par exemple la protéine Leucocidine de Pantone-Valentine de *Staphylococcus aureus*, mais aussi, avec un degré moindre de virulence, des porphyrines produites par *Cutibacterium acnes*, des molécules fluorescentes visibles sous éclairage Ultra-Violet (lampe de Wood), qui induisent l'agrégation de *Staphylococcus aureus* et l'expression de molécules pro-inflammatoires par les kératinocytes (IL-6, IL-8, prostaglandinesE2, TBF-alpha...).
- [0013] D'autres marqueurs sont caractéristiques de l'installation naturelle en biofilm des microorganismes à la surface de la peau et dans le conduit du follicule pilosébacé (voir plus loin). De façon générale, les microorganismes interagissent avec une famille de protéines de la peau appelées les « extracellular matrix » (ECM)-components ou composés de la matrice extra-cellulaires : plasminogène, fibronectine, laminine ou mucine. Pour cela, des protéines d'adhésions sont utilisées avec, pour les bactéries gram positive (simple membrane) : des adhésines de la famille Bap, des pili de type 4 (important pour l'installation précoce du biofilm), des SAATs (Self-associating auto-transporters, promoteur de l'agrégation entre bactéries porteuses de SAATs), des intimines/invasines... et pour les bactéries gram négatives (double membrane – LPS) : des adhésines de la famille Bap exhibant un domaine C-terminal LPXTG, des IMPs (Inner-membrane proteins), des pili de type 3 et 4...
- [0014] Par exemple pour *Cutibacterium acnes*, bactérie commensale pouvant devenir un pathogène opportuniste et provoquer l'acné. Cette bactérie peut former un biofilm soit au niveau des follicules pilosébacés soit au niveau des kératinocytes, grâce à des protéines présentes à la surface de la membrane bactérienne, comme des « CAMP factors (Christie-Atkins-Munch-Petersen factors), des sialidases, des dermatan-sulphate adhesines, des endoglycocéramidases, des chaperonines GroEL », un « SH3 domain-containing lipoprotein », une protéine de type pili/fimbriae Flp, et surtout une protéine DsA1, faisant partie de la famille des MSCRAMMs (molecular surface components recognizing adhesive molecules of the matrix), très immunogène et provoquant une forte réponse immunitaire chez les personnes atteintes d'acné.
- [0015] Le genre bactérien *Staphylococcus* joue un rôle majeur au sein du microbiote de la peau avec l'espèce *Staphylococcus epidermidis* qui est commensale et rarement pathogène, et l'espèce *Staphylococcus aureus*, commensale avec un portage nasal sain chez 30% de la population, pouvant devenir pathogène en particulier dans les cas de Dermatite atopique ou eczéma. Le genre *Staphylococcus* utilise aussi pour s'installer en biofilm sur la peau des MSCRAMMs comme les protéines de la famille Clf-Sdr,

avec la Bbp (bone sialoprotein-binding protein), la FnBPs (fibronectin-binding proteins), et la CNA (collagen adhesion), et récemment a été identifiée pour *S. epidermidis* la protéine SesJ (Arora 2020). Pour *S. aureus*, c'est l'aureusimine (phevalin) qui semble être un marqueur du phénotype biofilm. Notons que le genre *Staphylococcus* sécrète aussi une matrice extracellulaire « polysaccharidique intercellular adhesin » (PIA). Les autres principaux représentant du microbiote cutané sont (Byrd et al., 2018) soit communs à tout type de peaux : *Corynebacterium tuberculoearicum*, *Malassezia Globosa* ; soit plutôt caractéristiques des peaux grasses, ou sèches ou humides : *Staphylococcus capitis*, *Staphylococcus hominis*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis*, *Micrococcus luteus*, , *Corynebacterium simulans* ; ou alors des microorganismes caractéristiques des peaux âgées : *Dermacoccus*, *Actinomyces* ; des peaux jeunes avec les Bacteroidetes tels: *Bacteroides*, *Alistipes*, *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Sphingobacterium*, ou avec les Firmicutes tels : *Lactobacillus*, *Aerococcus*, *Oscillospira*, *Ruminococcus*.

- [0016] Les organismes souvent considérés comme non pathogènes peuvent causer une infection chez des hôtes dont l'immunité est affaiblie ou qui ont récemment reçu un traitement antimicrobien. Lorsque les réponses immunitaires sont altérées, comme c'est souvent le cas de personnes atteintes de diabète, ils peuvent ne pas prévenir la colonisation par des bactéries pathogènes dans le tissu lésé. Dans les plaies chroniquement infectées, de nombreuses bactéries forment un biofilm, dans lequel ils se fixent et se développent de manière irréversible sur une surface, produisent des polymères extracellulaires qui facilitent la formation de la matrice et modifient leur phénotype.
- [0017] De façon générale, 3 bactéries sont majoritairement rencontrées : 1) *Staphylococcus epidermidis*, bactérie commensale de la peau avec un rôle barrière face au *Staphylococcus aureus* ; 2) *Cutibacterium acnes*, commensal de la peau, en général anodin, à l'origine cependant d'épisodes d'acné selon l'âge (puberté), l'imprégnation hormonale, une immuno-dépression (transitoire, iatrogène...) ; 3) *Staphylococcus aureus*, bactérie commensale, portée de façon asymptomatique chez 30% des individus (portage nasal), à l'origine de pathologies diverses au niveau de la peau (impétigo, dermatite atopique...).
- [0018] Pour donner un aperçu général du domaine de l'invention, on peut indiquer que les affections cutanées sont les grandes oubliées de la santé publique car elles engagent rarement le pronostic vital. Elles affectent pourtant la qualité de vie de 16 millions de Français avec des répercussions psychologiques souvent sous-estimées, liées aux imperfections de la peau (tâches, rougeurs, boutons...) que les personnes atteintes atténueront ou masqueront par l'utilisation de produits cosmétiques.
- [0019] En France, 1 personne sur 3 souffre d'une maladie de peau, selon une vaste étude épidémiologique (étude "Objectifs Peau" réalisée en 2016 sur un échantillon repré-

sentatif de 20 012 personnes âgées de plus de 15 ans) réalisée par la Société Française de Dermatologie (SFD). Et 80% des patients concernés en cumulent même deux. Et les femmes sont davantage touchées que les hommes : 33% d'entre elles ont une pathologie dermatologique, contre 28% de la gent masculine.

- [0020] Ces chiffres alarmants sont bien supérieurs aux estimations précédentes. Le stress de la vie moderne et la pollution croissante jouent sûrement un rôle non négligeable dans l'augmentation du nombre de troubles cutanés.
- [0021] Parmi les affections cutanées les plus fréquentes, l'acné arrive en tête de liste (3,3 millions de Français en souffrent même une fois la puberté passée, suivie de l'eczéma (2,5 millions de malades) et du psoriasis (2,4 millions). Les maladies du cuir chevelu (hors pelade), les mycoses et les maladies des ongles arrivent derrière, avec respectivement 2,3 millions, 2,2 millions et 2,1 millions de Français touchés.
- [0022] Pour toutes ces affections se combinent des critères individuels affectant l'état de la peau (susceptibilités génétiques – mutations de gènes codant pour des protéines de la peau comme la filaggrine, système immunitaire défaillant... -, mode de vie – stress, cabines UV... -, alimentation...) et des critères affectant le microbiote (naissance par césarienne, hygiène, environnement...). Concernant l'effet du rayonnement Ultra-Violet, une étude pilote (Burns, 2019) montre une augmentation du phylum *Cyanobacteria*, une diminution des familles *Lactobacillaceae* et *Pseudomonadaceae*, une réactivité des différents selon les UVA et les UVB, et un potentiel rôle protecteur et anti-inflammatoire des *Lactobacillaceae*. Là aussi un test permettant d'évaluer l'effet de l'exposition aux UV sur la symbiose homme-microbiote peut permettre d'améliorer le conseil d'une part en produits réhydratants la peau et régénérant/rééquilibrant le microbiote (conseil curatif) et d'autre part en crème solaire protectrice (conseil préventif).
- [0023] C'est la raison pour laquelle les sociétés cosmétiques s'intéressent depuis quelques années à la connaissance du microbiote cutané pour offrir à leurs clients des compositions adaptées et personnalisées permettant de préparer des crèmes actives à la fois adaptées à la physiologie de la peau (grasse, sèche... irritée, avec un certain niveau d'inflammation...) et aussi les mieux adaptées à l'état du microbiote cutané de chaque client, à une période donnée car on s'est aperçu que les effets revendiqués des crèmes anti-rides et anti-âge et de différents produits cosmétiques pour les soins de la peau reposent, ont des effets et une efficacité qui ne sont pas similaires sur tous les individus ni même, pour un même individu, à toutes les périodes. Différentes personnes et différents types de peau réagissent différemment aux produits cosmétiques, d'où le besoin de dispositifs qui peuvent déterminer les effets ou la réactivité d'un individu à un type particulier de produit de soin de la peau. Il est pour cela nécessaire de disposer d'une méthode d'analyse fiable et simultanée de l'état de la peau et du microbiote cutané.

- [0024] Le deuxième membre de la symbiose concerné par le domaine de l'invention est l'organe « Peau » : la partie exposée de la peau s'appelle la couche cornée (*stratum corneum*), une superposition de cellules anucléées et complètement kératinisées, les cornéocytes, formant des lamelles très allongées (ROBERT *et al.* Dermopharmacologie, Edisem, 1985). Son épaisseur est d'environ 10 µm sauf au niveau de la paume des mains et de la plante des pieds où il est environ 10 fois plus épais.
- [0025] Cette couche cornée est le produit final externe de cet organe, la peau, couvrant en moyenne 1,5 à 2m². La peau est structurée en 3 couches de tissus : l'hypoderme (la plus profonde), le derme (intermédiaire) et l'épiderme (la plus superficielle).
- [0026] L'hypoderme forme la couche la plus profonde de la peau. C'est un tissu conjonctif richement vascularisé qui contient beaucoup de tissu adipeux, lui-même constitué de cellules nommées adipocytes. Cette couche est dotée d'une grande élasticité capable de bien absorber les chocs et de plus, elle permet d'isoler le corps thermiquement.
- [0027] Le derme correspond à la couche intermédiaire. C'est aussi un tissu conjonctif qui va venir soutenir l'épiderme. Il est parcouru par un riche réseau de vaisseaux capillaires et est essaimé de nombreuses terminaisons nerveuses. Il se divise en deux : le derme papillaire (superficiel) et le derme réticulaire (profond et moyen). Les fibroblastes disséminés dans la couche dermique synthétisent les fibres de collagène et les fibres élastiques qui baignent dans une sorte de gel qu'on appelle la matrice extracellulaire constituée d'eau et de glycoprotéines. Celle-ci joue le rôle de réservoir hydrique qui peut être affecté par l'environnement (temps sec en hiver), ou la surexposition aux rayonnements Ultra-Violets (bains de soleil, cabines UV...) provoquant une évaporation accrue. On y trouve aussi des cellules du système immunitaire telles que les macrophages, les cellules dermiques dendritiques, les mastocytes, les lymphocytes et des cellules en cours de maturation. La riche vascularisation de cette couche supporte plusieurs fonctions. Elle permet à la première ligne de défense de l'organisme de répondre efficacement à tout signal de danger, et particulier avec le microbiote lors d'une dysbiose ou lorsqu'une plaie crée une brèche dans la couche supérieure externe protectrice. L'épiderme dépourvu de capillaires y puise l'énergie et les nutriments nécessaires pour assurer son activité cellulaire. Elle participe de façon importante à la thermorégulation à côté des glandes sudoripares. Les glandes sudoripares et les follicules pilosébacés sont des annexes épidermiques implantées dans le derme.
- [0028] L'épiderme est la structure la plus externe, non vascularisée, elle se divise en 5 couches superposées (interne à externe) :
- [0029] - La couche basale (*stratum basale*) permet la régénération de la peau grâce à des divisions cellulaires (la quasi-totalité des cellules sont en mitose) qui vont permettre aux cellules produites de migrer en direction de la couche la plus externe. Cette couche est composée en majeure partie de kératinocytes.

- [0030] - La couche épineuse (*stratum spinosum* ou couche de Malpighi) est la couche la plus épaisse de l'épiderme. Elle est composée de kératinocytes.
- [0031] - La couche granuleuse (*stratum granulosum*), plus mince, est formée de kératinocytes qui rentrent en apoptose. Leur cytoplasme comprend moins d'organites cytoplasmiques et de chromatine nucléaire. Les cellules sont plus aplaties et se caractérisent par la présence de grains de kératohyaline et de granules lamellaires (ou corps d'Odland).
- [0032] - La couche claire (*stratum lucidum*) possède des cellules anucléées (leurs noyaux ont disparu). Les grains de kératohyalines se transforment en une protéine appelée filaggrine.
- [0033] - La couche cornée (*stratum corneum*), la plus superficielle, se compose de cellules mortes, de forme aplatie, les cornéocytes. Elles sont dites mortes mais elles demeurent biologiquement actives. Elles ont perdu tous leurs organites, remplacés par des filaments denses de kératine et elles sont liées entre elles par un ciment interlipidique formé d'acide gras, de cholestérol et de céramides ainsi que des cornéodesmosomes. Ce ciment se forme à partir des corps d'Odland que l'on retrouve dans les couches précédentes. Ces cellules jointives et bien tassées forment un revêtement imperméable à la peau et jouent un grand rôle de défense.
- [0034] Le processus de kératinisation assure un renouvellement continu de la peau, de la couche basale jusqu'à la couche cornée, en 3 – 4 semaines. Les différents éléments la composant vont se retrouver à la surface et vont constituer la surface au niveau de la couche cornée sur laquelle le microbiote s'installe en biofilm. Les marqueurs biologiques de l'état de la peau vont s'y retrouver et permettre d'évaluer si elle présente un état sain, une imprégnation hormonale (puberté, cycle menstruel...), une inflammation (d'origine endogène ou exogène), une agression (physique : rayonnements Ultra-Violets, pollution ; chimique : produits d'hygiène, produits cosmétiques ; mécanique : abrasion lors d'un gommage, d'une exfoliation ou d'un peeling...).
- [0035] La couche cornée est le premier rempart entre le corps humain et le monde extérieur, elle concentre le rôle de barrière contre la pénétration d'agents extérieurs, permettant d'éviter le passage d'agents délétères, microbiens ou chimiques à l'intérieur de notre corps. En cas de défaillance de ce premier niveau de protection, un autre mécanisme de protection est mis en jeu faisant intervenir les cellules du système immunitaire.
- [0036] La couche cornée le premier niveau de l'interactome, en contact direct, où le microbiote va s'installer en biofilm en utilisant des protéines d'adhésion et sécréter des exopolysaccharides lui permettant de persister sur la peau.
- [0037] Lorsque la barrière physique de la couche cornée n'opère plus parce qu'éliminée physiquement par abrasion, par exemple en surface suite à un gommage ou d'une exfoliation prononcée ou un peeling, ou plus profondément en cas de plaie traumatique ou

chirurgicale, c'est le système immunitaire cutané qui intervient. Il a pour but de protéger l'hôte et de restaurer si besoin l'intégrité de la peau. Il se divise en deux types : en premier lieu l'immunité innée, ensuite l'immunité adaptative ou spécifique. Dans les deux cas, les premiers gardiens sont les kératinocytes car ce sont les plus nombreux (90% des cellules de la peau). Ils jouent le rôle de sentinelles immunitaires et reconnaissent les agents étrangers grâce à des récepteurs PRR (pattern recognition receptor) de la famille des Toll-like, qui, une fois la reconnaissance réalisée, synthétisent des médiateurs chimiques (cytokines et chimiokines). Ils initient la cascade inflammatoire. D'autre part, les kératinocytes sont aussi capables de produire des peptides antimicrobiens qui vont inhiber des microorganismes comme *Staphylococcus aureus*, *Candida Albicans*.

[0038] L'épiderme contient 2 types de cellules immunitaires. Les cellules dendritiques, ou cellules de Langerhans, formées de pseudopodes qui vont leur permettre d'accrocher l'élément pathogène et de le phagocyter. On appelle ces cellules des CPA : cellules présentatrices d'antigènes. Une fois l'élément pathogène ou antigène phagocyté, la cellule dendritique va sécréter des médiateurs chimiques (prostaglandines ou chimiokines) qui vont entraîner une vasodilatation locale et vont donc augmenter l'afflux sanguin et le recrutement local d'autres cellules de l'immunité comme les polynucléaires et les macrophages. Les cellules immunitaires du derme (cellules dendritiques dermiques, macrophages, mastocytes) sont également mobilisées sur le site concerné. L'épiderme héberge aussi des lymphocytes T qui ont été activés au niveau des ganglions lymphatiques grâce aux CPA. Ainsi, après l'activation des CPA, s'en suit une cascade de multiplications, de différenciations qui doit aboutir in fine à une destruction des agents pathogènes. Ces marqueurs biologiques peuvent être utilisés pour évaluer l'état de la peau en surface, en particulier le niveau d'inflammation, qui peut être chronique et devient de plus en plus critique avec l'âge, on parle alors « d'inflammaging ».

[0039] De façon plus exhaustive, les marqueurs biologiques de l'inflammation de la peau sont les interleukines IL-1beta, IL-4, IL-6, IL-8, IL-11, IL-12, le Facteur Nécrosant de Tumeur (en anglais Tumor-Necrosis-Factor-alpha, TNF-alpha), l'Interféron-gamma (IFN-gamma), le facteur stimulant les colonies de granulocytes et de macrophages (en anglais Granulocytes Macrophages Colony-Stimulating Factor, GM-CSF), le Facteur de Croissance Transformant-beta (en anglais Transforming Growth Factor-beta, TGF-beta). Sans être directement considérées comme marqueurs de l'inflammation, il faut aussi mentionner les Immunoglobulines E (IgE) dont le niveau sérique est élevé dans les cas d'eczémas – dermatites atopiques.

[0040] D'autres cellules de la peau interviennent dans le maintien d'un état sain face aux agressions du soleil ou à l'exposition aux radiations Ultra-Violettes (par exemple en

cabines utilisant des lampes UV). Ce sont les mélanocytes présents dans la peau qui jouent un rôle de protection contre les radiations ultra-violettes (UV). Lors de l'exposition de la peau aux UV, les kératinocytes sécrètent l'hormone mélanotrope ou α -MSH (α -mélanocyte stimulating hormone) par maturation d'une pro-hormone, la POMC (proopiomélanocortine). Cette hormone α -MSH va venir s'attacher à un récepteur membranaire appelé MCR (melanocortin receptor) exprimé par les mélanocytes et enclencher la biosynthèse de mélanine, à l'origine du bronzage de la peau. Le matériel génétique des cellules épidermiques soumises aux radiations UV devient ainsi protégé.

- [0041] La description de l'organe « peau » se complète avec les structures annexes incluses au sein des différentes couches : les poils et les glandes sébacées et sudoripares.
- [0042] Les poils couvrent presque intégralement le corps humain avec des tailles variables. Ils jouent un rôle très important dans la thermorégulation. Ils sont ancrés au niveau du derme dans ce qu'on appelle le follicule pileux.
- [0043] La glande sébacée appendue au poil est une glande intradermique. Elle synthétise le sébum constituant majeur avec la sueur du film hydrolipidique qui protège la peau et évite son dessèchement. Cette glande interagit avec le système immunitaire avec ensuite un impact sur le microbiote comme nous le verrons plus loin.
- [0044] La glande sudoripare sécrète la sueur et, par ce processus, permet à l'organisme de lutter contre la chaleur. En effet lorsque la température du corps s'élève par exemple pendant une séance de sport ou quand on est malade, la sueur émise s'évapore à la surface de la peau : ce mécanisme élimine des calories et contribue avec la vasodilatation à refroidir le corps.
- [0045] Parmi ces annexes, les glandes sébacées jouent un rôle central en conditionnant le pH de la peau, son caractère plus ou moins occlusif et donc l'accès à l'oxygène (impact sur les capacités aérobies ou anaérobies des microorganismes du microbiote), des effets antioxydant, des effets pro et/ou antimicrobiens (variables en fonctions des espèces de microorganismes), et le transport d'hormones/phéromones. Le sébum est composé de triglycérides, diglycérides, d'acides gras libres, d'esters de cire, de squalènes, et de cholestérols.
- [0046] La symbiose homme-microbiote au niveau de la peau est d'autant plus complexe qu'il a été récemment décrit que des cellules immunitaires dites « lymphoïdes innées » (Innate Lymphoid Cells, ILC) jouent un rôle régulateur sur les glandes sébacées (Kobayashi et al., 2019). Ces ILCs (en produisant des « TNF receptor ligands ») limitent la croissance des glandes sébacées. En cas de déficience de ces ILCs, on observe une hyperplasie des glandes sébacées ayant pour conséquence une augmentation de la production de lipides antimicrobiens, en particulier l'acide palmitoléique et l'acide oléique, avec un impact sur l'équilibre du microbiote cutané. En

effet, l'acide palmitoléique inhibe la croissance des cocci aérobies gram positives telles *Staphylococcus aureus* et *Staphylococcus xylosus*, et pas la croissance d'anaérobies gram négatives comme les espèces *Bacteroides*. Associé à la surproduction d'acide oléique, cela crée un film occlusif, c'est-à-dire des conditions anaérobies en défaveur des cocci gram positives. Ceci peut conduire à ne pas recommander des produits cosmétiques contenant ces deux acides gras dans les cas où des marqueurs biologiques corrélés avec le profil avec « peau grasse + présence élevée de *Staphylococcus* » auront été caractérisés avec le test.

- [0047] La symbiose homme-microbiote est aussi organisée à d'autres niveaux que celui de l'épiderme-stratum corneum mais aussi de façon plus large en fonction de différents facteurs endogènes comme la région corporelle (zone T du visage, cuir chevelu, aisselles..., l'âge, l'imprégnation hormonale (puberté, cycle menstruel...), une inflammation (d'origine endogène – dermatite atopique, psoriasis...-, ou exogène – contact avec un produit irritant -), une agression (physique : rayonnements Ultra-Violets, pollution ; chimique : produits d'hygiène, produits cosmétiques ; mécanique : abrasion lors d'un gommage ou exfoliation ou d'un peeling...).
- [0048] Les régions corporelles sont segmentées en trois zones caractérisées par des paramètres physicochimiques différents :
- [0049] • Les zones humides :
- [0050] Les zones dites « humides » sont caractérisées par une forte densité de glandes sudoripares. L'humidité est due à la sécrétion de sueur par ces glandes. La sueur est composée principalement d'eau, de sels minéraux, d'acide urique et d'urée. Les zones concernées du corps humain sont : le creux axillaire, le périnée, les plis interdigitaux, les paumes des mains et les aisselles au niveau desquelles on relève une forte colonisation par les micro-organismes : 10^5 - 10^8 bactéries/cm².
- [0051] • Les zones lipidiques :
- [0052] Les zones dites « lipidiques » sont liées à une forte présence de glandes sébacées. Ces glandes secrètent le sébum qui s'écoule vers la surface de la peau sous forme de film lipidique. La tête, notamment avec les joues, le front, le nez, le menton, le tronc et le haut du dos, constituent les principales zones lipidiques dont la concentration en micro-organismes est de l'ordre de 10^6 à 10^7 bactéries/cm².
- [0053] Les zones sèches :
- [0054] Les zones dites « sèches » sont pauvres en glandes sudoripares et sébacées et contiennent donc moins de sécrétions de sueur et de sébum.
- [0055] Le dos des mains et la face externe des membres sont les principales zones sèches. Ces dernières ont la concentration en micro-organismes la plus faible : 10^3 - 10^4 bactéries/cm².
- [0056] Le pH de la peau est de 5,5 en moyenne. Il est dû au film hydrolipidique qui recouvre

toute la surface de la peau, produit des sécrétions des glandes sudoripares et des glandes sébacées. L'acidité relative de ce film permet notamment d'assurer une protection vis-à-vis des germes pathogènes. Le pH cutané s'avère être un paramètre très important à maintenir pour l'homéostasie cutanée et l'équilibre du microbiote installé en biofilm. Au cours de nombreuses pathologies, eczéma – dermatite atopique, psoriasis, acné..., il se trouve d'ailleurs modifié et il a été documenté une altération du pH dans des cas de dermatite atopique corrélée à la présence de *Staphylococcus aureus* (Rippke et al., 2004).

Etat de la technique

- [0057] On connaît dans l'état de la technique différentes solutions concernant l'analyse du microbiote cutané.
- [0058] Le document WO 2014184151 A1 décrit un dispositif de diagnostic « point of care » basé sur la technologie d'analyse à flux latéral et permet une analyse non invasive de facteurs sécrétés et diffusibles à partir de la surface de la peau. Ce document décrit en particulier un kit de diagnostic pour détecter la présence ou la quantité d'un ou plusieurs analytes dans un échantillon à tester prélevé sur une surface cutanée d'un mammifère, caractérisé en ce que le kit de diagnostic comprend :
 - [0059] a) un insert séparé pour un dispositif à écoulement latéral comprenant une membrane, la membrane ayant une épaisseur, une largeur et une longueur définies, éventuellement fixée à un support rigide, et l'insert séparé étant configuré pour obtenir l'échantillon à tester (analytes),
 - [0060] b) un dispositif de dosage à écoulement latéral configuré pour accepter l'insert séparé, et
 - [0061] c) un élément de fixation configuré pour attacher de manière amovible l'insert séparé à la surface de la peau d'un mammifère.
- [0062] La demande de brevet US2022/0178943 propose un kit pour détecter la présence ou la quantité d'un ou plusieurs analytes à tester dans un échantillon à tester obtenu à partir d'une surface cutanée d'un mammifère, le kit comprenant :
 - [0063] a) un dispositif d'analyse à flux latéral comprenant une cassette comprenant un ou plusieurs éléments poreux formant un ensemble de supports poreux, dans lequel ladite cassette est configurée pour recevoir et maintenir un tampon de prélèvement d'échantillon, dans lequel ledit tampon de collecte d'échantillons est configuré pour être en contact avec ledit ensemble de supports poreux lorsque ledit tampon d'échantillon est inséré dans ladite cassette,
 - [0064] b) un emballage-coque, dans lequel ledit emballage-coque contient une solution tampon, dans lequel ladite cassette est configurée pour recevoir ledit emballage-coque, et

- [0065] c) un tampon de collecte d'échantillon configuré pour être utilisé pour collecter ledit échantillon de test.
- [0066] Le document WO 2014184151 A1 décrit un dispositif de diagnostic « point of care » qui est basé sur la technologie d'analyse à flux latéral et permet une analyse non invasive de facteurs sécrétés et diffusibles à partir de la surface de la peau.
- [0067] La demande EP3691788A1 concerne également un kit de diagnostic pour détecter la présence ou la quantité d'un ou plusieurs analytes de test dans un échantillon de test obtenu à partir d'une surface cutanée d'un mammifère, le kit de diagnostic comprenant :
- [0068] a) un tampon séparé configuré pour être utilisé pour collecter ledit échantillon de test, ledit tampon comprenant un tampon de prélèvement d'échantillon attaché à un élément de support,
- [0069] b) un dispositif d'analyse à flux latéral comprenant un ou plusieurs éléments poreux, dans lequel ledit dispositif d'analyse à flux latéral est configuré pour accepter et maintenir ledit écouvillon séparé, dans lequel ledit tampon de prélèvement d'échantillon est configuré pour faire partie d'un ensemble de support poreux lorsque l'écouvillon séparé est inséré dans ledit dispositif d'analyse à écoulement latéral.
- [0070] Le brevet EP2941195B1 propose un patch dermique pour retenir sélectivement un ou plusieurs analyte(s) du corps d'un sujet comprenant, par exemple en séquence : une couche de membrane pour retenir un ou plusieurs analyte(s) du corps d'un sujet, avec un premier et un second côté, le premier côté étant adapté pour être en communication fluide avec la peau du sujet ; éventuellement des moyens de maintien pour fixer la couche de membrane en place; une couche adhésive; et une couche de support ; dans lequel entre la couche de support et la couche de membrane se trouve une couche expansible pour appliquer une pression sur la couche de membrane présente une surface de 1 cm² ou moins pour réduire la zone d'échantillonnage et les éventuels effets d'hétérogénéité d'une zone d'échantillonnage trop grande, ainsi que la vulnérabilité du patch au mouvement du corps affectant la zone où le patch est appliqué. Dans certains modes de réalisation, la couche de membrane a une surface de 0,5 cm² ou moins, telle que moins de 0,2 cm². Une fois le timbre cutané retiré, il peut être expédié à un laboratoire pour être traité. Il est également possible que le patch puisse être traité sur site, par exemple dans un cabinet de dermatologue ou une clinique de beauté à l'aide d'un équipement de traitement automatisé. Dans certains modes de réalisation, la membrane est configurée pour fournir une lecture directe ou une lecture après l'ajout d'un fluide de développement. Ce brevet rappelle qu'il existe de nombreuses manières d'analyser la membrane pour la liaison de l'analyte aux molécules d'affinité. Dans certains modes de réalisation, l'événement de liaison sera visualisé en utilisant un dosage immunologique colorimétrique (tel qu'une analyse ELISA) avec ou sans ampli-

fication, tel qu'en utilisant un dosage biotine-streptavidine. L'intensité des sections de capture correspond à la concentration de l'analyte, et une telle intensité peut être déterminée quantitativement en balayant les membranes et en utilisant un logiciel d'analyse. Dans certains modes de réalisation, des techniques de détection à base de fluorescence, d'immuno-or ou de nanoparticules sont utilisées pour quantifier les analytes liés.

[0071] Le brevet EP2941195B1 décrit un autre exemple de patch dermique qui est configuré pour être fixé de manière amovible à la peau d'un sujet et, en étant en contact avec la peau, retenir un ou plusieurs analytes. Typiquement, un revêtement pelable, tel qu'une doublure antiadhésive siliconée, protège la membrane et l'adhésif du patch. La couche de support et la couche adhésive pourraient par exemple être une bande non tissée élastique poreuse avec un adhésif doux. Comme patchs dermiques sont envisagés des patchs de diffusion, des patchs d'osmose, des patchs électriques et tout autre type de patchs à diffusion forcée qui recueilleront différents analytes présents à ou près de la surface de la peau, tels que des médicaments, des métabolites de médicaments, des métabolites, du glucose, des anti-peptides microbiens (AMP), chimiokines, interleukines, facteurs de croissance et/ou hormones. Dans certains modes de réalisation, les analytes sont sélectionnés dans la liste consistant en : peptides antimicrobiens (AMP), chimiokines et interleukines. Dans certains modes de réalisation, le patch dermique est un patch de diffusion, où la diffusion n'est pas imposée.

[0072] La demande WO2019025610 décrit des kits et des procédés de diagnostic basés sur des dispositifs de dosage à écoulement latéral pour détecter la présence ou la quantité d'un ou de plusieurs analytes d'essai dans un échantillon d'essai prélevé sur la peau d'un mammifère.

Inconvénients de l'art antérieur

[0073] Les méthodes utilisées pour récupérer les quantités d'analytes prélevées avec les solutions de l'art antérieur (coton-tige ou swab, bandes adhésives D-Squame ou Sebutape...) et les performances des tests immunochromatographiques à flux latéral nécessitant au minimum 10^4 analytes par millilitres, imposent le recours à des solutions d'analyse génomique avec une étape d'amplification de l'ADN pour obtenir des résultats significatifs.

[0074] Ces solutions ne sont pas totalement satisfaisantes car elles nécessitent après le prélèvement, des interventions complexes (extraction ADN, mise en œuvre de PCR, Q-PCR ou séquençage...), dans un laboratoire de biologie et un personnel expérimenté dans l'utilisation d'équipements destinés à la génomique.

[0075] Elles impliquent pour cela une logistique lourde et des délais de traitement entre le prélèvement et l'analyse génomique.

[0076] En conséquence, le nombre d'études permettant d'évaluer l'impact sur la peau et son

microbiote de produits de soins cosmétiques ou d'hygiène appliqués sur tout ou partie du visage (ou du reste du corps) reste très limité à ce jour (par exemple, selon le site clinicaltrials.gov, en 2017-18, l'étude « The Effect of Skin Cleansers on the Skin Surface Microbiome » dont le sponsor était Mundipharma Manufacturing Pte Ltd a inclus 12 volontaires seulement, avec analyse de leur microbiome cutané par Next Generation Sequencing, pour comparer les effets de 3 produits : 1) 7.5% Povidone-Iodine, 2) 4% chlorhexidine skin cleanser, et 3) Plain non antibacterial soap).

[0077] In fine, les propositions de tests ou analyses du « microbiome » par métagénomique conduisent à générer sur l'application smartphone associée (par exemple : Skin Trust Club, Whatskin?) un listing de microorganismes identifiés à titre documentaire. L'objectif final de la démarche consistant à conseiller des produits cosmétiques ou d'hygiène, qui s'inspirent des renseignements collectés via l'application smartphone lors de la prise de commande du test « microbiome de la peau » (photo du visage permettant d'évaluer des paramètres tels que rides, rougeur..., renseignements déclaratifs comme âge, poids, taille, consommation de tabac, d'alcool, estimation de l'état de la peau -irritée, sèche, grasse-, déclaration de pathologies -acné, eczéma, dermatite atopique, psoriasis...-, etc).

Solution apportée par l'invention

[0078] Afin de remédier à ces inconvénients, la présente invention concerne selon son acception la plus générale :

[0079] Un dispositif de révélation immunologique du complexe peau-microbiote comprenant un support sur lequel est aménagé un puits de transfert destiné à recevoir une solution comprenant les constituants du complexe peau-microbiote, ledit puits débouchant sur une pluralité de N zones portant chacune (i) un réactif de détection et (ii) un réactif de capture, et ledit complexe peau-microbiote étant constitué par des cellules de la peau et des microorganismes et autres éléments constitutifs du microbiote cutané, ledit dispositif comprenant :

- un nombre de zones N supérieur ou égal à 5
- au moins un réactif de détection spécifique d'un biomarqueur de cellules de la peau et au moins un réactif de détection spécifique du microbiote cutané
- lesdits réactifs de détection immunologique comprennent chacun un anticorps spécifique d'un biomarqueur des cellules de la peau ou du microbiote cutané, conjugué à un système de révélation colorimétrique
- lesdits réactifs de capture comprennent chacun un anticorps, fixé audit support dans chacune des zones N, capable de reconnaître ledit biomarqueur présent dans ladite zone N,

[0080] caractérisé en ce que ledit au moins un biomarqueur spécifique du microbiote cutané correspond à un épitope exposé à la surface du microbiote.

[0081] Elle concerne également un kit à usage unique pour la caractérisation de l'état de la peau, un système pour la mise en œuvre d'une recommandation cosmétique personnalisée et une méthode de recommandation cosmétique personnalisée basés sur la caractérisation du complexe peau-microbiote d'un individu et mettant en œuvre le dispositif selon l'invention.

[0082] La présente invention permet ainsi différents types de tests :

- i. Test ponctuel en 15 à 30 minutes (possible en boutique, chez soi à domicile en « Home test »), soit en démarche spontanée (curiosité, hypochondriaque -13% de la population, Ifop2014-), soit en réaction à un évènement (prise de conscience) : utilisation d'un produit cosmétique ou d'hygiène irritant, apparition d'un érythème solaire suite à une exposition prolongée au soleil, ou suite à une séance en cabine UV artificiels, ou encore après un gommage ou une exfoliation ou un peeling trop intense, ou encore diagnostic d'une pathologie de la peau (affections cutanées les plus fréquentes étant l'acné, l'eczéma, le psoriasis, les maladies du cuir chevelu (hors pelade), les mycoses et les maladies des ongles ;
- ii. Des tests répétés, successifs permettant un suivi dans le temps (monitoring) de l'état général de la peau en y associant le microbiote résidant (complexe peau-microbiote), ce qui peut conduire à mieux gérer les expositions au soleil, aux UV artificiels, ou espacer ou atténuer les pratiques de gommage, ou d'exfoliation ou de peeling ;
- iii. Selon le profil obtenu, la proposition de produits adaptés en complétant le conseil « binaire » reliant l'état de la peau à un traitement *ad hoc* (peau sèche = routine d'hydratation, peau grasse = routine exfoliation nettoyante, peau fine et ridée = routine crème de protection et nourrissante...) avec l'information « microbiote » associée : soit compléments « probiotiques » stimulant la peau et/ou le microbiote, soit produits « compatibles » pour éviter un traitement de la peau seule au détriment du microbiote (une campagne de tests desdits produits versus bactéries du microbiote peut permettre de calculer un score de compatibilité), soit produit de soin pouvant améliorer un syndrome désagréable (sensation de peau sèche, grasse, irritée, rougeur etc) ;
- iv. De vérifier la compatibilité des produits utilisés en routine (accessibles à l'application en scannant le code barre des produits constituant cette routine, comme le propose les applications smartphones Yuka, MyLabel etc). De faire évoluer la routine en fonction de l'évolution du complexe peau-microbiote avec l'âge (où la peau devient plus fine), le climat (été chaud et humide versus hiver froid et sec), la pollution etc)

DESCRIPTION DETAILLEE DE L'INVENTION

- [0083] Un premier objet de l'invention concerne un dispositif de révélation immunologique du complexe peau-microbiote comprenant un support sur lequel est aménagé un puits de transfert destiné à recevoir une solution comprenant les constituants du complexe peau-microbiote, ledit puits débouchant sur une pluralité de N zones portant chacune (i) un réactif de détection et (ii) un réactif de capture, et ledit complexe peau-microbiote étant constitué par des cellules de la peau et des microorganismes et autres éléments constitutifs du microbiote cutané, ledit dispositif comprenant :
- un nombre de zones N supérieur ou égal à 5
 - au moins un réactif de détection spécifique d'un biomarqueur de cellules de la peau et au moins un réactif de détection spécifique du microbiote cutané
 - lesdits réactifs de détection immunologique comprennent chacun un anticorps spécifique d'un biomarqueur des cellules de la peau ou du microbiote cutané, conjugué à un système de révélation colorimétrique
 - lesdits réactifs de capture comprennent chacun un anticorps, fixé audit support dans chacune des zones N, capable de reconnaître ledit biomarqueur présent dans ladite zone N,
- [0084] caractérisé en ce que ledit au moins un biomarqueur spécifique du microbiote cutané correspond à un épitope exposé à la surface du microbiote.
- [0085] Le « complexe peau-microbiote » au sens de l'invention, est constitué de deux types cellulaires : cellules de la peau d'origine humaine et microorganismes ; ces deux types cellulaires participent à l'état de la peau en interagissant entre eux. Des phénomènes de symbiose sont observés. Ainsi, en prélevant simultanément les cellules humaines et le microbiote présent à la surface de la peau, on dispose d'un échantillon représentatif d'un état de la peau. Ce complexe contient également d'autres éléments constitutifs du complexe peau-microbiote qui sont sécrétés par les deux types de cellules. D'une part des molécules sécrétées par les cellules de la peau qu'elles soient épidermiques ou immunitaires, mais aussi les sécrétions des microorganismes constitutifs du microbiote.
- [0086] Dans le cadre de la présente invention, le microbiote cutané est analysé en révélant des épitopes exposés à la surface du microbiote. Dans un mode de réalisation particulier de l'invention, l'épitope exposé à la surface du microbiote est associé une protéine présente à la surface d'un microorganisme constitutif du microbiote.
- [0087] Ainsi, le dispositif selon l'invention permet d'analyser la présence de microorganismes, éventuellement de caractériser leur organisation sous la forme biofilm, mais également d'analyser la présence au sein du complexe d'autres éléments dont la présence fournit une information intéressante sur l'état de la peau. Dès lors que ces autres éléments sont immunogènes, il est possible de disposer au sein du dispositif, des

anticorps capables de révéler leur présence.

- [0088] Par « épitopes exposés à la surface du microbiote », on entend les épitopes exposés à la surface des microorganismes via les molécules constitutives de la membrane desdits microorganismes, mais aussi les épitopes formés par les molécules sécrétées comme les exopolysaccharides constitutifs de la matrice du biofilm.
- [0089] Il s'agit ici d'établir une caractérisation holistique de l'état de la peau.
- [0090] Les cellules de la peau récoltées en surface sont des cellules de *stratum corneum* ou en fonction de l'intensité du prélèvement (abrasion) ou de l'état de la peau (mise à nue après gommage ou exfoliation intense ou peeling), des cellules du *stratum lucida* sous-jacentes ou même du *stratum granulosum* encore plus enfouies en temps normal.
- [0091] Le microbiote cutané comprend un ensemble de microorganismes parmi lesquels des bactéries, des levures, des champignons, et des acariens.
- [0092] Par « protéines présentes à la surface des microorganismes », on entend les protéines exposées à la membrane : protéines sécrétées et protéines structurales synthétisées par les cellules qui transitent ou qui sont accrochées à la membrane cellulaire telles que pour les protéines sécrétées : *Staphylococcus aureus* produit la protéine Leucocidine de Pantone-Valentine, et une matrice extracellulaire « polysaccharidique intercellular adhesin » (PIA), *Cutibacterium acnes* produit des porphyrines, *Pseudomonas* une matrice à base d'alginate, *Escherichia coli* une matrice à base d'acide colanique, *Cutibacterium* une matrice à base de β -1,6-linked N-acetylglucosamine (PNAG) ; pour les protéines structurales ou d'adhésions à la surface de la peau : pour les bactéries gram positive (simple membrane) : des adhésines de la famille Bap, des pili de type 4 (important pour l'installation précoce du biofilm), des SAATs (Self-associating auto-transporters, promoteur de l'agrégation entre bactéries porteuses de SAATs), des intimines/invasines... ; plus spécifiquement pour *Cutibacterium acnes*, des protéines présentes à la surface de la membrane bactérienne, comme des « CAMP factors » (Christie-Atkins-Munch-Petersen factors), des sialidases, des dermatan-sulphate adhesines, des endoglycocéramidases, des chaperonines GroEL, un « SH3 domain-containing lipoprotein », une protéine de type pili/fimbriae Flp, et surtout une protéine DsA1 ; plus spécifiquement pour le genre bactérien *Staphylococcus*, des MSCRAMMs (molecular surface components recognizing adhesive molecules of the matrix) comme les protéines de la famille Clf-Sdr, avec la Bbp (bone sialoprotein-binding protein), la FnBPs (fibronectin-binding proteins), et la CNA (collagen adhesion), récemment a été identifiée pour *S. epidermidis* la protéine SesJ (Arora et al., 2020), tandis que pour *S. aureus*, c'est l'aureusimine (phevalin) qui semble être un marqueur du phénotype biofilm ; alors que pour les bactéries gram négatives (double membrane – LPS) : des adhésines de la famille Bap exhibant un domaine C-terminal LPXTG, des IMPs (Inner-membrane proteins), des pili de type 3 et 4...

- [0093] Les bactéries les plus communes sur la peau humaine sont de type Gram-positives et appartiennent principalement à 3 genres. On trouve les bactéries suivantes :
- [0094] • *Staphylococcus*, souvent opportunistes comme *Staphylococcus epidermidis*, qui constitue plus de 90 % de la flore résidente aérobie présente sur le *stratum corneum*.
- [0095] • D'autres staphylocoques qui ont été trouvés dans le biofilm cutané sont *Staphylococcus aureus* (commun, trouvé par exemple en portage asymptomatique dans les cavités nasales dans 20 % des cas²⁶) et *Staphylococcus hominis* ;
- [0096] • *Corynebacterium* ;
- [0097] • *Propionibacterium* (par exemple *Cutibacterium acnes*, *Propionibacterium granulosum*, *Propionibacterium avidum*). *Cutibacterium acnes* produit des acides gras issus de la lipolyse du sébum. Ce faisant elle acidifie le milieu cutané, ce qui inhibe la croissance des colonies de *Streptococcus pyogenes* ;
- [0098] • *Lactobacillus* ;
- [0099] • *Streptococcus*.
- [0100] De manière préférée, les microorganismes constitutifs du microbiote qui seront recherchées pour établir un diagnostic de l'état de la peau dans le cadre de la présente invention sont choisis parmi (Byrd et al., 2018) soit ceux communs à tout type de peaux : *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus lugdunensis*, *Cutibacterium acnes*, *Corynebacterium tuberculostearicum*, *Staphylococcus capitis*, *Malassezia Globosa*, *Malassezia restricta* ; soit plutôt caractéristiques des peaux grasses (G), ou sèches (S) ou humides (H) : *Staphylococcus hominis* (H, G), *Streptococcus mitis* (H, G), *Streptococcus oralis* (S), *Streptococcus pseudopneumoniae* (S), *Streptococcus sanguinis* (S), *Veillonella parvula* (S), *Micrococcus luteus* (S, H), *Corynebacterium simulans*, *Corynebacterium fastidiosum* (H), *Corynebacterium afermentans* (H), *Corynebacterium xerosis*, *Corynebacterium aurimucosum* (G), *Corynebacterium kroppenstedtii* (G), *Corynebacterium amycolatum* (G), *Enhydrobacter aerossaccus* (H), *Epidermophyton floccosum*, *Nannizzia nana*, *Nephroselmis olivacea*, *Cyanophora paradoxa*, *Aureoumbra lagunensis*, *Pycnococcus provasolii*, *Pyramimonas parkeae*, *Parachlorella kessleri*, *Aspergillus tubingensis*, *Zymoseptoria tritici*, *Tilletia walkeri* ; ou alors des microorganismes caractéristiques des peaux âgées : *Dermaococcus*, *Actinomyces* ; des peaux jeunes avec les Bacteroidetes tels : *Bacteroides*, *Alistipes*, *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Sphingobacterium*, ou avec les Firmicutes tels : *Lactobacillus*, *Aerococcus*, *Oscillospira*, *Ruminococcus*.
- [0101] Dans un mode de réalisation particulier, les bactéries recherchées comprennent au minimum *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Propionibacterium acnes*.
- [0102] Les autres microorganismes constitutifs du microbiote cutané sont des levures telles que *Malassezia furfur*, *Malassezia sympodialis*, *Candida parapsilosis*..., des

champignons tels que *Aspergillus tubingensis*, *Zymoseptoria tritici*, *Tilletia walkeri*, *Epidermophyton floccosum*, *Nannizzia nana*, *Nephroselmis olivacea*, *Cyanophora paradoxa*, *Aureoumbra lagunensis*, *Pycnococcus provasolii*.... ou des acariens tel que le *Demodex folliculorum*, *Demodex brevis*.

- [0103] Dans un mode de réalisation préféré de l'invention, au moins un des biomarqueurs spécifiques du microbiote cutané correspond un biomarqueur associé à un comportement de type biofilm du microbiote. Les bactéries et autres microorganismes sous forme de biofilm se définissent par opposition aux bactéries et autres microorganismes planctoniques, qui sont mobiles et non adhérents. Le biomarqueur spécifique du biofilm peut correspondre à une protéine présente à la surface des membranes des microorganismes ou à un autre élément du microbiote.
- [0104] Lorsque l'on souhaite rechercher la présence d'une bactérie ou d'un autre microorganisme sous forme de biofilm, les biomarqueurs sont choisis parmi les protéines d'adhésion telles que fimbriae, curli, pili..., caractéristiques de la présence en biofilm du microbiote installé naturellement sur la peau.
- [0105] Les biomarqueurs des cellules de la peau peuvent être choisis parmi des marqueurs de la présence de cellules cutanées et/ou de la qualité de la peau telles que la kératine, la filaggrine, la loricine..., des immunoglobulines telles que IgE, et des marqueurs de l'inflammation tels que la Protéine C-Réactive (en anglais C-Reactive Protein, CRP), les interleukines IL-1beta, IL-4, IL-6, IL-8, IL-11, IL-12, le Facteur Nécrosant de Tumeur (en anglais Tumor-Necrosis-Factor-alpha, TNF-alpha), l'Interféron-gamma (IFN-gamma), le facteur Stimulant les Colonies de Granulocytes et de Macrophages (en anglais Granulocytes Macrophages Colony-Stimulating Factor, GM-CSF), le Facteur de Croissance Transformant-beta (en anglais Transforming Growth Factor-beta, TGF-beta). Sans être directement considérées comme marqueurs de l'inflammation, il faut aussi mentionner les Immunoglobulines E (IgE) dont le niveau sérique est élevé dans les cas d'eczémas – dermatites atopiques.
- [0106] Dans un mode de réalisation particulier de l'invention, les biomarqueurs cellulaires recherchés comprennent au minimum un biomarqueur de la présence d'une cellule cutanée humaine, un biomarqueur IgE et un biomarqueur de l'inflammation.
- [0107] Le nombre de zones N correspond au nombre de biomarqueurs testés. N est supérieur à 5 de sorte à pouvoir tester un nombre suffisant de biomarqueurs pour avoir un résultat à valeur ajoutée résultant de l'analyse combinatoire des différents biomarqueurs.
- [0108] Dans des modes de réalisations particuliers de l'invention, au moins 8, 10, 15, 20, 25, 30 types de biomarqueurs différents sont testés simultanément.
- [0109] Dans un mode de réalisation préféré de l'invention, les « au moins 5 zones N » du dispositif permettent de révéler au moins la présence de *Staphylococcus epidermidis*,

Staphylococcus aureus, *Propionibacterium acnes* et la présence d'une cellule cutanée humaine, d'IgE et d'une inflammation.

- [0110] Le dispositif de révélation immunologique à usage unique est conditionné de manière stérile. Ce module se présente sous la forme d'un dispositif, typiquement en matière plastique, présentant un puit pour le déversement de la solution de solubilisation contenant la matière biologique récoltée, débouchant sur une série de canaux (par exemple des bandelettes de nitrocellulose ou bandelettes de flux latéral) contenant une pluralité de zones de reconnaissance et révélation spécifiques d'un biomarqueur d'intérêt. Ces canaux peuvent par exemple recevoir des bandelettes de nitrocellulose portant des anticorps, dans lesquels la solution de solubilisation contenant la matière biologique récoltée migre par action capillaire sur la bandelette.
- [0111] Dans un mode de réalisation préféré, le dispositif selon l'invention est un dispositif immunochromatographique par flux latéral.
- [0112] Les anticorps de détection peuvent être conjugués soit à une particule d'or de taille nanométrique (ne permet qu'une couleur de marquage en rouge par bandelette, mais différentes lignes de capture), soit à une particule colorée (permet de multiplier le nombre de détection par bandelette), ou par exemple le latex (couleur bleue).
- [0113] Un second objet de l'invention concerne un kit à usage unique pour la caractérisation de l'état de la peau comprenant :
- Un dispositif de prélèvement du complexe peau-microbiote comprenant un moyen de prélèvement dudit complexe ainsi qu'un réceptacle contenant une solution de solubilisation ;
 - Un dispositif de révélation immunologique du complexe peau-microbiote tel que décrit précédemment.
- [0114] Le moyen de prélèvement peut par exemple être constitué d'un patch, d'une raclette, d'un écouvillon imbibé d'une solution tampon ou d'une éponge imbibée d'une solution tampon d'un tissu de tulle ou de gaze imbibé d'une solution tampon, ou tout autre moyen adapté permettant une action physique d'exfoliation, d'imbibition, d'adsorption.
- [0115] Le taux de microorganismes, notamment de bactéries, par centimètre carré de peau varie fortement selon les zones de peau, notamment en fonction de la richesse en sébum. Ainsi pour disposer d'un échantillonnage représentatif, il est nécessaire de disposer d'un moyen de prélèvement adapté au type de peau et à la zone prélevée de façon à disposer de suffisamment de matière biologique pour réaliser l'analyse des biomarqueurs de cellules de la peau et du microbiote. La matière biologique prélevée comprend des éléments constitutifs de la partie exposée de la peau (cellules de *stratum corneum*, et/ou *lucidum*, et/ou *granulosum*) et du microbiote (bactéries, levures, champignons, et même acariens comme le demodex).

- [0116] De manière générale, on considèrera que le prélèvement doit permettre de récolter un nombre suffisant de bactéries pour obtenir une concentration d'au moins 10^3 cfu/mL de bactéries par mise en contact avec la solution de solubilisation destinée à recevoir la matière biologique récoltée. De préférence, pour une détection optimale, la concentration de la solution contenant le microbiote récolté sera de 10^4 cfu/mL de bactéries. Ces concentrations sont toutefois données à titre indicatif et dépendent de la sensibilité de détection de la méthode de révélation.
- [0117] Lorsque le prélèvement s'effectue via un patch, ce dernier aura une surface d'interaction (surface de collecte) avec la peau d'au moins 5 cm², voire de 10 cm², 12 cm² ou plus, en fonction de l'abondance du microbiote cutané et de l'efficacité du prélèvement. Le moyen de prélèvement (ou de récolte) est complété par un réceptacle (de type tube d'extraction ou équivalent) prérempli et conditionné sous un emballage stérile, contenant un tampon de solubilisation, par exemple un tampon de lyse/migration permettant de tamponner le pH de l'échantillon, de minimiser les liaisons non spécifiques, de neutraliser les interférences et de contrôler la vitesse d'écoulement grâce à l'utilisation de divers sels, tensioactifs, détergents, agents stabilisants ou réactifs de blocage (exemple de composition : PBS 1X avec 1% de TweenR20). Ce réceptacle présente un volume adapté à recevoir directement la surface de collecte du dispositif de prélèvement de façon à mettre en solution ce qui aura été prélevé à la surface de la peau.
- [0118] Le kit à usage unique ne nécessitant que des manipulations simples réalisables immédiatement après le prélèvement sans aucune connaissance biologique et permettant de caractériser un prélèvement par rapport à un grand nombre de biomarqueurs de référence, pour déterminer des combinaisons représentatives d'une grande variété de complexes peau/microbiote.
- [0119] Un troisième objet de l'invention concerne un système pour la mise en œuvre d'une recommandation cosmétique personnalisée basé sur la caractérisation du complexe peau-microbiote comprenant :
- Un dispositif de prélèvement du complexe peau-microbiote comprenant un moyen de prélèvement dudit complexe ainsi qu'un tube d'extraction contenant une solution de solubilisation ;
 - Un dispositif de révélation immunologique du complexe peau-microbiote tel que décrit précédemment, dans lequel lesdites N zones constituent des zones aptes à fournir un signal lorsqu'un biomarqueur est détecté ;
 - Un calculateur exécutant un traitement d'analyse d'image, l'image étant constituée par l'ensemble des signaux desdites zones N révélés grâce audit dispositif de révélation immunologique, pour déterminer la nature des biomarqueurs ayant été reconnus dans lesdites zones N et catégoriser l'état de la

peau en fonction de la combinaison de biomarqueurs identifiée.

- [0120] Le calculateur réalise une acquisition d'une image des différentes zones N après un temps de réaction prédéterminé, et transmet de cette image sous une forme numérique à un centre de traitement procédant à une analyse automatique pour caractériser le type de biomarqueurs ayant réagis avec les anticorps présents dans les zones N du dispositif de révélation.
- [0121] La prise de vue peut être réalisée par Smartphone ou équivalent, associé à un logiciel d'analyse d'image pour la traiter en exploitant les données accumulées (cette analyse peut faire intervenir un logiciel entraîné basé sur des processus d'apprentissage de type IA comprenant à la fois les données renseignées par l'utilisateur – âge, poids, taille, consommation de tabac, d'alcool, susceptibilité au sucre (diabète), séances en cabines UV...-). Il est ensuite possible de scanner les codes-barres des produits utilisés pour la routine cosmétique-, pour une mise en relation avec les informations relatives aux biomarqueurs de la peau et aux biomarqueurs du microbiote, afin d'établir une recommandation de produits (nutraceutiques, cosmétiques...) les plus adaptés à l'état de la peau et au microbiote.
- [0122] Ces trois moyens forment un ensemble indissociable : l'analyse des biomarqueurs via le dispositif de révélation immunologique est possible seulement parce que le dispositif de prélèvement permet le recueil d'un volume suffisant de matière biologique (cellule de la peau et microbiote).
- [0123] L'utilisation de ce kit pour une analyse complexe en raison du grand nombre de biomarqueurs analysés à la fois sur les cellules de la peau et sur bactéries référentes et d'une combinatoire correspondant à un grand nombre d'arrangements nécessaire pour catégoriser la matière biologique, ne permettant pas de tirer des enseignements par une lecture simple comme pour un test Covid ou un test de grossesse, n'est possible qu'en raison de la simplicité de l'acquisition d'une image et de sa transmission sous forme numérique pour un traitement sur un calculateur mutualisant les traitements des kits pour un grand nombre d'utilisateurs.
- [0124] Les canaux présentant les zones de détection définissent un plan fermé par une fenêtre transparente. L'utilisateur utilise cette fenêtre pour prendre une photographie après écoulement du temps de réaction, à l'aide par exemple d'un téléphone intelligent exécutant une application dédiée commandant notamment :
 - a. l'acquisition d'une image,
 - b. la vérification locale, sur le calculateur du téléphone intelligent, de la conformité de l'image acquise par rapport à des mires prévues sur le dispositif d'imagerie par exemple
 - c. la saisie d'information additionnelle
 - d. l'horodatage et la géolocalisation éventuelle du téléphone intelligent

- e. la transmission de l'image et des informations associées à un serveur distant
- [0125] Exploitation des images
- [0126] Les images reçues sur le serveur font l'objet ensuite d'un traitement automatique de reconnaissance des zones de détection ayant réagi pour codifier la combinaison de biomarqueurs présente dans le complexe peau-microbiote analysé, et catégoriser la peau par un traitement de cette combinaison, notamment par apprentissage supervisé à partir d'une base de référence portant sur des recueils sur un panel de personnes ayant fait l'objet d'une caractérisation par un expert.
- [0127] Un quatrième objet de l'invention concerne une méthode de recommandation cosmétique personnalisée comprenant les étapes suivantes :
- Prélèvement d'un échantillon de matière biologique à la surface de la peau à l'aide d'un moyen de prélèvement
 - Mise en suspension des cellules de la peau et des microorganismes constitutifs de la matière biologique prélevée dans une solution de solubilisation
 - Déversement de ladite solution de solubilisation dans le puits de transfert d'un dispositif de révélation immunologique tel que défini précédemment
 - Incubation entre 1 et 10 min afin de laisser réagir les cellules et les microorganismes avec les réactifs sur chacune des zones N dudit dispositif de révélation immunologique
 - Traitement de l'image constituée par l'ensemble des signaux révélés sur chacune des zones N via un calculateur permettant de catégoriser la peau par un traitement de cette combinaison de signaux, notamment par apprentissage supervisé à partir d'une base de référence
 - Recommandation d'un ou de plusieurs produits cosmétiques adaptés à la peau dudit l'individu en fonction de la combinaison de biomarqueurs révélée.
- [0128] La recommandation est établie sur la base d'un arbre décisionnel prenant en compte les informations relatives à un état de de peau irritée et/ou infectée, qui se traduit par exemple par les critères suivants :
- [0129] 1 - Information sur le niveau d'irritation ou d'inflammation de la peau telle que la présence d'une dermatite atopique, d'un eczéma, d'une rosacée... grâce aux marqueurs biologiques « peau » suivants :
- Marqueurs biologiques : kératine (témoin qualité du prélèvement), filaggrine..., IgE, CRP, IL-6..., ;
 - CRP : peut varier en fonction cycle menstruel, marqueur infection ;
 - Si marqueur kératine faible = gommage ou exfoliation récent et trop agressif, peeling ;
- [0130] 2 - Information sur la composition du microbiote (niveau de colonisation/contamination de la peau).

- [0131] Le microbiote est considéré « normal » si la colonisation est de type « commensale », le microbiote étant constituée de microorganismes attendus et les marqueurs biologiques sont à des niveaux bas ou moyens.
- [0132] Une contamination ou une infection sera détectée si le marqueur biologique du microorganisme cible est élevé, par exemple :
- Présence d’acné si *C. acnes* est élevé
 - Présence d’une dermatite atopique (eczéma) infectée si le marqueur *S. aureus* est élevé
 - Présence d’une rosacée si le marqueur *S. epidermidis* ou le marqueur *Demodex* est élevé
 - Risque de pellicules sur le cuir chevelu si le marqueur *Malassezia* est élevé.
- [0133] Exemple non limitatif d’un mode de réalisation de l’invention
- [0134] La présente invention sera mieux comprise à la lecture de la description qui suit, concernant un exemple non limitatif de réalisation où :
- [0135] Une personne constate l’apparition de boutons sur son visage, elle estime sa peau plutôt grasse, elle utilise une routine de soin lui convenant (conseils maternels, d’amies, d’esthéticiennes etc), elle a entendu parler du microbiote intestinal et de son impact sur la santé (stimulation du système immunitaire, protection contre des germes pathogènes pouvant irriter ou même agresser le tube digestif etc), il existe des tests mais ce n’est pas pratique, il faut commander un kit de prélèvement sur un site internet, c’est assez cher (250 à 500€), réaliser le prélèvement à domicile et ensuite le renvoyer à un laboratoire qui réalise une analyse « métagénomique », et ensuite attendre plusieurs semaines pour obtenir un résultat et des conseils. Il faut être très motivé et patient.
- [0136] Avec le dispositif selon l’invention, appelé ici « Smart Derma », il suffit de se rendre dans une boutique cosmétique, ou une pharmacie (cosmétique et hygiène en OTC), ou de le commander via une application smartphone. Même s’il est recommandé de réaliser le test le matin après s’être démaquillé et rincé la peau du visage la veille, on peut aussi procéder au test de façon extemporanée (avec le risque de n’identifier que les 3 ou 4 principaux microorganismes du microbiote, mais cela peut être suffisant pour confirmer une suspicion d’acné, par exemple). Le dispositif se présente la forme d’un kit avec un dispositif simple de prélèvement sur la peau, on met un gant (pour éviter de contaminer avec le microbiote de la main, question d’hygiène même si on se passe plusieurs milliers de fois cette main sur le visage), on applique un petit dispositif spongieux, absorbant, légèrement abrasif imbibé d’une solution optimisant le prélèvement puis on insère ce dispositif dans un tube contenant une solution dite « de re-suspension » (ou de « solubilisation »). Le tube est clipsé sur le puits au centre du disque, il suffit d’appuyer pour démarrer le test, de la même façon qu’avec le piston

d'une seringue, on comprime l'éponge, poussant la solution de resuspension chargée en analytes dans le puits dont le fond conique répartit ladite solution sur le pourtour, où débouchent des canaux dans lesquels sont insérés des dispositifs immunochromatographiques par flux latéral (ICFL), disposés en rayons (schéma).

- [0137] La solution s'écoule dans le dispositif ICFL constitué d'une feuille de nitrocellulose absorbante (NC) qui permet de créer un flux de migration, avec une zone d'entrée au-dessus de laquelle est disposée une autre feuille de NC où un « conjugué de détection » aura été déposé. Ce conjugué de détection est en général un anticorps monoclonal dirigé contre un antigène cible, l'analyte recherché, c'est-à-dire une protéine caractéristique de l'état de la peau (protéine de structure -kératine, filaggrine...-, de l'inflammation – CRP, ...-, du système immunitaire – IL6, ...- etc) ou du microbiote (protéines d'adhésion fimbriae, curli, pili..., caractéristiques de la présence en biofilm du microbiote installé naturellement sur la peau, exprimées par les 3 bactéries majeures *Staphylococcus epidermidis*, *Cutibacterium acnes*, *Staphylococcus aureus*, et d'autres plus minoritaires, certaines communes à tout type de peau et d'autres spécifiques d'une peau sèche, ou grasse ou humide). Le conjugué de détection est appelé ainsi parce qu'y est fixé un composé (microparticule d'or, microbilles de latex, etc.) qui permettra la visualisation de l'interaction antigène-anticorps.
- [0138] Après cette première interaction à l'entrée du puits de dépôt, le flux progresse vers une zone de détection sur laquelle a été déposé un anticorps monoclonal de capture aussi dirigé contre les antigènes caractéristiques de l'état de la peau et du microbiote. Chaque anticorps de capture est déposé selon une ligne test dont le résultat indiquera la présence ou l'absence de l'analyte.
- [0139] Il y a systématiquement, en plus, une ligne de contrôle dont le résultat permet la validation d'une bonne migration et donc la validation du test. Pour qu'il y ait une réaction sur cette zone, l'anticorps fixe sur la membrane au niveau de la ligne de contrôle est dirigé contre le conjugué.
- [0140] Sur chaque dispositif ICFL sont prévus plusieurs détections d'analytes (nécessitant plusieurs couples « conjugué de détection et anticorps de capture »). Ce qui permet de déterminer un profil de l'état de la peau (saine, normale, sèche, grasse, etc) associé à un profil de microbiote (sain, caractéristique d'une peau sèche, grasse, susceptible à l'acné, à la dermatite etc).
- [0141] Lecture et analyse sont réalisées par prise d'image avec smartphone, interprétation par IA. Les informations données par les biomarqueurs peuvent de plus être combinées aux renseignements apportés par la personne.

Revendications

- [Revendication 1] Dispositif de révélation immunologique du complexe peau-microbiote comprenant un support sur lequel est aménagé un puits de transfert destiné à recevoir une solution comprenant les constituants du complexe peau-microbiote, ledit puits débouchant sur une pluralité de N zones portant chacune (i) un réactif de détection et (ii) un réactif de capture, et ledit complexe peau-microbiote étant constitué par des cellules de la peau et des microorganismes et autres éléments constitutifs du microbiote cutané, ledit dispositif comprenant :
- un nombre de zones N supérieur ou égal à 5
 - au moins un réactif de détection spécifique d'un biomarqueur de cellules de la peau et au moins un réactif de détection spécifique du microbiote cutané
 - lesdits réactifs de détection immunologique comprennent chacun un anticorps spécifique d'un biomarqueur des cellules de la peau ou du microbiote cutané, conjugué à un système de révélation colorimétrique
 - lesdits réactifs de capture comprennent chacun un anticorps, fixé audit support dans chacune des zones N, capable de reconnaître ledit biomarqueur présent dans ladite zone N,
- caractérisé en ce que ledit au moins un biomarqueur spécifique du microbiote cutané correspond à un épitope exposé à la surface du microbiote.
- [Revendication 2] Dispositif selon la revendication 1 dans lequel au moins un des biomarqueurs spécifiques du microbiote cutané correspond à un épitope associé à un comportement de type biofilm du microbiote.
- [Revendication 3] Dispositif selon l'une des revendications 1 ou 2 dans lequel ledit épitope exposé à la surface du microbiote est associé une protéine exposée à la surface d'un microorganisme constitutif du microbiote.
- [Revendication 4] Dispositif selon la revendication 1 dans lequel ledit microorganisme est choisi parmi les bactéries, les levures, les champignons et les acariens.
- [Revendication 5] Dispositif selon la revendication 4 dans lequel lesdites bactéries sont choisies parmi *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Cutibacterium acnes*, *Staphylococcus hominis*, *Corynebacterium*, *Propionibacterium acnes*, *Propionibacterium granulosum*, *Propionibacterium*

avidum, Lactobacillus, Streptococcus.

- [Revendication 6] Dispositif selon l'une des revendications 3, 4 ou 5 dans lequel lesdites protéines exposées à la membrane des microorganismes sont choisies parmi la Leucocidine de Pantone-Valentine, les porphyrines, les alginates, β -1,6-linked N-acetylglucosamine (PNAG), les adhésines de la famille Bap, des pili de type 4, des Self-associating autotransporters, les intimines/invasine, CAMP factors, les sialidases, les dermatan-sulphate adhesines, les endoglycocéramidases, les chaperonines GroEL, les protéines de type SH3 domain-containing lipoprotein, la protéine de type pili/fimbriae Flp, la protéine DsA1 ; les protéines de la famille Clf-Sdr, telle que la Bbp, la FnBPs et la CNA, la protéine SesJ, l'aureusimine, les adhésines de la famille Bap exhibant un domaine C-terminal LPXTG, les IMPs, les pili de type 3 et 4.
- [Revendication 7] Dispositif selon l'une des revendications 1 à 6 dans lequel lesdits biomarqueurs des cellules de la peau sont choisis parmi la kératine, la filaggrine, la loricrine, des immunoglobulines telles que IgE, et des marqueurs de l'inflammation tels que la Protéine C-Réactive, les interleukines IL-1beta, IL-4, IL-6, IL-8, IL-11, IL-12, le Facteur Nécrosant de Tumeur, l'Interféron-gamma, le facteur stimulant les colonies de granulocytes et de macrophages, le Facteur de Croissance Transformant-beta (en anglais Transforming Growth Factor-beta, TGF-beta).
- [Revendication 8] Dispositif selon l'une des revendications 1 à 7 dans lequel lesdites zones N permettent de révéler au moins la présence de *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Propionibacterium acnes* et la présence d'une cellules cutanées humaines, d'IgE et d'une inflammation.
- [Revendication 9] Dispositif selon l'une des revendications 1 à 8 caractérisé en ce qu'il s'agit d'un dispositif immunochromatographique par flux latéral.
- [Revendication 10] Kit à usage unique pour la caractérisation de l'état de la peau comprenant :
- Un dispositif de prélèvement du complexe peau-microbiote comprenant un moyen de prélèvement dudit complexe ainsi qu'un tube d'extraction contenant une solution de solubilisation
 - Un dispositif de révélation immunologique du complexe peau-microbiote tel que défini à l'une des revendications 1 à 9.

- [Revendication 11] Kit selon la revendication 10 dans lequel ledit moyen de prélèvement est constitué d'un patch, d'une raclette, d'un écouvillon imbibé d'une solution tampon, d'une éponge imbibée d'une solution tampon, d'un tissu de tulle ou de gaze imbibé d'une solution tampon.
- [Revendication 12] Système pour la mise en œuvre d'une recommandation cosmétique personnalisée basé sur la caractérisation du complexe peau-microbiote comprenant :
- Un dispositif de prélèvement du complexe peau-microbiote comprenant un moyen de prélèvement dudit complexe ainsi qu'un tube d'extraction contenant solution de solubilisation
 - Un dispositif de révélation immunologique du complexe peau-microbiote tel que défini à l'une des revendications 1 à 9, dans lequel lesdites N zones constituent des zones aptes à fournir un signal lorsqu'un biomarqueur est détecté
 - un calculateur exécutant un traitement d'analyse d'image, l'image étant constituée par l'ensemble des signaux desdites zones N révélés grâce audit dispositif de révélation immunologique, pour déterminer la nature des biomarqueurs ayant été reconnus dans lesdites zones N et catégoriser l'état de la peau en fonction de la combinaison de biomarqueurs identifiée.
- [Revendication 13] Méthode de recommandation cosmétique personnalisée basé sur la caractérisation du complexe peau-microbiote d'un individu comprenant les étapes de :
- Disposer d'un échantillon de matière biologique prélevée à la surface de la peau
 - Mise en suspension des cellules de la peau et des microorganismes et autres éléments constitutifs de la matière biologique prélevée dans une solution de solubilisation
 - Déversement de ladite solution de solubilisation dans le puits de transfert d'un dispositif de révélation immunologique tel que défini à l'une des revendications 1 à 9
 - Incubation entre 1 et 10 min afin de laisser réagir les cellules et les microorganismes avec les réactifs sur chacune des zones N dudit dispositif de révélation immunologique
 - Traitement de l'image constituée par l'ensemble des signaux

révélés sur chacune des zones N via un calculateur permettant de catégoriser la peau par un traitement de cette combinaison de signaux, notamment par apprentissage supervisé à partir d'une base de référence

- Recommandation d'un ou de plusieurs produits cosmétiques adaptés à la peau dudit l'individu en fonction de la combinaison de biomarqueurs révélée.

RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement
national

FA 917091
FR 2213860

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
A	GOLEVA ELENA ET AL: "Skin tape proteomics identifies pathways associated with transepidermal water loss and allergen polysensitization in atopic dermatitis", JOURNAL OF ALLERGY AND CLINICAL IMMUNOLOGY, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 146, no. 6, 28 avril 2020 (2020-04-28), pages 1367-1378, XP086384143, ISSN: 0091-6749, DOI: 10.1016/J.JACI.2020.04.022 [extrait le 2020-04-28] * le document en entier * * abrégé * * tableau 1 * -----	1-13	
A	WO 2020/161238 A1 (FIBROTX OÜ [EE]) 13 août 2020 (2020-08-13) * le document en entier * * abrégé * * revendications 1, 19 * -----	1-13	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC)
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
13 octobre 2023		Gall-Truchot, A	
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant	
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire			

1

EPO FORM 1503 12.99 (P04C14)

ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE **RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET FRANÇAIS NO. FR 2213860 FA 917091**

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche préliminaire visé ci-dessus.
 Les dits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du **13-10-2023**
 Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets, ni de l'Administration française

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
US 2015148265 A1	28-05-2015	AUCUN	
US 2019369119 A1	05-12-2019	BR 112020024715 A2	23-03-2021
		CN 112272775 A	26-01-2021
		EP 3803415 A1	14-04-2021
		US 2019369119 A1	05-12-2019
		WO 2019236632 A1	12-12-2019
WO 2022121864 A1	16-06-2022	CN 114622024 A	14-06-2022
		KR 20230118928 A	14-08-2023
		WO 2022121864 A1	16-06-2022
WO 2020161238 A1	13-08-2020	AU 2020217956 A1	26-08-2021
		CA 3128453 A1	13-08-2020
		CN 113574385 A	29-10-2021
		EP 3921646 A1	15-12-2021
		JP 2022519677 A	24-03-2022
		KR 20210127180 A	21-10-2021
		US 2022178943 A1	09-06-2022
		WO 2020161238 A1	13-08-2020